

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461723

研究課題名(和文)回復するうつ病治療：治癒阻害因子から解明する脳神経回路網修復促進ストラテジー

研究課題名(英文) Study on the improvements of the damaged brain networks in refractory depression.

研究代表者

橋本 恵理 (Hashimoto, Eri)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30301401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：若年期コルチコステロン処置と胎生期アルコール曝露の二重ストレスによる難治性うつ病モデル動物を作製し、抗うつ薬の効果と血清BDNFレベルの変化を検討した。エスタロプラム投与によるうつ病様行動改善時には、血清BDNFの低下が認められた。また、飲酒問題を有するうつ病患者群では抗うつ薬治療による抑うつ症状の改善度が低いことが確認され、アルコールが治癒阻害因子として働くことが示唆された。更に、培養アストロサイトモデルであるC6細胞の生存/増殖率の低下がリゾホスファチジン酸受容体を介していることを示し、リゾホスファチジン酸がアストロサイトを介した脳回路網修復に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We produced depressive model rats by exposure of chronic corticosterone treatment and refractory depression model rats by alcohol exposure during the fetal period followed by the corticosterone treatment during adolescent. Treatment with escitalopram reversed depression-like behavior in refractory depression model accompanied by the reduction of BDNF levels in serum. We analyzed the influence of alcohol drinking on the therapeutic effects of antidepressants and evaluated that co-occurrence of major depressive disorder and alcohol use disorder is associated with a lower response to antidepressant treatment. We also investigated the effect of Lysophosphatidic acid (LPA) on the viability of rat C6 glioma cells and found that an LPA receptor antagonist, BrP-LPA, competitively blocked the LPA-induced reduction of C6 cell viability through LPA receptors. These findings support the hypothesis that LPA plays important roles in astrocyte-mediated brain network impairment.

研究分野：生物学的精神医学

キーワード：神経科学 脳・神経 精神疾患 うつ病 抗うつ薬 BDNF アルコール 難治性うつ病

1. 研究開始当初の背景

うつ病の3割は慢性化、遷延化しやすいともいわれ、必ずしも治りやすい疾患とはいえない。特に最近では治りにくいうつ病、すなわち難治例や再発例への対処が臨床場面での大きな課題となっており、「回復する」うつ病治療が求められている。したがって、治療を阻害する因子は何なのか、まずそれを明らかにし、さらに関連する分子病態の解明によって回復への糸口を探ることが有用と思われる。

我々はこれまでに抗うつ薬が脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor: BDNF) 等の栄養因子シグナルや転写因子の活性調節等を介して神経新生促進に働いていることを示し、神経幹細胞の活性化を介した神経回路網の修復・再生による治療に関する研究を進めてきた。また、アルコールが神経新生抑制作用を有し、抗うつ薬による神経新生促進を阻害することを明らかにしている。よって、本研究ではアルコールがうつ病の治療阻害因子として働く可能性に注目した。さらに、脳構造・脳機能の回復を目指すにあたっては、神経細胞のみならずグリアを含めた脳内回路網の再構築が重要となる。グリアの中でもアストロサイトは脳内で一番多い細胞であり、神経細胞の保持や栄養補給の他、シナプス形成にも積極的に関与する知見が近年集積されつつある。加えて、情動調節におけるアストロサイトの役割も注目されており、アストロサイト機能変化が治療阻害因子として働いている可能性があることに着目した。

2. 研究の目的

回復するうつ病治療のためのストラテジーを、治療阻害因子を確定することにより回復促進へ活かすという視点から組み立て、うつ病の神経新生異常に対する有用な治療応用へと結びつけることを目的とする。再生医療的アプローチによるダイナミックな脳神経回路網の修復・再構成を考える上で、特に治療阻害因子として、アルコールの神経新生抑制作用およびアストロサイト機能異常に着目し、神経回路網修復阻害/促進機構の解明をはかる。

(1) アルコール曝露による神経回路網障害を有する難治性うつ病モデルを用いて、抗うつ薬投与の効果解析を行い、行動異常の変化について検討する。

(2) アルコールがうつ病治療阻害因子として働いている可能性について、うつ病患者に対する抗うつ薬治療効果への飲酒状況の影響を解析する。

(3) 神経新生に関与することが知られている BDNF に関して、難治性うつ病モデルにおける血中 BDNF レベルの解析を行い、薬物治療反

応性予測を含めた生物学的マーカーとしての有用性を評価する。

(4) うつ病の治療機転には、グリア細胞を含む脳内ネットワークの再構築が重要と考えられ、C6細胞を用いて、情緒行動調節に重要な脳部位のアストロサイトに高発現することが知られているリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体 (LPA2R) を介した細胞生存/増殖率を検討する。

3. 研究の方法

(1) 難治性うつ病モデルの作製には、母体ラットとして Wistar 系妊娠ラットを用い、既に報告している胎児性アルコール・スペクトラム障害モデルラット作製と同様の方法で、胎生期 E10 から E13 にかけて妊娠ラット対して 1 日総量 6g/kg アルコールを 12 時間毎 2 回に分け、ゾンデを用いて経口強制投与した。出生仔は生後 4 週齢で離乳させ、生後 70 日から 90 日の 3 週間コルチコステロン 20 mg/kg 皮下注射を施行した。対照群は、母体に生理食塩水を経口投与して 1% tween 皮下注射を行った。通常うつ病モデルラット群は、母体に生理食塩水を経口投与してコルチコステロン 20 mg/kg 皮下注射を行って作製した。抗うつ薬の投与は、生後 70 日から 90 日にかけて、セルトラリン 10 mg/kg、エスシタロプラム 4 mg/kg をそれぞれ腹腔内投与した。コルチコステロン、治療薬の最終投与日および最終投与翌日に強制水泳試験を実施した。円柱状の水槽を用い、水位は 30cm とし、水温は 25 ± 1 に保持した。15 分間の予備試験を行い、翌日に 5 分の本試験を実施し、無動時間を測定した。

(2) 倫理委員会の承認を得て、書面にて同意を得たうつ病患者 (ICD-10: うつ病エピソードの診断基準を満たすもの) に対し、問題飲酒のスクリーニングに使用される AUDIT 質問票を用いて、抗うつ薬による治療前の時点で AUDIT12 点未満を飲酒問題のない群 (non-alcohol use disorder: NAUD)、12 点以上を飲酒問題のある群 (alcohol use disorder: AUD) とした。両群の治療前および抗うつ薬による治療中の飲酒状況を確認し、ハミルトンうつ病評価尺度 (HAM-D) を用いて、抗うつ薬の臨床効果への飲酒の影響を検討した。

(3) 難治性うつ病モデルおよび通常うつ病モデルにおいて、抗うつ薬処置前の時点で血液を採取し、ELISA 法によって血清 BDNF レベルの測定を行った。また、検索 (1) における抗うつ薬投与後の行動薬理的検索の後にも同様の方法で各群の血清 BDNF レベルを測定し、その変動について解析した。

(4) C6細胞より RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作製後、LPA1-6 に特異的なプラ

イマーにより PCR 反応を行い、LPA 発現を検討した。24 well プレートに C6 細胞を播種し、接着を確認後、血清不含 F-12K 培養液に置換した。翌日、血清不含 F-12K 培養液を交換後、各濃度の LPA を添加し、24 時間後に MTT assay を行い、C6 細胞の生存/増殖率を検討した。LPA、活性酸素の影響を検討した実験では、LPA 添加の 30 分前に各試薬を添加した。

4. 研究成果

(1) アルコール曝露による神経回路網障害を有する胎児性アルコール・スペクトラム障害モデルラットを利用して、胎児期と若年期の二重のストレスを組み合わせた難治性うつ病モデルラットを作製した。

行動薬理学的解析の結果、強制水泳試験において本モデルの無動時間は、通常のコルチコステロン投与によるうつ病モデル群よりも有意に延長した。抗うつ薬セルトラリンの単独投与により、通常のうつ病モデル群において無動時間の有意な短縮がみられたのに対し、難治性うつ病モデル群では、無動時間の変化は認められなかった。すなわち、このモデルは、通常のコルチコステロン投与によるうつ病モデルと比較して、症状は重篤で、抗うつ薬による治療反応性が悪いことが確認された。

この難治性うつ病モデルラットを用いて、抗うつ薬の治療的効果についてさらに詳細に検討したところ、抗うつ薬の種類によって、その反応性に違いがあり、エスシタロプラムではセルトラリンに比して無動時間の短縮がみられた。最近、一部の抗うつ薬でアルコール依存症治療における治療的有用性の報告がみられており、アルコールがうつ病治療阻害因子として働く可能性に着目して作製した本モデルにおけるこの結果と臨床効果との関連も考えられ、難治性うつ病に対する治療薬の反応性の予測に有用である可能性が示唆された。

(2) 次に、前述の難治性うつ病モデルにおいて認められた、アルコールがうつ病の治療阻害因子として働く可能性に関して、うつ病患者に対する抗うつ薬による治療の効果への飲酒状況の影響を検討した。

飲酒問題がないうつ病患者群では、抗うつ薬の服薬開始後 2 週目から HAM-D score の有意な改善がみられた。一方、飲酒問題がある群では服薬開始後 4 週までは有意な改善がみられず、抑うつ症状の改善に違いが認められた。また、服薬開始後 8 週と 12 週において、飲酒問題がある群では、HAM-D score が飲酒問題がない群より有意に高かった (図 1)。

よって、飲酒問題があるうつ病患者群では、抗うつ薬治療による抑うつ症状の改善度が低く、アルコールがうつ病治療阻害因子として働いていることが示唆された。

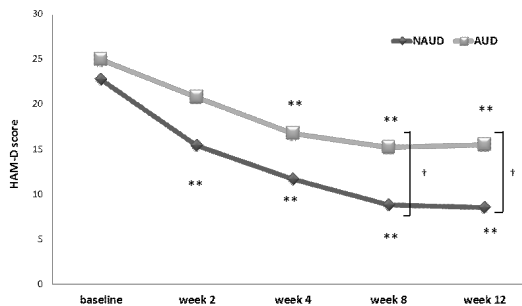


図 1 飲酒問題のある群 (AUD) と飲酒問題のない群 (NAUD) における抗うつ薬治療による HAM-D score

(3) うつ病患者では、血清 BDNF が低値であるとの報告が数多くなされているが、一方で側坐核や腹側被蓋野での BDNF 高値が抑うつ状態と関連していることも示唆されており、難治化したうつ病の病態において注目される場所である。そこで、次に、難治性うつ病モデルおよび通常のうつ病モデルにける血清 BDNF 値に関する検討を行った。

通常のコルチコステロン投与によるうつ病モデル群では、血清 BDNF 値は対照群と比べて有意に低下していた。一方、難治性うつ病モデル群では血清 BDNF 値は低下しておらず、両病態モデル間では血清 BDNF レベルに違いがみられた。

さらに、難治性うつ病モデル群において、エスシタロプラム投与により行動薬理学的解析で改善がみられた場合には、血清 BDNF の低下が認められたことから、難治性うつ病モデルでの症状改善の指標となり得ることが示唆された。

(4) うつ病の治療転帰には、神経細胞のみでなくグリア細胞を含む脳内ネットワークの再構築が重要である。これまでに脂質メディエーターのリゾホスファチジン酸 (LPA) シグナル伝達系の減弱がうつ病の治療機転に関与する可能性、及び、LPA が実験動物の情動行動変化を惹起することを確認している。LPA 受容体 (LPA2R) は情動行動調節に重要な脳部位のアストロサイトに高発現することから、本研究では、培養アストロサイトモデルとして用いられる C6 細胞において、LPA の作用を検討した。

C6 細胞の生存/増殖率は、LPA 添加により、濃度依存的に有意に低下した (図 2)。

そこで、この生存/増殖率の低下が LPA を介しているかを検討するため、LPA1-4 拮抗作用、LPA5 部分活性作用を有する BrP-LPA を前処置したところ、BrP-LPA の濃度依存的に LPA の作用が抑制された (図 3)。

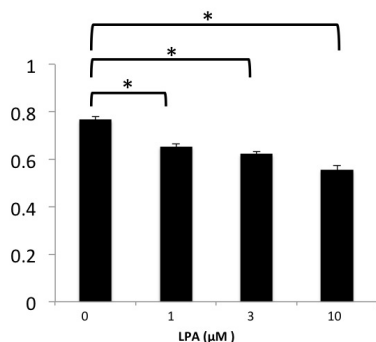


図2 LPA が C6 細胞生存/増殖率に与える影響
C6細胞培養液に各濃度のLPAを添加し、24時間後にMTT assayを行った。

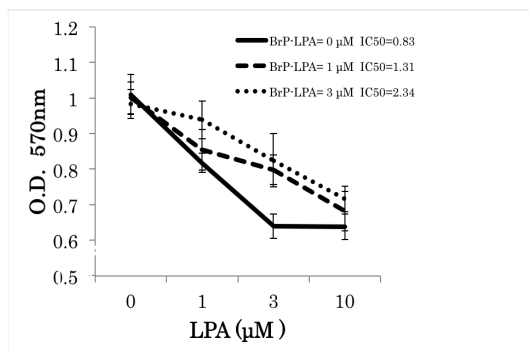


図3 LPAによる生存/増殖率の低下におけるLPA受容体の関与の検討
C6細胞培養液にBrP-LPA(1, 3 μM)を添加し、30分後に各濃度のLPAを添加した。24時間後にMTT assayを行った。

一方、LPAが活性酸素を産生するという報告があるため、抗酸化作用を有するアスコルビン酸を事前添加し実験を行った。その結果、アスコルビン酸は、LPAによる生存/増殖率の低下を有意に阻害することが明らかとなった。

これらの結果より、LPAによる情動行動変化の一部にアストロサイトの機構変化が関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

古瀬研吾, 木川昌康, 辻野華子, 石井貴男, 田山真矢, 鶴飼渉, 橋本恵理, 齋藤利和, 河西千秋. アルコール性障害が関与する難治性うつ病の病態基盤 - 血中・脳中BDNF値の変動解析から - アルコールと医学生物学. 査読無, 34巻, 2016, 29 - 30

木川昌康, 橋本恵理. 出生前のアルコール曝露. 臨床精神医学. 査読無, 45

巻, 2016, 309 - 313.

Hashimoto E, Tayama M, Ishikawa H, Yamamoto M, Saito T. Influence of co-morbid alcohol use disorder on treatment response of depressive patients. J Neural Transm. 査読有, 122, 2015, 301 - 306.

鶴飼渉, 木川昌康, 石井貴男, 古瀬研吾, 辻野華子, 岩本倫, 田山真矢, 白石将毅, 橋本恵理, 河西千秋, 齋藤利和. 胎児期アルコール曝露と成長後のストレスを組み合わせた難治性うつ病モデルにおける神経幹細胞移植療法の有効性. アルコールと医学生物学. 査読無, 33巻, 2015, 39 - 44.

〔学会発表〕(計14件)

後藤玲央, 山田美佐, 橋本恵理, 鶴飼渉, 山田光彦: Lysophosphatidic acidはラットC6グリオマのネクロシスを誘導し生存率を低下させる. 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学大会, 2016年9月8日~10日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Furuse K, Tsujino H, Kigawa Y, Tayama M, Ukai W, Ishii T, Iwamoto T, Shiraishi M, Kobayashi S, Hashimoto E, Kawanishi C: Pathological analysis of refractory depression using fetal alcohol and adolescent corticosterone double stress model. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, 2016 July 3-5: Seoul (Korea)

Ukai W, Fueuse K, Kigawa Y, Tsujino H, Ishii T, Tayama M, Iwamoto T, Shiraishi M, Kobayashi S, Hashimoto E, Kawanishi C: Amelioration of treatment-refractory depression with intravenous stem cells: potential actions of boosting the anti-depressant effect. The International College of Neuropsychopharmacology Thematic Meeting on Stress, Inflammation and Depression, 2015 June 4-6: Dublin (Ireland)

Ukai W, Furuse K, Kigawa Y, Tsujino H, Ishii T, Tayama M, Iwamoto T, Shiraishi M, Inoue K, Kobayashi S, Hashimoto E, Kawanishi C. Stem cell therapy: a regenerative approach for refractory psychiatric diseases. In: (Symposium): Alcohol and Disease: Mechanism and Control. In: Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology International

Conference 2015: 2015 May 12-14: Seoul
(Korea)

Ukai W, Kigawa Y, Hashimoto E, Ishii
T, Furuse K, Tsujino H, Saito T. Stem
cell therapy as a candidate treatment
approach for neural plasticity change
in alcohol- induced brain damage and
depression. 29th CINP World Congress:
2014 June 22-24: Vancouver (Canada)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 恵理 (HASHIMOTO, Eri)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 3 0 3 0 1 4 0 1

(2)研究分担者

山田 美佐 (YAMADA, Misa)
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究
センター・精神保健研究所 精神薬理研究
部・科研費研究員
研究者番号： 1 0 3 8 4 1 8 2

鵜飼 渉 (UKAI, Wataru)
札幌医科大学・医療人育成センター・准教
授
研究者番号： 4 0 3 8 1 2 5 6