

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861480

研究課題名(和文)更年期代謝障害とうつに対するエストロゲンの中枢作用に立脚した新規補充療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new estrogen replacement therapy based on a central action of a menopausal metabolic disorder and depression

研究代表者

米澤 理可 (YONEZAWA, Rika)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：70649293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン(E2)低下に伴って女性に増加するうつ・不安は肥満・糖尿病とも関連し、E2末梢投与による治療効果が知られているが、合併症として癌や心血管疾患などが懸念される。そこで合併症を回避した中枢選択的なE2投与による糖脂質代謝、うつ・不安の改善効果を解明し、中枢選択的ホルモン補充療法の開発を目的に研究を立案し以下の結果を得た。E2中枢投与(E2-ICV)は閉経肥満マウス(OVX-HF)で認める肥満・耐糖能障害を改善した。E2-ICVは尾懸垂試験においてOVX-HFで認められるうつ状態を改善した。E2-ICVはオープンフィールド試験においてOVX-HFで認められる不安状態を改善した。

研究成果の概要(英文)：The depression and the anxiety increased for menopausal women associated with an estrogen (E2) decline. These E2 decline is related to overweight and diabetes, and the improvement effect of the peripheral administration of E2 is reported. But systemic estrogen replacement therapy has a risk for breast cancer and a cardiovascular disease. So we elucidated depression and anxiety improvement effect by central selective E2 administration, drafted a study for the purpose of development of the central selective hormone replacement therapy which evaded a complication and got the following result. 1) The E2 central administration (E2-ICV) improved obesity, impaired glucose tolerance to detect in menopausal obese mice (OVX-HF). 2) E2-ICV improved depressive state by a tail suspension test in OVX-HF. 3) E2-ICV was improved anxiety state by the evaluation of an open field test in OVX-HF.

研究分野：女性医学

キーワード：エストラジオール 中枢作用 閉経 うつ 不安 ホルモン補充療法

## 1. 研究開始当初の背景

女性は更年期には、卵巣機能の低下に伴い多彩な体調の変化をきたす。女性のうつ病有病率は男性の約2倍と報告されており、その頻度は特に閉経後に急増する。また肥満や糖尿病の有病率も閉経後に急激に増加することが知られている。さらに女性の肥満者はうつ病の有病率が高いことや、糖尿病患者はうつ病の合併が多いことが報告され(文献)、閉経後のうつ病発症にはこれらの複合的な関与が示唆されている。更年期における糖脂質代謝異常にはE2を中心としたHRTが有効であるが、発癌性や心血管疾患に対する危険性を考慮され、現在代謝改善のみを目的としたHRTは一般的には行われていない。これに対し、更年期の精神症状に対するHRTは抗うつ薬や抗不安薬と併用して行われているものの、うつ症状に対する有効性は限定的であり(文献)、不安症状に対するHRTの有効性にはコンセンサスは未だ得られていなかった。

近年E2は中枢神経系に作用し、エネルギー代謝や摂食行動に関与することで全身の糖脂質代謝を制御することが明らかとなった(文献)。そこで代表者は閉経肥満モデルマウスにE2を全身投与、または中枢選択的な脳室内投与を行い、E2の中枢性および末梢性代謝改善作用とその制御メカニズムを解明した(文献)。卵巣摘出(OVX)を行ったマウスに6週間の高脂肪食負荷(HF)を行い作製した閉経肥満モデルマウス(OVX-HF)は偽手術通常食マウス(Control)と比較し明らかな内臓脂肪蓄積を伴う肥満を呈し、糖およびインスリン負荷試験(GTT, ITT)において耐糖能障害とインスリン抵抗性を示した。OVX-HFへの10日間の中枢選択的E2投与(E2-ICV)は、E2皮下投与(E2-SC)と同等の糖代謝改善効果を示した。その機序としてE2は直接、脂肪組織で脂質合成と慢性炎症に関わる遺伝子発現を抑制した。さらにE2は中枢性に体温、自発運動量やエネルギー消費量を亢進し、内臓脂肪組織の脂肪分解と肝糖新生律速酵素の発現を制御することを解明した。以上の成績は中枢選択的なE2投与により、十分な糖脂質代謝改善作用が期待できることを示す重要な基礎的知見である。E2投与による抗うつ効果は多数報告されているが、いずれも末梢投与による成績であり、中枢神経への直接投与の効果を検証した報告はない。そこで代表者は作製した閉経肥満モデルマウスがうつ、不安の症状を呈することを検証し、閉経肥満モデルマウスに対するE2の中枢選択的投与の効果を実証し、その作用メカニズムを解明する本研究課題を着想した。

現在行われているHRTは乳癌、子宮内膜癌などのエストロゲン依存性腫瘍や血栓症の発症のリスクから、加療期間の制限や慎重な経過観察を要する。代表者は中枢選択的E2投与によりマウスの体脂肪が減少し糖代謝

が改善する事を実証しているが、臨床的に中枢投与を行うための方法として、経鼻投与が考えられる。鼻腔上部の頭蓋骨上には嗅球が存在し、その直下の頭蓋骨には嗅神経線維が通る無数の細孔を持つ篩板が存在する。嗅神経線維は鼻粘膜細胞に達し、脳脊髄液(CSF)を伴うため、鼻腔からCSFへの直接的な交通を示すことも報告されている。そこで、経鼻投与による中枢選択的なE2投与により代謝や抗うつ抗不安作用を発揮することが明らかとなれば、将来の新たなHRT戦略に向けた研究基盤となるため、本研究の臨床的価値は高いと考える。

## 2. 研究の目的

我々はE2による中枢性代謝改善メカニズムを研究し報告してきたが、本研究ではE2中枢投与による抗うつ・抗不安作用を解明し、経鼻投与による改善効果を検討する。特にE2による抗うつ抗不安作用のメカニズムは不明の点が多いため、閉経後に抑制されるセロトニン神経活動再活性化(文献)やセロトニン合成(文献)、海馬におけるbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)の発現誘導(文献)などの作用機構につき、その重要性を検証する。さらに代表者は肥大化した内臓脂肪組織において、E2がマクロファージ浸潤と慢性炎症を抑制することを実証したが、本研究では炎症性サイトカインによるうつ病発症メカニズムへのE2の関与を検証する。以上、E2による主要な抗うつ作用につき、その鍵となるメカニズムの解明を行う。以上を踏まえ、以下の3点について検証を行うことを目的とした。

閉経・肥満モデルマウスにおけるうつ・不安の評価とE2全身・中枢投与の改善効果について行動実験により検証する。また分子生物学的手法により、その鍵となる改善メカニズムの解明を行う。

閉経・肥満モデルマウスに対するE2経鼻投与を行う。経鼻投与の中枢へのE2移行性を検証し、至適投与条件を決定後、代謝改善作用と抗うつ抗不安作用を検証する。

乳癌細胞を乳腺に移植したマウスにE2経鼻投与を行い、子宮内膜や移植した乳癌の増殖に与える影響を評価することで経鼻投与によるHRTの安全性を検証する。

## 3. 研究の方法

(1)E2中枢投与による抗うつ・抗不安作用の検証

実験スケジュール(図1): 8週齢の雌C57BL6/Jマウスに卵巣摘出術(OVX)又はsham手術を行い通常食(ND)を与え、卵巣摘出2週間後より60%高脂肪食(HFD)負荷を開始した(OVX-HF)。高脂肪食負荷から4週間後に全てマウスに対し側脳室に脳室内投与(ICV)カニューレを挿入し、浸透圧ポンプにより人

工脳脊髄液(ACSF)の持続投与を開始した。手術による侵襲から回復する手術2週間後よりE2脳室内投与群(E2-ICV)は水溶性エストロゲン(E2) (1 µg/kg/day)を浸透圧ポンプにより投与開始し、エストロゲン全身投与群(E2-SC)はE2 (50 µg/kg/day)を浸透圧ポンプにて持続的に皮下投与した。また生理的うつ・不安に対する行動実験が適切に行われたことを示すため、行動実験の30分前にOVX-HFに対して抗うつ薬(イミプラミン)(10mg/kg)または抗不安薬(ジアゼパン)(0.5mg/kg)を腹腔内投与した。なお、脳室内投与のストレスを同等に与えるために、E2-ICV群以外の全ての群において、浸透圧ポンプにて人工脳脊髄液(ACSF)の脳室内持続投与を行った。E2投与は3週間行い、その間に行動実験を行った。行動実験は、うつの評価として尾懸垂試験と強制水泳試験、不安の評価としてオープンフィールド試験と明暗箱試験を行った。実験終了後にマウスを16-20時間絶食させて安楽死させ、血清や組織の採取を行った。

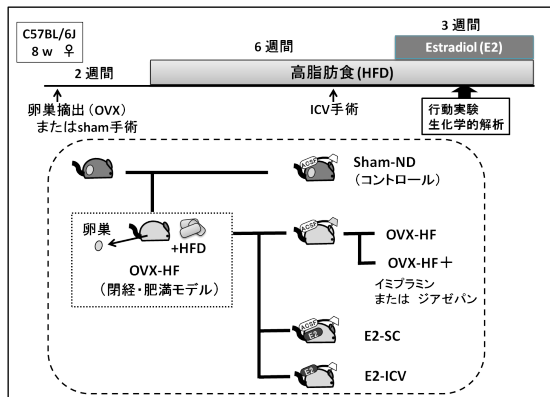


図1 実験スケジュール

### うつ・不安の評価

- 尾懸垂試験：高さ 22 cm、幅 17 cm、奥行き 15 cm の試験箱において、マウスの尾を試験装置内に設置したフックに尾を固定して(天井から 5 cm) 逆さの状態で吊るした。試験時間 10 分中の不動時間を測定した。
- 強制水泳試験：プラスチック製の円柱水槽 ( 21.8 × 25 cm ) に水面の高さが底から 12cm となるように水温 25 °C の水を満たした。強制水泳試験は 2 日間行い、1 日目は 15 分間、2 日目は 6 分間の試験を行った。2 日目のマウス入水後 2-6 分の 4 分間の不動時間を測定、評価した。
- オープンフィールド試験：45 × 45 × 30 cm のオープンフィールド装置を作製し、中心の 27 × 27 cm の領域を中央区画とした。フィールド内でマウスを自由に探索させ、試験 25 分中の中央区画への進入回数・滞在時間を測定した。
- 明暗箱試験：明室、暗室がそれぞれ 17 × 17 × 17 cm からなる明暗箱試験装置を作製し、明室と暗室の間には 4 × 4 × 10 cm のトンネルを設置した。試験装置内でマウスを自

由に探索させ、試験時間 10 分中のトンネル通過回数、明室・暗室の滞在時間をそれぞれ測定した。

### (2) E2 中枢投与の抗うつ・抗不安作用におけるメカニズムの解明：

マウスの解剖時に脳から海馬組織を摘出し、リアルタイム PCR、ウエスタンブロットにて解析を行った。また、血清コルチコステロンを ELISA 法にて測定した。

## 4. 研究成果

### (1)-1 閉経・肥満モデルマウスにおけるうつの評価

尾懸垂試験：OVX-HF において、不動時間(図 2)は、コントロールと比較して有意に増加 ( $P < 0.05$ ) し、うつ状態を呈した。OVX-HF に対しポジティブコントロールとして抗うつ薬(イミプラミン)を投与した群では、OVX-HF と比較して不動時間が有意に低下 ( $P < 0.01$ ) し、うつ状態の改善を認めた。一方 E2 投与群では、E2-SC ( $P < 0.01$ )、E2-ICV ( $P < 0.05$ ) ともに OVX-HF と比較して不動時間の有意な減少を認めた。以上から、OVX-HF はうつ状態を呈すること、またそのうつ状態は E2 の中枢投与によって改善することが示された。

強制水泳試験：OVX-HF において、不動時間は、コントロールと比較して有意に増加 ( $P < 0.05$ ) し、うつ状態を呈した。OVX-HF に対しイミプラミンを投与した群では、OVX-HF と比較して不動時間が有意に低下 ( $P < 0.01$ ) し、うつ状態の改善を認めた。一方 E2 投与群では、E2-SC、E2-ICV ともに OVX-HF と比較して有意な減少を認めなかった。

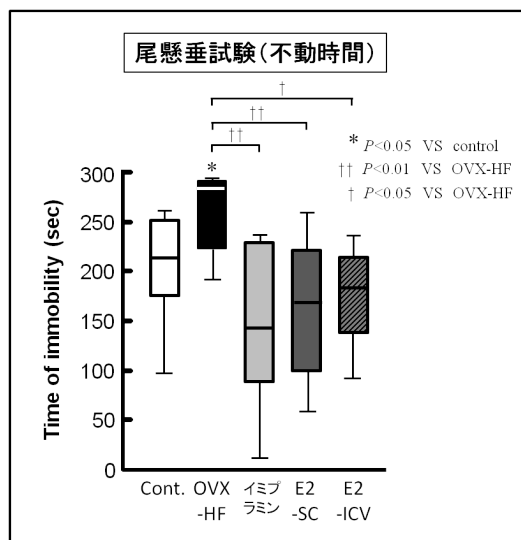


図2 うつの評価(尾懸垂試験)

### (1)-2 閉経・肥満モデルマウスにおける不安の評価

オープンフィールド試験：中央区画侵入回数(図 3)は、OVX-HF でコントロールと比較して有意に減少 ( $P < 0.01$ ) し、不安状態を呈した。OVX-HF に対しポジティブコントロール

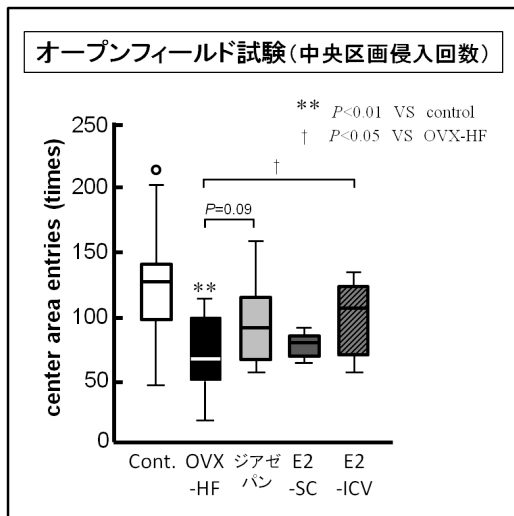


図3 不安の評価(オープンフィールド試験)

として抗不安薬(ジアゼパン)を投与した群では、OVX-HFと比較して侵入回数が増加傾向( $P=0.09$ )を示し、不安の改善を認めた。E2投与群では、E2-SCではOVX-HFと比較して変化を認めなかったのに対し、E2-ICVで侵入回数の有意な増加( $P<0.05$ )を認めた。中央区画滞在時間(図4)は、OVX-HFでコントロールと比較して有意に減少( $P<0.01$ )し、不安状態を呈した。ジアゼパンを投与した群では、滞在時間はOVX-HFと比較して有意に増加( $P<0.05$ )し、不安の改善を認めた。E2投与群では、E2-SC、E2-ICVともにOVX-HFと比較して滞在時間の有意な増加( $P<0.05$ )を認めた。以上から、OVX-HFは不安状態を呈すること、またその不安状態はE2の中枢投与によって改善することが示された。

明暗箱試験：明室滞在時間、明室・暗室間のトンネル通過回数は、OVX-HFでコントロールと比較して有意に減少( $P<0.05$ )し、不安状態が示された。OVX-HFに対しジアゼパンを投与した群では、OVX-HFと比較してトンネル通過回数において有意な増加( $P<0.05$ )を示し不安の改善がみられたが、E2-SC、E2-ICVではいずれの試験においてもOVX-HFと比較して明らかな不安状態の改善を認めなかった。

#### (2)E2 中枢投与の抗うつ・抗不安作用におけるメカニズムの解明

海馬組織におけるセロトニン受容体5-HT<sub>1A</sub>およびBDNF発現に及ぼす影響：セロトニン(5-HT)受容体サブタイプの一つである5-HT<sub>1A</sub>は不安・うつに関連し、CREBのリン酸化を制御し、うつ病に關与する脳由来神経遺伝子(brain-derived neurotrophic factor: BDNF)産生の調節に關与する。海馬組織において、セロトニン受容体1A(5-HT<sub>1A</sub>) mRNAの発現は、コントロールに対してOVX-HFで有意に増加( $P<0.05$ )し、OVX-HFと比較してE2-SCで有意に減少( $P<0.05$ )した(図4)。一方BDNFのmRNA発現量はOVX-HF、E2-SC、E2-ICVにおいて変化を認めなかったが、BDNFの前駆体で

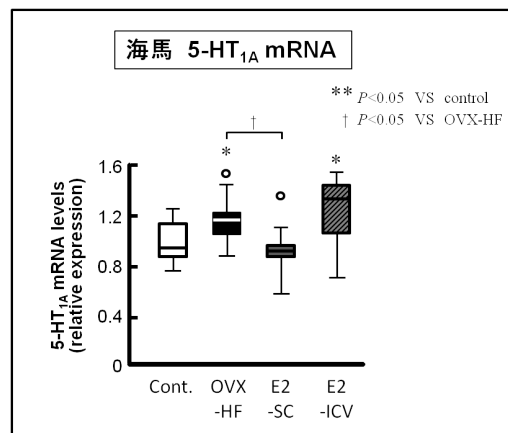


図4 海馬における5-HT<sub>1A</sub> mRNA

ある proBDNF のタンパク発現量はコントロールと比較して有意差はないもののOVX-HFで減少し、E2-ICVがそれを上昇させる傾向を認めた。従って、E2が5-HT<sub>1A</sub>の発現量の正常化に關連し、E2がBDNFの発現を転写ではなく翻訳、タンパクの安定化の段階で制御しうる可能性が考えられた。

血清コルチコステロン濃度に対する影響：ヒトにおいて、不安障害およびうつ病患者でストレスの指標となる血清コルチコステロン濃度を測定した。血清コルチコステロン濃度はコントロールと比較して、OVX-HF、E2-SC、E2-ICVいずれの群においても変化を認めなかったが、今回の検討では強制水泳試験3日後の解剖時の血清における検討であったため、より試験直後の血清レベルの比較が今後の検討課題と考えられた。

#### <引用文献>

- Carpenter KM, et al. *Am J Public Health*. 90:251, 2000
- Zweifel JE, et al. *Psychoendocrinol*. 22:189, 1997
- Gao Q, et al. *Nat Med*. 13:89, 2007
- Yonezawa R, et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 303:E445, 2012
- Halbreich U, et al. *Biol Psychiatry*. 37:434, 1995
- Hiroi R, et al. *Biol Psychiatry*. 60:288, 2006
- Singh M, et al. *Endocrinology*. 136:2320, 1995

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

米澤理可、若手の最新研究コーナー；エストロゲンの末梢または中枢投与による、卵巣摘出後高脂肪食負荷マウスの糖脂質代謝とうつ症状に対する改善効果とメカニズムの解析、産科と婦人科、査読なし、Vol.80、No2、2013、pp.251-253

〔学会発表〕(計 3 件)

鮫島梓、米澤理可、齋藤滋、エストロゲン投与した閉経肥満モデルマウスの耐糖能異常、うつ・不安の改善効果、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 24 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

米澤理可、齋藤滋、エストロゲン中枢選択的投与の肥満・耐糖能・うつ改善効果に関する検討、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 18 日、熊本市現代美術館(熊本県・熊本市)

米澤理可、齋藤滋、閉経肥満モデルマウスにおけるエストロゲン末梢または中枢投与のうつ・不安状態に対する改善効果、第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、2013 年 5 月 11 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

米澤 理可 (YONEZAWA, Rika)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・産科婦人科学・助教

研究者番号：70649293

### (4)研究協力者

齋藤 滋 (SAITO, Shigeru)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・産科婦人科学・教授

研究者番号：30175351

和田 努 (WADA, Tsutomu)

富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)・病態制御薬理学・講師

研究者番号：00419334

鮫島 梓 (SAMEJIMA, Azusa)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・産科婦人科学・大学院生