

# 博士學位申請論文

博士學位申請論文名

*In vitro* および *in vivo* におけるデキサメタゾンによるうつ病発症機構の解明

博士學位申請者氏名 寺田 一樹 (印)

(日本語訳)

(平成 26 年 3 月 3 日提出)

博士論文 平成 25 年度

*In vitro* および *in vivo* における  
デキサメタゾンによるうつ病発症機構の解明

福岡大学大学院薬学研究科

寺 田 一 樹

# 目次

緒言	・・・ 1
第 1 章 <i>in vitro</i> における検討	・・・ 5
1-1 WST-1 を用いた DEX 曝露による細胞生存率の検討	・・・ 7
1-2 NGF および DEX 添加による突起伸展の検討	・・・ 8
1-3 DEX 前曝露における NGF 依存性 Akt および ERK1/2 の活性化の検討	・・・ 11
1-4 Glucocorticoid receptor 阻害剤 RU38486 による検討	・・・ 13
1-5 DEX 誘起性突起伸展抑制における 抗うつ剤 Fluvoxamine を用いた検討	・・・ 16
1-6 小括	・・・ 18
第 2 章 <i>in vivo</i> における検討	・・・ 20
2-1 DEX 持続注入マウスによる自発運動試験における検討	・・・ 23
2-2 DEX 持続注入マウスによる強制水泳試験における検討	・・・ 25
2-3 DEX 持続注入マウスによる 抗うつ剤 Fluvoxamine を用いた検討	・・・ 27
2-4 小括	・・・ 32
総括と展望	・・・ 33
謝辞	・・・ 35
引用文献	・・・ 36

## 緒言

日本ではこれまで15年間にわたり自殺者数が毎年3万人を超えており、その原因の第1位がうつ病である。国や自治体でのうつ病患者らへの自殺予防策が一定の成果を上げ平成24年度において3万人を下回ったが、現在うつ病等の気分障害の総患者数は、20年前に比べ3.4倍に増加し250万人を超える<sup>1)</sup>。うつ病対策は自殺対策においても未だ中核にある。このよううつ病は深刻な社会問題であり、対策に必要とする福祉や医療費は国庫を圧迫し続け、今後の対応が危惧されている。予防医学の観点からもうつ病対策の重要性が問われている。

うつ病の病態研究では、治療薬である三環系抗うつ薬の神経終末でのモノアミン再取り込み阻害作用や死後脳を用いた研究から、うつ病はモノアミン欠乏による生化学的異常であって神経解剖学的異常はないとされてきた。しかし、脳機能画像解析研究が著しく進歩し、MRIによるうつ病患者の脳解析から海馬の萎縮が相次いで報告され<sup>2,3)</sup>、神経解剖学的異常はないという従来の定説が覆されようとしている。その一方で、抗うつ薬の新しい作用として、脳由来神経栄養因子 (BDNF) や神経新生の増強作用が見いだされ<sup>4)</sup>、これらの作用により神経細胞に生じた障害を修復し抗うつ効果を示すという新たな機構が提示されている。しかし、これらうつ病における神経障害やその誘導メカニズムは不明な点が多く、それらを解明するための体系的なスクリーニング系の開発が強く望まれている。

うつ病の発症要因については、ストレス性の刺激がうつ病発症に深く関与するとされている。ストレス性の刺激に対する共通の生体防御システムが視床下

部—下垂体—副腎皮質系 (HPA系) にあるが、うつ病患者ではこの系に高率で異常が検出される<sup>5)</sup>。この防御系はグルココルチコイド受容体を介したフィードバック機能による閉鎖系であり、ストレス性の刺激に対するHPA系の反応が過剰とならないよう調節されている。デキサメタゾン (DEX) 投与後、副腎皮質刺激ホルモン遊離促進ホルモン (CRH) 注射を行うDEX/CRH 負荷試験にて合成ステロイドのDEXを投与後、内分泌されたコルチゾール濃度が測定され、健常者ではフィードバック反応によりコルチゾール分泌反応はほとんど起こらないが、うつ病患者では約75%にコルチゾール濃度の顕著な増加が認められ、フィードバック機能が低下することが示された<sup>6)</sup>。これに対し、抗うつ薬療法が奏功すると、コルチゾールの過剰反応はほぼ正常化することから、フィードバック機能の低下がストレスに誘発されるうつ病発症の要因の一つと考えられている。

一方、ストレス研究の先駆者Hans Selyeは心理的ストレスが与えられた際に上昇するグルココルチコイド自身が有害な事象を引き起こすことを提唱している<sup>7)</sup>。また、本邦の厚生労働省によって重篤副作用疾患別対応マニュアル「薬剤誘起性うつ病」が作成され、医薬品のなかでも特に副腎皮質ステロイド薬剤の使用によって高頻度とうつ症状が発症すること、また、その対応と予防の重要性が述べられている<sup>8)</sup>。しかし、その発症要因と有用な抗うつ薬についてはいまだエビデンスに乏しい旨についても記載されている。これらの報告からグルココルチコイドとうつ病の発症には強い相関性が存在していることが明らかである。また、他の研究においても、慢性ストレス負荷やグルココルチコイド投与が海馬歯状回での神経新生が抑制する報告や<sup>9)</sup>、グルココルチコイドが海馬錐体細胞の樹状突起の萎縮を引き起こすことが分かっている<sup>10)</sup>。また、血中のコルチゾー

ル濃度と海馬萎縮には負の相関がみられることやうつ病の病態として海馬の神経細胞障害による機能障害が存在することから<sup>11,12)</sup>、グルコルチコイドが神経細胞に与える影響がステロイド誘起性うつ病の発症メカニズムに重要であると考えられる。従って、これらストレスやステロイド投与後のうつ病発症の機構解明は、他のうつ病発症の予防・治療にも大きな意義があると考えられるが、発症に関連するシグナル伝達系の体系的な構造の解明は、未だなされておらずそれらを評価し得るステロイド性うつ病モデルの存在が望まれている。

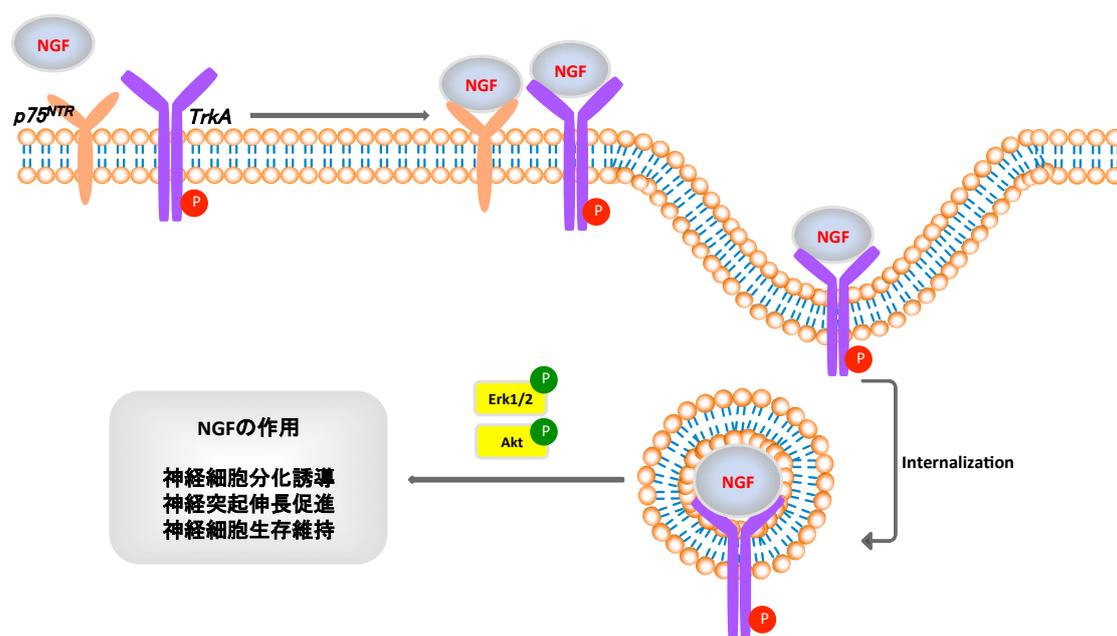
うつ病のメカニズムが未解明の中、うつ病治療薬のスクリーニングには*in vivo* 行動薬理学的手法が必須である。しかし、最近ではBDNFの発現を指標とする*in vitro*系も提唱されるようになった。治療薬の多い本領域では、*in vitro*と*in vivo*活性、さらに治療薬間の相関性を体系的に統合することにより、うつ病発症機構の解明にあらたな進展が期待される。

そこで本研究では、これらステロイド誘起性うつ病に着目し、これら発症機序の解明を目的として臨床において白血病治療や臓器移植後の拒絶反応の抑制などに用いられ、またその副作用としてうつ様症状の発症が明らかとなっている合成グルコルチコイドのデキサメタゾン<sup>13)</sup>を用いた*in vitro* および *in vivo*実験モデルの構築を試みた。*in vitro*実験においては、うつ病の発症や治療において近年注目されている神経新生や神経可塑性説について培養神経様細胞における「神経突起の伸展」を指標とし、DEXの曝露による影響を検討した。また、これらに関与する作用機構と*in vivo*実験モデルに対する有用な作用マーカーについて探索を行なった。次に*in vivo*実験としてマウスへのDEXの持続投与による影響を「行動試験」によって検討を行なった。行動試験には自発運動試験による

日内リズムの変動を観察し、またうつ病のスクリーニング試験として用いられている強制水泳試験による評価を行なった。これら両モデルで得られた結果を基にDEXによるステロイド誘起性うつ病についてそのメカニズムを探索するとともに、本研究におけるDEXモデルの有用性と今後の展望について考察した。

## 第1章 *in vitro*における検討

*In vitro*実験モデルとして神経系モデルの研究に用いられているラット副腎由来褐色細胞腫のPC12細胞<sup>14, 15, 16)</sup>を用いた。PC12細胞は神経成長因子 (NGF) を作用することで神経細胞様に神経突起を伸展することが知られている<sup>17)</sup>。また、NGFの受容体にチロシンキナーゼ受容体TrkAと非酵素的受容体p75<sup>NTR</sup>の存在が知られ、とくにTrkAはp75<sup>NTR</sup>に比べNGFと高親和性を示すとされ<sup>18)</sup>、また、NGFが結合したTrkAは細胞内ドメインの多くのチロシン残基を自己リン酸化して細胞内へと移行するが、これらがNGFのシグナル伝達にとって必須であることが知られている<sup>19)</sup>。その後、細胞内へと移行したTrkAはPhosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) やRasなどのシグナルの活性化を引き起こすことが明らかとなっている<sup>20, 21)</sup>。また、神経細胞において、神経生存や軸索伸長にNGF-TrkAによるシグナルがトリガーとして働いているといわれ、一方p75<sup>NTR</sup>経路のシグナルによってこれらは拮抗され、ニューロンのコネクションなどについて神経の新生が行なわれていると考えられている<sup>22)</sup>。同様にPC12細胞においてもNGFの刺激によってシグナルの活性化 (PI3K, Ras) を伴う分化や神経突起の伸展が引き起こされることが知られ、これらシグナル経路の下流であるAktやERK1/2の活性化が突起伸展において重要な反応経路であることが明らかとなっている<sup>23)</sup> (Figure 1)。



**Figure 1. NGF による TrkA の自己リン酸化とその作用**

一方、高濃度のグルココルチコイドはPC12細胞においてアポトーシスを導くとの報告や<sup>24)</sup>、グルココルチコイドの併用はNGFのTrkAに対する親和性を低下させるとの報告がなされ<sup>25)</sup>、神経細胞に対するグルココルチコイドの関与が明らかとなっている。しかし、いまだこれらが引き起こされるメカニズムについては不明な点が多い。また、NGFとの相互作用やNGF受容体への作用についての報告はなされているが<sup>26)</sup>、突起伸展に関わるNGF依存性のシグナル経路へのグルココルチコイドの影響は明らかとされていない。

そこで本*in vitro*実験モデルとして、第一にPC12細胞における突起伸展についてNGFおよびDEXを添加した際のその効果について評価と条件検討を行なった。また、これらで得られた結果をもとにNGFおよびDEXが突起伸展に関連する細胞内シグナルへの影響を探索し、*in vitro* DEXモデルとして有用となるマーカーの発見を試みた。

## 1-1 WST-1を用いたDEX曝露による細胞生存率の検討

DEXがPC12細胞の分化や増殖に対して影響を与える可能性を鑑みて、DEX添加後のPC12細胞における細胞生存率を各濃度において検討した。また、DEXの長期間の曝露は細胞生存率を低下させるとの報告があることから<sup>24)</sup>、その曝露時間を24時間と固定した。

### 試薬

デキサメタゾン (dexamethasone sodium phosphate) はWakoより入手し、蒸留水で溶解、希釈し用いた。

### 細胞培養

PC12細胞はRiken Cell Bankより購入した。PC12細胞はDulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco) に10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco-BRL), 1% (v/v) penicillin-streptomycin mixed solution (Nacalai Tesque) を混入した培地を増殖用および試験用に用いた。増殖時にはプラスチックディッシュ (SUMILON) に播種し、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター、37°Cの条件で培養を行なった。

### WST-1

PC12細胞を96-well plateにそれぞれ $1.0 \times 10^4$  cell/well播種し、10% FBS添加培地を用い、5% CO<sub>2</sub>、37°Cで24時間培養した。その後それぞれのwellに10% FBSを用い、DEX最終濃度が0.01, 0.1, 1.0, 10.0  $\mu$ Mになるように調製し、5% CO<sub>2</sub>、37°Cで

24時間インキュベートした。コントロールには滅菌水（最終0.1% v/v）を用いた。各wellにCell Proliferation Reagent WST-1を10  $\mu$ Lずつ入れ、4時間インキュベートし、マイクロプレートリーダーを用い波長450 nmで吸光度を測定し、コントロールにおける吸光度（生存率）を100%とした(Figure 2)。

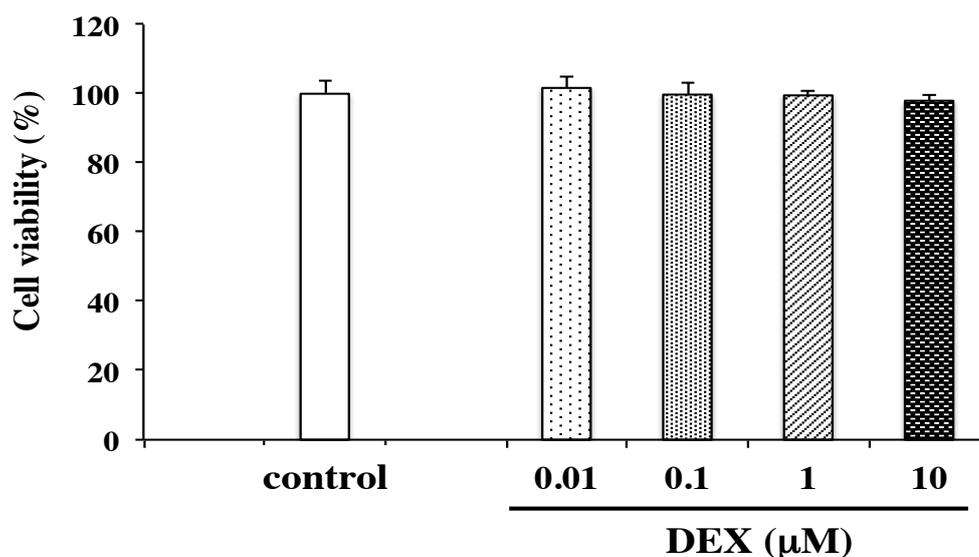


Figure 2. DEX の 24 時間曝露における PC12 細胞の生存

PC12細胞への24時間のDEX曝露の結果、各濃度において有意な細胞生存率の変化はみられなかった(Figure 2)。しかし、10.0  $\mu$ Mにおいては若干の減少がみられ、細胞生存または増殖への影響が考えられた (Figure 2)。従って、これ以降のDEX曝露について1.0  $\mu$ Mにて検討を行なうこととする。

#### 1-2 NGFおよびDEX添加による突起伸展の検討

PC12細胞はNGFの添加により分化し神経様細胞となり突起を伸展することから神経系のモデルとして様々な研究に利用されている。先行研究によってそ

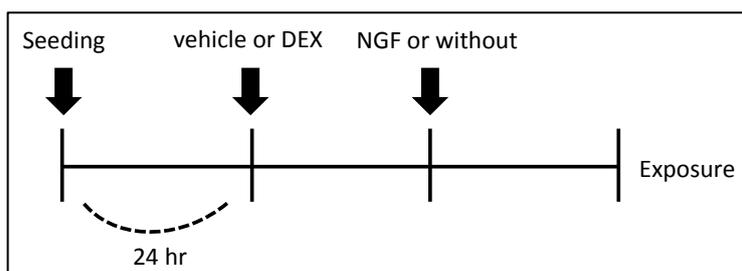
のグルココルチコイドとNGFとの同時添加により突起の伸展が抑制されるとの結果が示されている<sup>27)</sup>。本検討では、これらに改良を加え、あらかじめPC12細胞にデキサメタゾンの曝露 (1  $\mu$ M) を24時間行い、その後デキサメタゾンを取り除いた前曝露の後にNGFを添加しさらに24時間後の突起伸展について検討した。

## 試薬

NGF (mNGF 2.5S mouse submaxillary glands) はAlomone Labsより入手し、蒸留水で溶解、希釈し用いた。

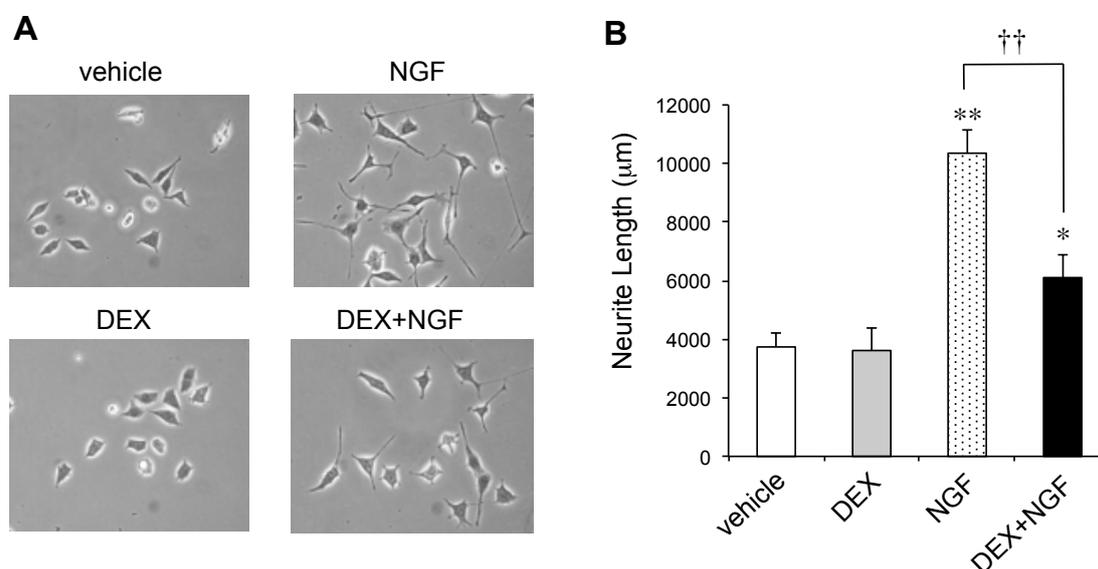
## 細胞培養

試験時には、I型コラーゲンコートディッシュ (IWAKI) にそれぞれ $1 \times 10^5$ 細胞ずつ播種し試験を実施した。24時間の培養後、DEX (1  $\mu$ M) またはvehicle (10% FBS DMEM/F12) 培地に交換し24時間のインキュベーションを行なった。その後、5% FBS DMEM/F12にNGF (50 ng/mL) を処理または未処理した培地へ交換しその24時間後の突起伸展について測定を行なった。これらのプロトコールについて下記に示す。



## 突起伸展

NGF添加24時間後におけるPC12細胞について、各ディッシュにつき位相差顕微鏡下 (ECLIPSE TS100; Nikon)で5視野 (10-20cell/field) をランダムに撮影を行った (Digital Sight DS-L2 system; Nikon) (Figure 3A)。得られた画像をNeurocyte Image Analyzer Software (Kurabo) によってその突起伸展 (total neurite length) を解析し、ディッシュごと5視野の平均値をとり各群の突起伸展の値とした (n=3)。



**Figure 3. PC12 細胞における DEX および NGF 添加による突起伸展への影響**

突起伸展の解析から、NGF 50 ng/mLを添加 (NGF) することで未処理 (vehicle) に比して約280%の有意な突起伸展 (neurite length(μm)) がみられた (Figure 3B)。しかし、これらに対してDEXの前処理 (DEX + NGF) によってNGF添加による突起伸展が有意に抑制された (42%減) (Figure 3B)。また、NGF未添加 (vehicle, DEX) ではその突起伸展には差がみられなかったことから、DEXはPC12細胞におけるNGF依存性の突起伸展を抑制することが確認された。

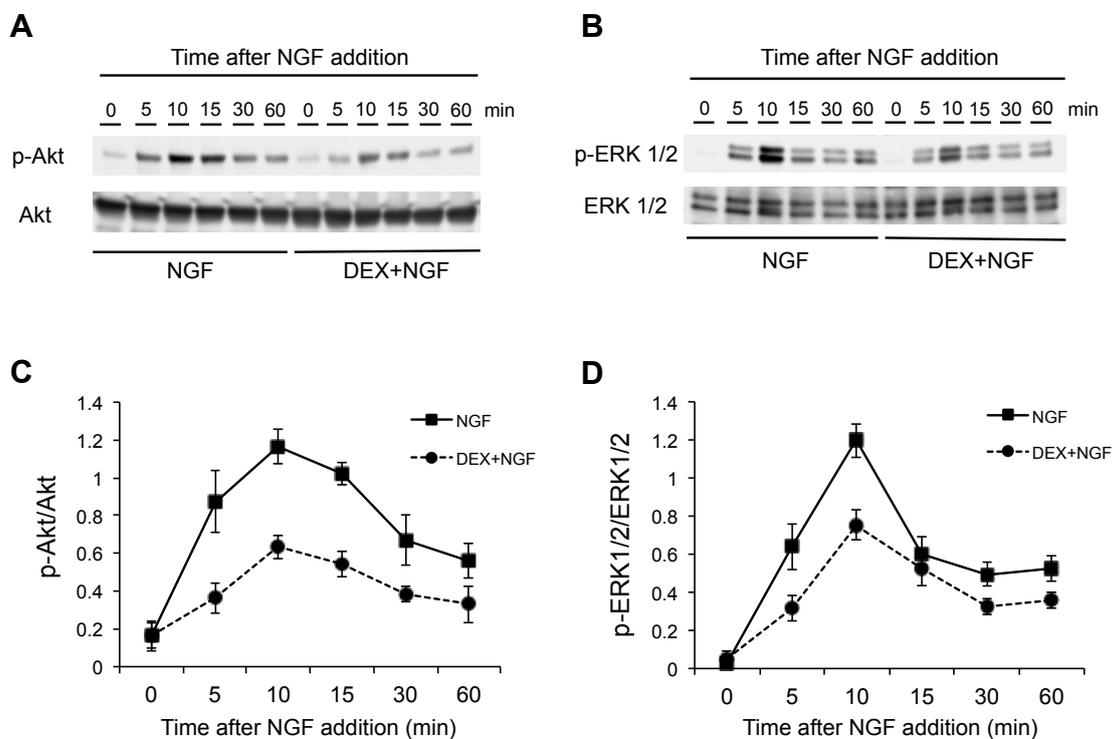
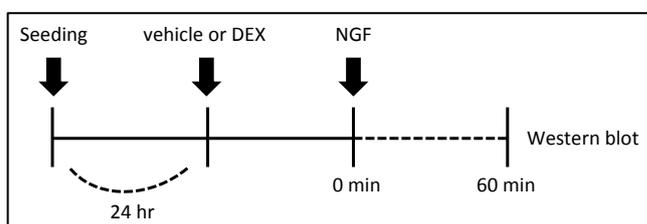
### 1-3 DEX前曝露におけるNGF依存性AktおよびERK1/2の活性化の検討

DEXの前曝露によりNGF依存性の突起伸展の抑制が確認された。PC12細胞において、NGFの刺激によってAktおよびERK1/2が活性化され突起の伸展が促進されることが明らかとされていることから、これら両シグナルのDEX曝露における影響を検討した。

#### Western Blotting Analysis

PC12細胞は、I型コラーゲンコートディッシュ (IWAKI) にそれぞれ $1 \times 10^5$ 細胞ずつ播種し試験を実施した。24時間の培養後、DEX (1  $\mu$ M) またはvehicle (10% FBS DMEM/F12) 培地に交換し24時間のインキュベーションを行なった。その後、5% FBS DMEM/F12にNGF (50 ng/mL) を処理した培地に交換し、NGF添加後の各時間 (0, 5, 10, 15, 30, 60 min) において細胞を回収した。これらの薬剤添加プロトコールについては下記に示す。回収した細胞は、PathScan Sandwich ELISA Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) により可溶化し、遠心分離により残渣を取り除いた。回収した上清をBicinchoninic Acid (BCA) Assay Kit (Pierce) によりタンパク濃度を測定し、各サンプルのタンパク濃度を均一化した。その後、Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gelsを用いて電気泳動を行ない、Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranesへ転写した。転写されたPVDF membraneを5% bovine serum albumin (Wako) を溶解したTBS containing 0.1% Tween-20 (TBST) で室温1時間ブロッキング処理を行なった。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識2次抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) で室温1時間処理し、ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出を行なっ

た。また、各バンドのdensityをImageJ (National Institutes of Health) によって数値化した。1次抗体については、anti-phospho-Akt (p-Akt) antibody (Ser473; Cell Signaling Technology), anti-Akt antibody (Cell Signaling Technology), anti-phospho-ERK1 (T202/Y204)/ERK2 (T185/Y187) (p-ERK1/2) antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and anti-ERK1/ERK2 antibody (R&D Systems) を用いた。



**Figure 4. NGF による Akt および ERK1/2 活性と DEX 曝露の影響**

Western blotting により NGF 添加による Akt および ERK1/2 protein の活性化を解析した。PC12 細胞は NGF の添加、または 24 時間の DEX 曝露後の NGF の添加における各時間 (0-60 min) の細胞において Akt のリン酸化は NGF 添加後 10 min をピークに上昇し、その後 60 min まで徐々に減少した (Figure 4A)。DEX 群における Akt の活性化は同様のカーブを描き、すべての時間において Akt 活性化の減少がみられた (41%-59% 減) (Figure 4C)。また、ERK1 and ERK2 のリン酸化においても p-Akt 同様に NGF 添加後 10 min をピークに上昇し、その後 60 min まで徐々に減少した (Figure 4B)。DEX 群では、特にピーク時に ERK1/2 活性化の減少がみられた (約 33%減) (Figure 4D)。これらの結果から DEX は PC12 細胞における NGF 依存性の Akt および ERK1/2 の活性化を抑制することが明らかとなった。DEX 誘起性の突起伸展抑制はこれらシグナルの阻害が影響していると示唆された。

#### 1-4 Glucocorticoid receptor阻害剤RU38486による検討

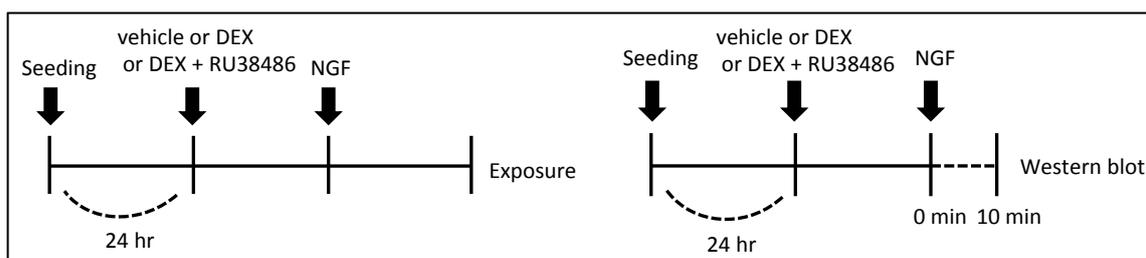
DEXがNGF依存性の突起伸展およびこれらに関わるシグナルであるAktおよびERK1/2の活性化を抑制することが明らかとなった。そこで作用経路として、DEXはglucocorticoid receptor (GR) のagonistであることからこれらの阻害剤であるRU38486を併用した際のその効果について検討を行なった。

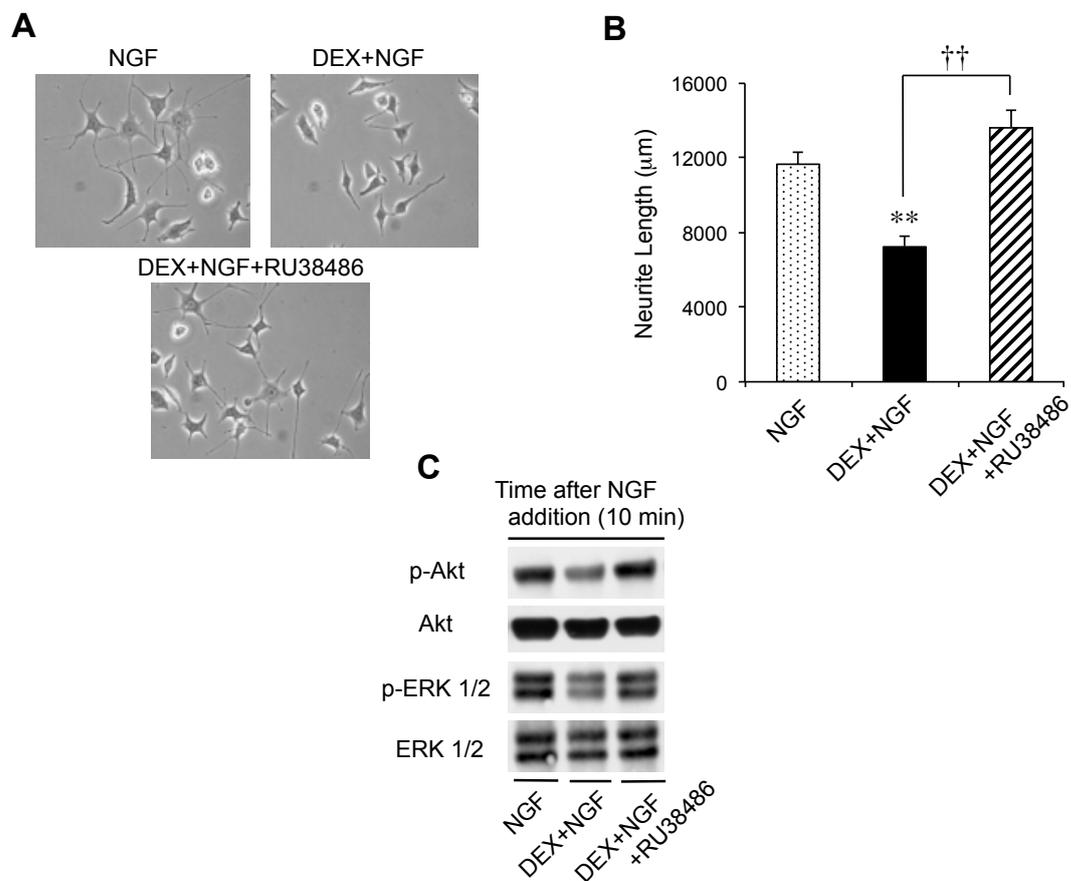
#### 試薬

RU38486はSigma-Aldrichより入手し、ethanolで溶解、希釈し用いた。

## 細胞培養

I型コラーゲンコートディッシュ (IWAKI) にそれぞれ $1 \times 10^5$ 細胞ずつ播種し試験を実施した。24時間の培養後、vehicleまたはDEX (1  $\mu$ M) またはDEX (1  $\mu$ M) とRU38486 (2  $\mu$ M) を同時添加した (10% FBS DMEM/F12) 培地に交換し24時間のインキュベーションを行なった。その後、5% FBS DMEM/F12にNGF (50 ng/mL) を処理した培地へ交換しその24時間後の突起伸展について測定を行なった。さらに、western blotによりAktおよびERK1/2活性化をそのピークであるNGF添加後の10 minについてサンプル調製を行なった。





**Figure 5. DEX 誘起性の突起伸展抑制および Akt, ERK1/2 の活性化阻害における RU38486 の効果**

DEX曝露によるNGF依存性の突起の伸展に関して、DEXに加えてさらにRU38486 (2 µM) を同時添加した際のその効果についてNGFの添加24時間後の突起伸展について解析した (Figure 5AB)。その結果、DEXによる突起伸展の抑制がRU38486の併用により有意にNGF単独処理とほぼ同等のレベルまでに突起を伸展させていた。GRの阻害によりDEXの効果が消失したことから、DEX誘起性の突起伸展抑制はGRを介し引き起こされることが明らかとなった。続いて、DEXによるNGF依存性のAkt およびERK1/2活性化の抑制についてRU38486を併

用した際の効果について検討した。その結果、DEXによって阻害されたAktおよびERK1/2の活性化は両シグナルともにRU38486の併用によりNGF単独処理とほぼ同等のレベルへの改善がみられた (Figure 5C)。これらからDEXによるNGF依存性のAkt およびERK1/2 活性化の阻害はRU38486の併用によって改善することからGRを經由していることが明らかとなった。

#### 1-5 DEX誘起性突起伸展抑制における抗うつ剤Fluvoxamineを用いた検討

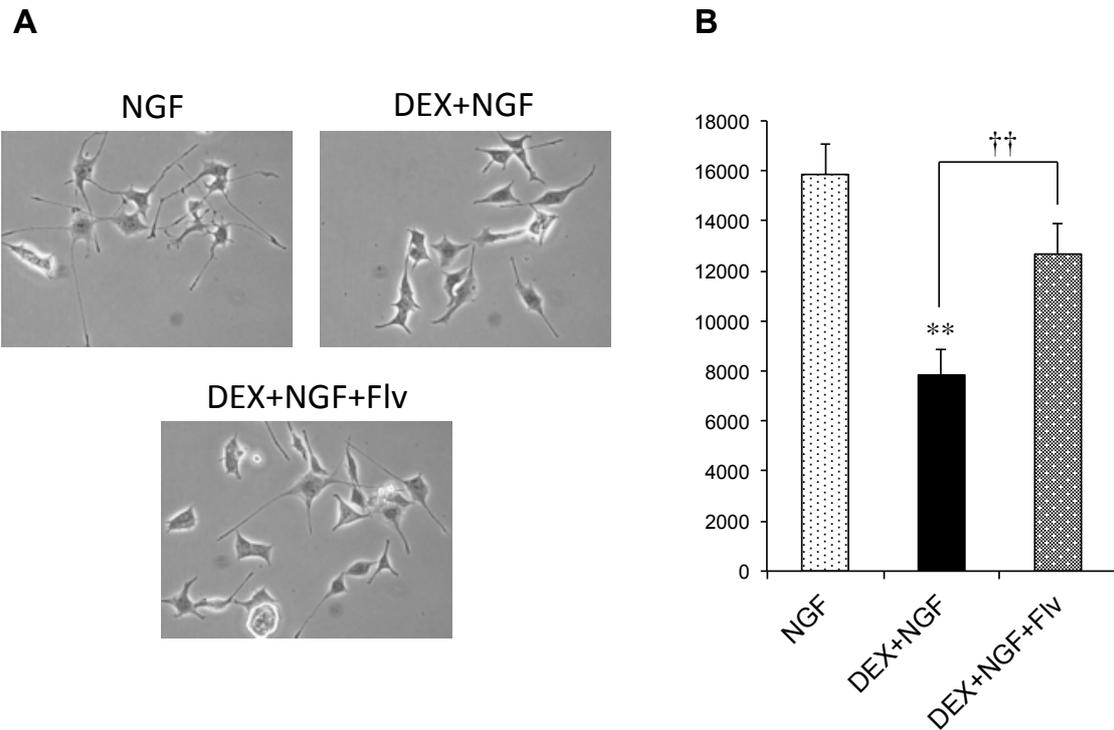
これまでの結果からDEXによる突起伸展抑制モデルにおいて、これらの反応とうつ状態の関係について抗うつ薬であるフルボキサミン (Flv) を併用し、その効果から本モデルのうつ病病態モデルとしての有用性について評価した。

#### 試薬

FluvoxamineはSigma-Aldrichより入手し、ethanolで溶解、希釈し用いた。

#### 細胞培養

I型コラーゲンコートディッシュ (IWAKI) にそれぞれ $1 \times 10^5$ 細胞ずつ播種し試験を実施した。24時間の培養後、vehicleまたはDEX (1  $\mu$ M) またはDEX (1  $\mu$ M) とFlv (1  $\mu$ M) を同時添加した (10% FBS DMEM/F12) 培地に交換し24時間のインキュベーションを行なった。その後、5% FBS DMEM/F12にNGF (50 ng/mL) を処理した培地に交換しその24時間後の突起伸展について測定を行なった。



**Figure 6. DEX による突起伸展抑制に対するフルボキサミンの効果**

DEXによるNGF依存性の突起伸展抑制と、DEXに加えてさらにFlv (1  $\mu$ M) を同時添加した際のその効果についてNGF添加の24時間後において突起伸展を解析した (Figure 6AB)。その結果、DEXによる突起伸展の抑制はFlvの併用により有意に改善された。しかし、DEX未処理に比べ若干の減少傾向がみられ完全には改善されないことからFlvはDEXの阻害機構とは異なる作用機序によって改善効果を引き起こしている可能性が考えられた。

## 1-6 小活

本章では神経様細胞PC12のNGF依存性の突起伸展について、DEX曝露による影響を検討した。先行研究においてこれまでDEXは、NGFおよびそれらのレセプターに対して影響を与えることでその突起伸展を抑制すると考えられていた<sup>25, 26, 27)</sup>。しかし、我々はDEXを曝露した後それらを取り除いた上でNGFを添加し、NGFに対する直接的な作用を無視できる条件による検討を行なった。その結果、DEXの前曝露は、NGF添加時に非存在下にもかかわらずNGF依存性の突起伸展を抑制した。さらに、突起伸展関連シグナルにおいて特に重要とされるAktおよびERK1/2の活性化がDEXによって阻害されることが本条件によって明らかとなった。また、これらの機構としてGRを経由した作用であることが確認され、これはDEXの作用にタイムラグがあることを示唆していることから今回の発見は、DEXを前曝露した本条件によって初めて明らかとなったと考えられる。さらに、うつ病モデルとしての有効性を確認するために現在うつ病の第一選択薬となりつつあるSSRIを用いてその効果を検討した。本モデルにおいてDEXによって抑制された突起伸展はFlvの添加により改善された。これらの結果からDEXの突起伸展に対する効果は可逆的な作用または特定の経路のみの阻害であることが推察され、Flvはその抑制を完全には改善していないことからDEXとは異なる経路によってAktおよびERK1/2の活性化を改善していることが考えられた。また、これらうつ病治療において薬剤の服用開始から症状の改善までに数週間かかるといわれる問題において本結果が関与している可能性が考えられた。以上の結果から、ステロイド誘起性の突起伸展抑制と新たな分子マーカーをもつ*in vitro*実験モデルを構築したと考えられた。本実験モデルにおける神経突起の伸展・

退縮等の神経可塑性の変化は、うつ病の治癒機転において重要な分子メカニズムの1つとして考えられた。

## 第2章 *in vivo*における検討

抗うつ薬開発の歴史は、1950年代に結核治療薬として開発された iproniazid や、抗ヒスタミン剤として開発されたイミプラミンに抗うつ作用があることが発見されたことから始まった<sup>28)</sup>。また、抗うつ薬の開発とともに、その作用機序を通してうつ病の病態メカニズムを明らかにしようとする研究が進められてきた。近年注目されている機序の一つが、海馬神経新生 (ニューロジェネシス) の促進作用である。古典的には成体脳では新たに神経細胞は作られないと考えられてきたが、海馬歯状回の顆粒細胞下や脳室上衣下などの領域において成体脳でも神経細胞が活発に新生されることが近年明らかになってきている<sup>29)</sup>。この事実は、従来考えられてきた「固定された神経ネットワーク内での神経可塑性」とは異なる、「新たなネットワークが付加される可塑性」を意味し、脳の働きについて神経細胞新生という現象を加味して再考する必要性があると考えられている。

神経新生と抗うつ効果の関係において、うつ病の一つの側面を示すといわれる学習性無力感 (**learned helplessness**) を示すモデル動物で、これらの海馬における新生細胞数が減少していることが確認され、また、抗うつ薬の慢性投与によってこれらが回復するとの報告がなされている<sup>30)</sup>。加えて **learned helplessness** を示した行動が改善されたものにおいては神経細胞数が回復され、行動が改善されなかったものは新生神経細胞数が減少したままであったことが明らかとされている<sup>30)</sup>。また、X線照射によって神経新生を阻害するとうつ様行動における抗うつ薬の効果が消失することが示され<sup>31)</sup>、うつ様行動の発症・改善には海馬

神経新生を要することが明らかとなっている。

一方、うつ病患者においては高率で血中コルチゾール値の上昇と、さらに海馬の萎縮がみられ、またクッシング症候群の患者においても海馬の萎縮が確認されている。さらに、副腎腫瘍を切除してクッシング症候群が治癒すると血中コルチゾールの正常化に伴い海馬の体積も正常化することが報告されていることから<sup>32)</sup>、うつ病の発症においてグルココルチコイドによる脳内での神経新生への関与が重要であることが考えられる。しかし、グルココルチコイドによる神経新生の抑制とそれらがうつ様行動を引き起こすとの作用を包括的に評価できる有用なモデルは報告されていない。また、既存のうつ病病態モデルとして、*Disc1* 遺伝子アミノ酸置換変異マウスに代表される変異マウスや、嗅球摘出モデル、恐怖条件付けマウスなどによる抗うつ効果のスクリーニングが行われているが、これらには特別な技術や施設が必要である点や、特殊な条件で誘起される症状のためその行動とうつ病病態に必ずしも相関しない、といった点も指摘されている。従って、ステロイドによる薬剤性のうつ病病態を示し、かつそれらを簡便に評価し得るモデルを作製することは今後の抗うつ薬開発やうつ病病態の解明に意義があると考えられる。そこで、我々はすでに第 1 章においてグルココルチコイドである DEX によって神経新生が抑制されるモデルの作製に成功しており、これら抑制の評価を可能にするマーカーを発見した。本章ではさらに DEX をマウスへ慢性的に投与することによって引き起こされる影響について、うつ病のスクリーニング試験に不可欠とされる強制水泳試験によって評価を行なった。さらに、行動量における日内変動についても検討を行なった。DEX によるこれら行動試験の結果と、さらに抗うつ薬である *Fluvoxamine* を併用した

際はその効果により DEX 投与によるうつ様行動誘起の有無について評価した。

## 2-1 DEX持続注入マウスによる自発運動試験における検討

DEXの持続的な投与によるマウスの行動量に対する影響を強制水泳試験により評価を行なった。マウスは夜間（活動期）に2相性の運動（19:00-1:00、4:00-7:00）増加を示し、昼間はほとんど運動しないリズムを有している。また、抗原などを感作することでうつ状態を誘起させた動物モデルなどは、この活動期における自発運動量が低下するとの報告がある<sup>33)</sup>。

本研究におけるDEX投与については、マウスは人間に比べ短時間で薬物が代謝されてしまうため恒常的な体内での高コルチゾール状態を再現するために浸透圧ポンプをマウスに埋め込むことによるDEXの持続注入を行なった。

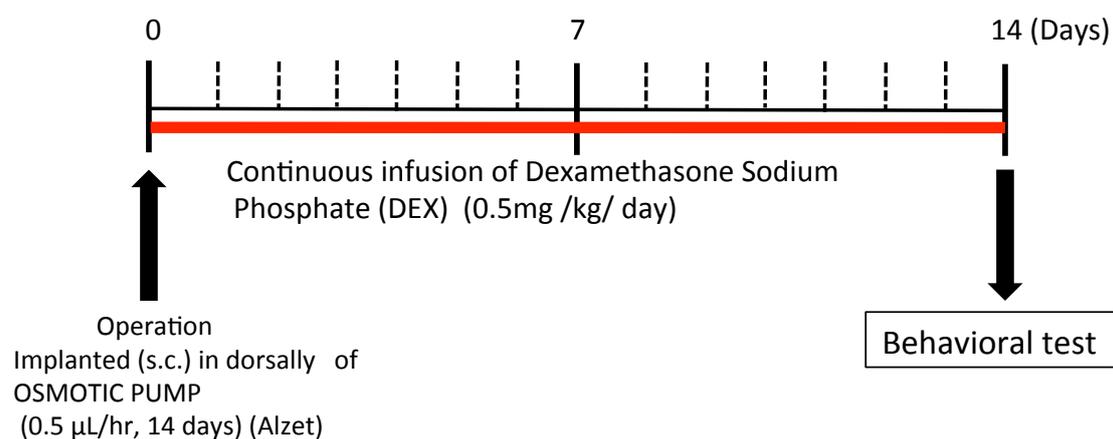
### 実験動物

実験には5週齢の ddY 雄性マウスを使用し、1 ケージ 6 匹で飼育した。実験には室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、定時間照明（7:00-19:00）の環境で、自由給水、自由給餌下、少なくとも1週間の予備飼育を行なった後実験に使用した。

### 使用薬物ならびに投与方法

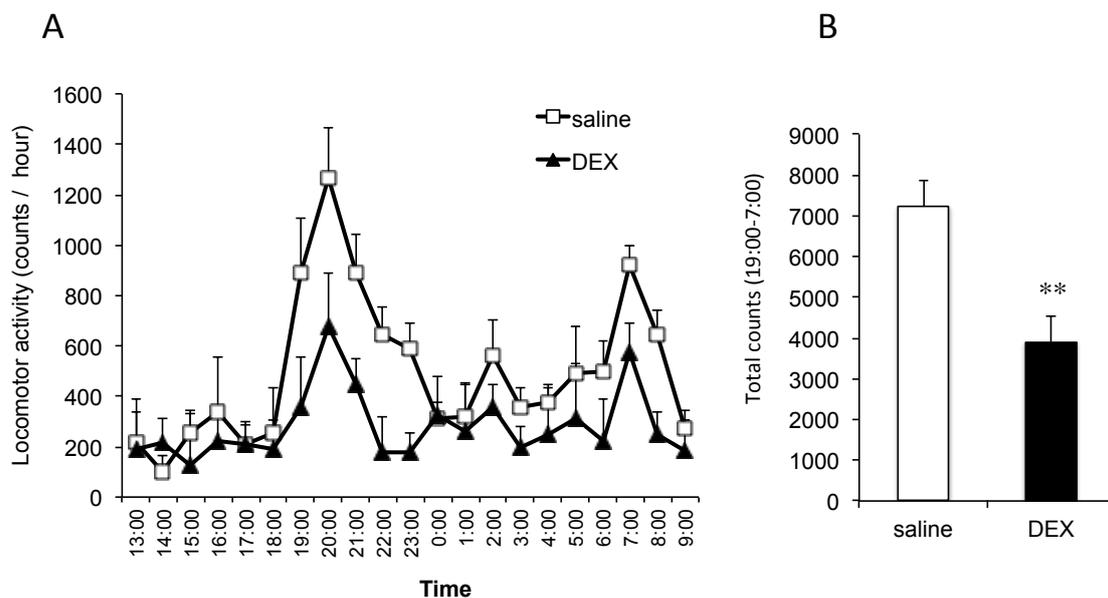
DEX として MSD 社のデカドロン注射液 6.6 mg (デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム) を生理食塩水で希釈し用いた。DEX (0.5 mg/kg/day) を Alzet 社の OSMOTIC PUMP (0.5  $\mu\text{L/hr}$ , 14 days) に注入し、各マウスの皮下へ包埋し2週間の DEX 持続注入を行なった。比較対照として OSMOTIC PUMP に生理食塩水を注入したものをコントロールとした。DEX のマウスへの投与については特記し

ない限り以下の実験について本方法で行なうこととする。これらの薬物投与プロトコールについて下記に示す。



#### 自発運動試験

14 日間の DEX 持続注入後、マウスをプラスチック製ケージ (17x24x12 cm) に 1 ケージあたり 1 匹入れ、自発運動量を持続的赤外線センサー (ABsystem: Neuroscience) で検知し、運動量の変化についてインターフェイスを介してパーソナルコンピューターに入力、記録した。測定は 20 時間とし、1 時間間隔における各運動量 (counts) について行なった。



**Figure 7. DEX 持続注入 2 週間後におけるマウスの自発運動量**

自発運動試験の結果、比較対照群 (saline) においては 19:00-20:00 および 6:00-7:00 をピークとした 2 相性の運動量の増加を確認した。また、14 日間の DEX 持続注入により特に運動量のピーク時において自発運動量の減少傾向がみられた (Figure 7A)。また、マウス活動期 (19:00-7:00) における自発運動量の合計値では、DEX 未処置に比して有意な減少がみられた (Figure 7B)。この結果から、DEX の持続注入がマウス活動期における自発運動量の低下を引き起こすことが確認された。

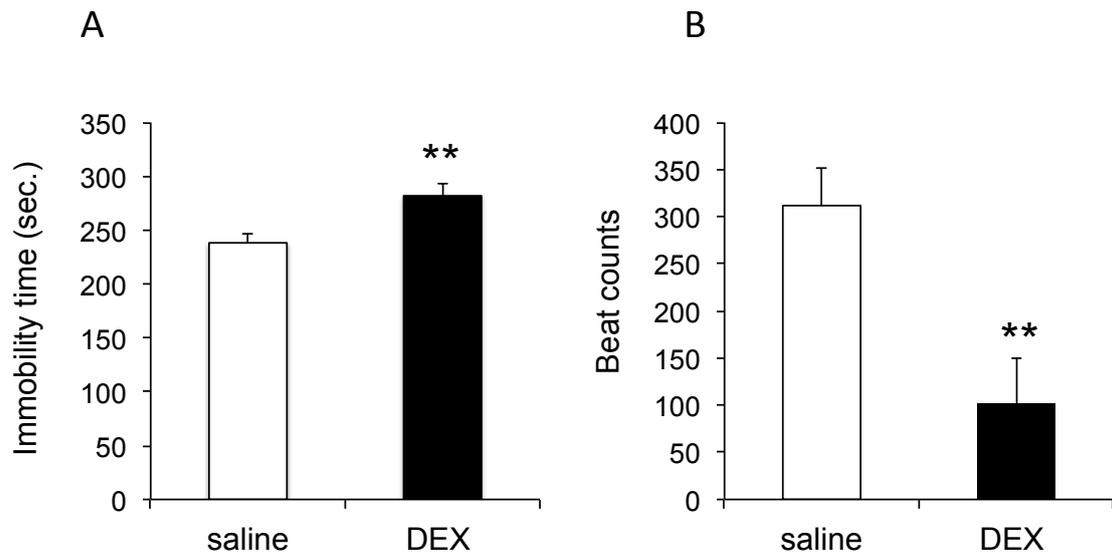
## 2-2 DEX 持続注入マウスによる強制水泳試験における検討

DEX の持続的な投与によるさらなる影響を強制水泳試験によって評価を行なった。強制水泳試験は、逃避不可能な水槽にラットやマウスを入れると、始めは逃れようと泳ぐが、やがて逃げ出すことをあきらめて無動状態になることを

利用した試験である。SSRIなどの抗うつ薬は、この無動状態の時間を短縮させることが報告されており、強制水泳試験は、前臨床において薬剤の抗うつ作用検出のスクリーニングなどに不可欠な評価系である。

#### 強制水泳試験

強制水泳試験は Porosolt らの方法を以下のように変更して実施した<sup>34)</sup>。マグネット (直径 1 mm、長さ 3 mm) をマウスの両後肢に埋め込み、水深 12 cm まで水 (24±1°C) の入ったプラスチック製円筒型水槽 (直径 11 cm、高さ 18 cm) 中でマウスを 1 匹ずつ泳がせた。本実験では、シリンダー周囲にあるコイルを通してマグネット装着した後肢の動きを検出する強制水泳自動測定装置 (MicroAct Scratching Test version 1.06: Neuroscience) を使用して、各マウスの無動時間とばたつき数を測定した。



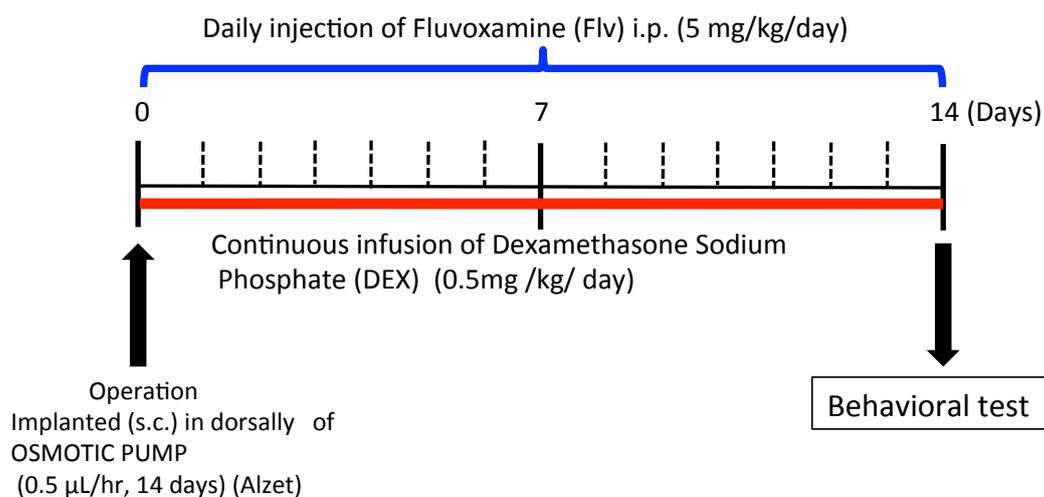
**Figure 8.** DEX 持続注入 2 週間後の強制水泳試験における無動時間 (A) とばたつき数 (B)

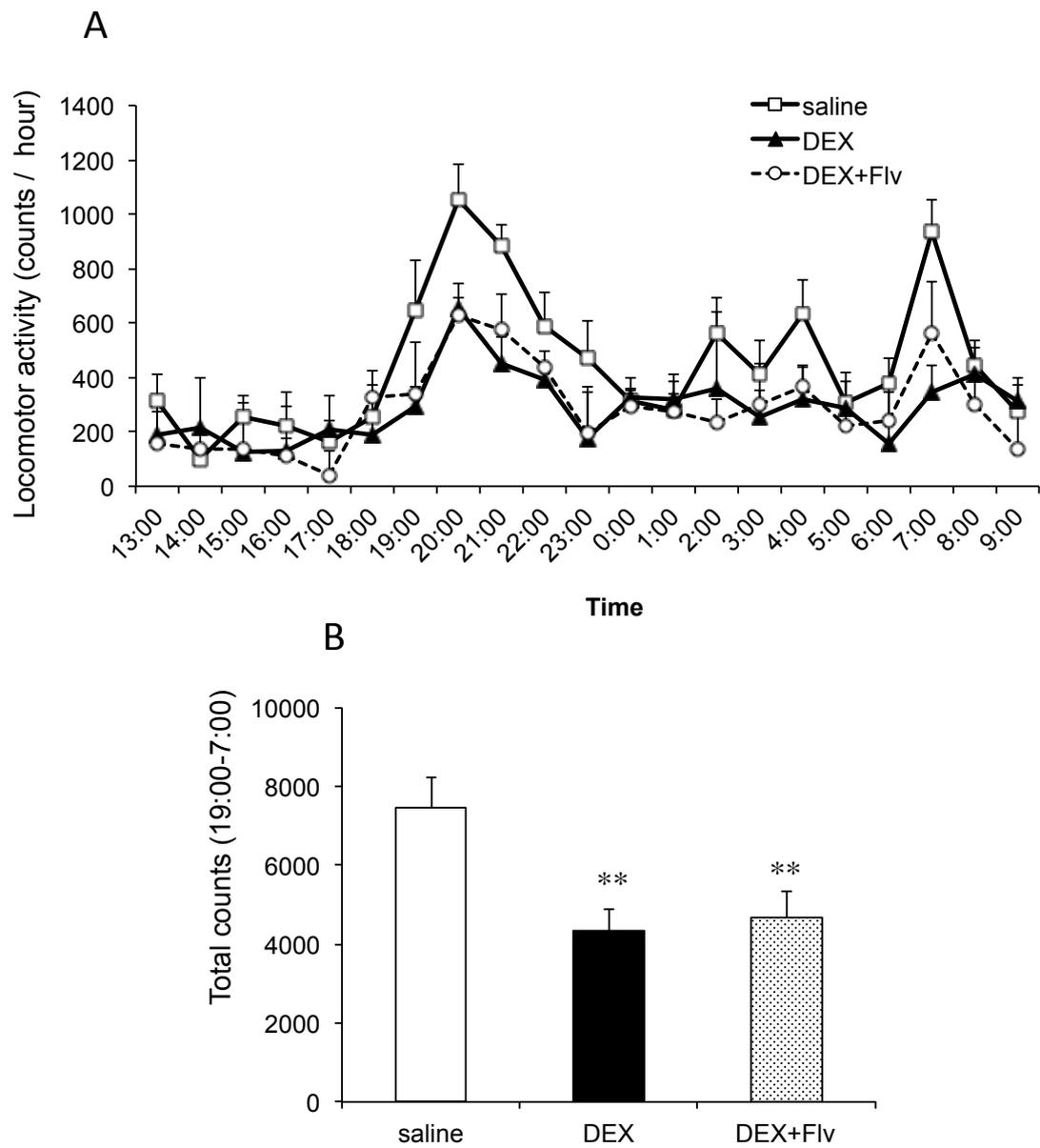
14 日間の DEX 注入後の強制水泳試験の結果、DEX 未処理と比較して無動時間の延長 (Figure 8A)、ばたつき数の減少がみられた (Figure 8B)。この結果から DEX の持続注入によって強制水泳試験における無動時間の延長、ばたつき数の減少といった行動抑制を引き起こすことが認められ、うつ様行動を誘起する可能性が示された。

### 2-3 DEX持続注入マウスによる抗うつ剤Fluvoxamineを用いた検討

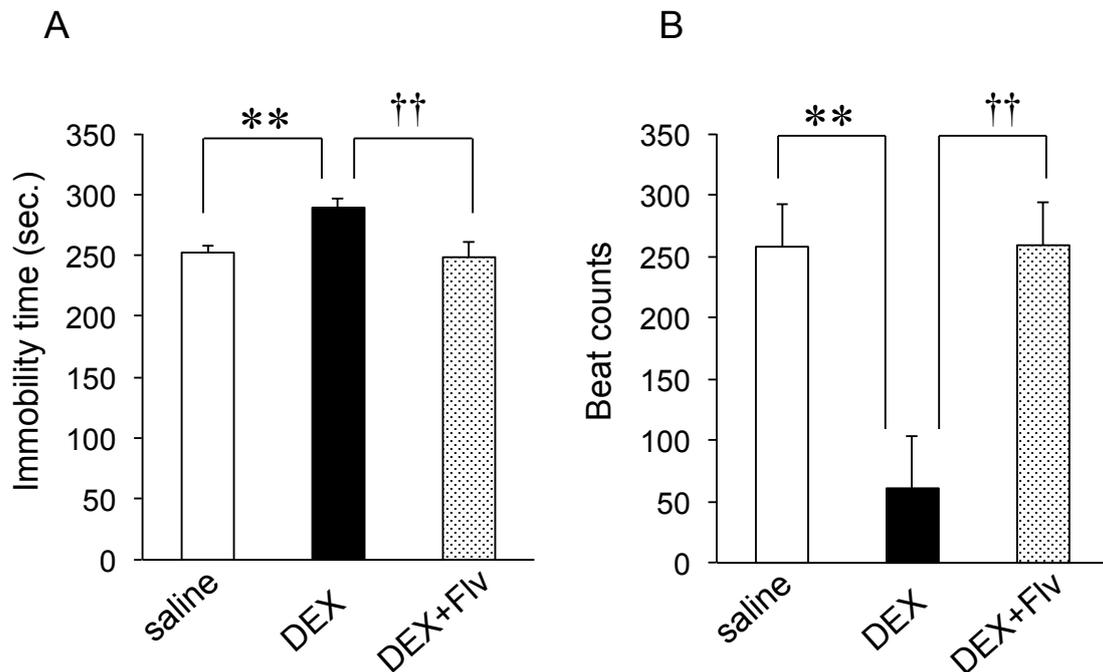
2-1 および 2-2 の結果から、DEX は活動期における自発運動量の減少を引き起こすとともに、強制水泳試験による行動抑制が示された。しかし、無動時間の延長などの行動抑制がうつ状態によるものではなく、運動量の減少から引き起こされた可能性も考えられる。一方、他の研究においては、げっ歯類の嗅

球摘出後に示す様々な症状がうつ病の臨床症状と類似するとされる嗅球摘出モデルでは、運動量の亢進が報告されること、また、抗うつ薬によってこれら亢進は抑制されることが明らかとなっている<sup>35)</sup>。一方、前述の抗原感作によるうつ状態の誘起モデルでは自発運動量の低下が示され、これらの低下に対して抗うつ薬は影響を与えないことが明らかとなっている<sup>33)</sup>。従って、うつ病モデルにおける自発運動量はその発症メカニズムにより亢進または抑制されることが考えられる。現在、抗うつ薬としての効果評価において、強制水泳試験での無動時間を短縮すること、一方、自発運動量に対しては減少もしくは影響を与えないことが抗うつ薬の効果の条件として評価されている。そこで、本 DEX モデルにおける自発運動量の減少および強制水泳試験での行動抑制に対する抗うつ薬の効果を検討した。抗うつ薬として第 1 章の *in vitro* における検討で改善効果が確認されたフルボキサミンを用いた。これらの薬物投与プロトコールについて下記に示す。





**Figure 9. DEX 持続注入による自発運動量減少に対するフルボキサミンの効果**



**Figure10. DEX 持続注入における強制水試験による無動時間 (A) およびばたつき数 (B) に対するフルボキサミンの効果**

本 DEX モデルに対する抗うつ薬 (FIV) の投与の結果、自発運動試験において、DEX により減少した自発運動量に対して FIV は特に影響を与えなかった (Figure 9AB)。また、強制水泳試験においては DEX によって延長された無動時間およびばたつき数に対する改善効果がみられた (Figure 10AB)。これら自発運動量に影響を与えずに強制水泳試験での行動抑制を抗うつ薬が改善したことから、本 DEX モデルによって確認された行動抑制はうつ様行動であると考えられた。

## 2-4 小括

本章では *in vivo* モデルとしてマウスに DEX を持続注入投与し、その影響を行動試験によって評価した。先行研究においては、グルココルチコイドの一種であるコルチコステロンをマウスへ長期投与することによって強制水泳試験や尾懸垂試験での無動時間の延長が認められることが報告されている。本研究での合成グルココルチコイドである DEX の持続注入マウスによる強制水泳試験での結果においても同様に無動時間の延長が認められた。さらに本研究ではグルココルチコイドを用いた動物モデルに対する抗うつ薬の効果について SSRI のフルボキサミンを用いて検討を行なった。そこで運動量に対しては影響を与えずに強制水泳試験における行動抑制に対しては改善効果が観察されたことから、本モデルで認められた行動抑制はうつ様行動であると考えられた。これらの結果から、本 DEX モデルがうつ様行動を引き起こすモデルであり、行動試験によって薬物の抗うつ作用が簡便に評価可能な新たな *in vivo* での薬剤性のうつ病病態モデルとして有用であると考えられた。

## 総括と展望

国際情勢の悪化、先行き不透明な経済状況、失業者の急増など現代社会を取り巻く環境に問題は多く、現在うつ病等の気分障害の総患者数は、250万人を超えるとされている。さらに日本国は人口に対する自殺率が世界的にも上位に位置づけられている。また、厚生労働省はその自殺対策としてうつ病などの気分障害への対策をその中核としていることから、現在うつ病治療を行なう上でその病態を解明することは大きく意義があり、また国際的にも大きな課題である。本研究では、うつ病においてステロイドをはじめとする薬剤によって引き起こされる薬剤誘起性うつ病に着目し発症機序の解明を目的として行なった。そこでこれら発症メカニズムを探索可能にする病態モデルを合成グルココルチコイドの DEX を用いて *in vitro* および *in vivo* 両面でのモデル構築を試みた。

第1章においては *in vitro* における検討として、PC12細胞を用いて、Akt および ERK1/2 といった分子マーカーをもつ突起伸展の抑制モデルを構築した。また、第2章において、*in vivo* における検討にマウスによる自発運動試験、強制水泳試験といった行動試験を用いて、自発運動量の減少を伴う行動抑制モデルを構築した。そこで、本研究ではこの構築された両モデルに対して、さらに抗うつ薬であるフルボキサミンを併用し、両モデルともに改善効果が得られることを明らかにした。本研究によって、ステロイドを添加もしくは投与するという特別な技術を要しない本モデルを構築したこと、加えて、突起伸展、行動試験といった評価マーカーを得たことで、新たな薬物の抗うつ効果を簡便に評価することが可能となった。また、*in vitro* および *in vivo* の両モデルを用いるこ

とで、従来の行動試験による検討に加え、さらに神経新生・可塑性に関する包括的な抗うつ薬の探索を行なうことができると考えられる。

本モデルのように *in vitro* と *in vivo* が連結した実験モデルは、うつ病のような複雑な疾患において非常に有効であると考えられ、これらに様々な治療薬や各マーカーの作動・遮断薬を用いて、*in vitro* と *in vivo* のパラメーターを相関しうるシステムファーマコロジーの構築を可能にするものと考えられる。本研究によって得られた DEX による反応性をバイオマーカーとし、*in vitro* で得られたマーカーを用いて抗うつ薬による反応性を解析し、さらに *in vivo* における反応性についても検討する。そしてその反応性を数式によってシミュレーションし、*in vitro* の反応性から *in vivo* の反応を予測する、システムファーマコロジーモデルを今後の研究課題として構築する予定である。

以上、本論文で得られた研究成果は、今後、うつ病の病態発症機構の解明とその効果的な治療に貢献するものと期待される。

## 謝辞

本研究にあたり、始終懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました、福岡大学薬学部創剤学研究室 教授 加留部 善晴 先生に心から深謝致します。

また、学位の取得に際し、審査ならびに御助言を賜りました福岡大学薬学部医療構造学研究室 教授 原 周司 先生、創剤学研究室 教授 高田 二郎 先生、准教授 松永 和久 先生に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大な御協力をいただきました横浜薬科大学 臨床薬理学研究室 教授 千葉 康司 先生、日本シグマックス株式会社 研究開発部 小島 良績 氏、渡邊 孝幸 氏に深く感謝致します。

最後になりましたが始終温かい御助言、ご指導を戴きました福岡大学薬学部創剤学研究室 瀬戸口 修一 氏をはじめとする創剤学研究室の皆様、横浜薬科大学 臨床薬理学研究室 出雲 信夫 先生をはじめとする臨床薬理学研究室の皆様  
に深く感謝致します。

## 引用文献

1. 厚生労働省大臣官房統計情報部 患者調査 (疾病分類編) 2011.
2. Sheline YI, Wang PW, Gado MH, et al. (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 3908–3913.
3. Vythilingam M, Heim C, Newport J, et al. (2002) Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. *Am J Psychiatry*; 159: 2072–2080.
4. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electro-convulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*; 15: 7539–7547.
5. Carroll BJ. (1982) Use of the dexamethasone suppression test in depression. *J Clin Psychiatry*; 43(11 Pt 2): 44-50.
6. Aihara M, Ida I, Yuuki N, et al : HPA axis dysfunction in unmedicated major depressive disorder and its normalization by pharmacotherapy correlates with alteration of neural activity in prefrontal cortex and limbic/paralimbic regions. *Psychiatry Res*. 2007 ; 15;155(3):245-56.
7. Selye H. (1998) A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*; 10(2):230-1.

8. 厚生労働省 重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬剤惹起性うつ病 2008.
9. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, et al. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron*; 34:13–25.
10. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, et al. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*; 17 : 2492–2498.
11. Manji HK , Drevets WC , Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nature Medicine*; 7 : 541–547.
12. Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., et al. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkey is diminished by stress. *PNAS*; 95 : 3168-3171.
13. 医薬品インタビューフォーム デカドロン®注射液 1.65 mg, 3.3 mg, 6.6 mg. 2011. 6. 改訂, MSD 株式会社
14. Guroff G (1985) PC12 Cells as a Model of Neuronal Differentiation. *Cell Culture in the Neurosciences* 1: 245-272.
15. Rossi D, Pedrali A, Gaggeri R, Marra A, Pignataro L, et al. (2013) Chemical, pharmacological, and in vitro metabolic stability studies on enantiomerically pure RC-33 compounds: promising neuroprotective agents acting as sigma(1) receptor agonists. *ChemMedChem* 8: 1514-1527.

16. Yu CW, Chang PT, Hsin LW, Chern JW (2013) Quinazolin-4-one derivatives as selective histone deacetylase-6 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 56: 6775-6791.
17. Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR (2004) Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol Teratol* 26: 397-406.
18. Chao MV (1992) Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* 9: 583-593.
19. Geetha T, Jiang J, Wooten MW (2005) Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 20: 301-312.
20. Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006.
21. Kaplan DR, Stephens RM (1994) Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol* 25: 1404-1417.
22. Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609-642.
23. Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000) Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20: 5671-5678.

24. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi (2014) Dexamethasone induces PC12 cell apoptosis by down-regulating glucose uptake. Article in Chinese: 30(2):160-3.
25. Tocco MD, Contreras ML, Koizumi S, Dickens G, Guroff G (1998) Decreased levels of nerve growth factor receptor on dexamethasone-treated PC12 cells. J Neurosci Res; 20(4): 411-9.
26. Caillaud T, Opstal WY, Scarceriaux V, Billardon C, Rostene W. (1995) Treatment of PC12 cells by nerve growth factor, dexamethasone, and forskolin. Effects on cell morphology and expression of neurotensin and tyrosine hydroxylase. Mol Neurobiol; 10(2-3): 105-14.
27. Lecht S, Arien-Zakay H, Tabakman R, Jiang H, Fink DW, et al. (2007) Dexamethasone-Induced Down-Regulation of Nerve Growth Factor Receptor p75NTR is Mediated by Glucocorticoid Type II Receptor in PC12 Cell Model. Open Pharmacol J 1: 19-26.
28. Slattery DA, Hudson AL, Nutt DJ (2004) Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. Fundam ClinPharmacol; 18: 1–21.
29. Bernal GM1, Peterson DA (2004) Neural stem cells as therapeutic agents for age-related brain repair. Aging Cell; 3(6): 345-51.
30. Malberg, J.E., Duman, R.S. (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: Reversal by fluoxetine treatment. Neuropsychopharm 28; 1562-1571.

31. Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., et al. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effect of antidepressants. *Science*; 301: 805-809.
32. Brown ES, Woolston DJ, Frol A, et al. (2004) Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving corticosteroid therapy. *Biol Psychiatry*, 55:538-545
33. 新井 巖, 露木 佳美 (2000) うつ病態の動物モデル. 日本国特許庁; 特開 2000-245298 (P2000-245298A)
34. Porsolt, RD., Bertin, A, Jalfre, M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 229, 327-336.
35. Song C, Leonard BE. (2005) The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev*; 29: 627-647.