

序論

近年、うつ病性障害（うつ病）患者の増加が社会問題になってきている。うつ病は代表的な精神疾患の一つであり、その生涯罹患率は 10~20%と非常に高く（Wong and Licinio, 2001）、年間 3 万件以上に上る自殺の主な原因の一つであるといわれている（Kessler, 1997）。これらの社会的背景から、厚生労働省は昨年、本邦の医療計画で重点的に対策を取るべき疾患である、がんや糖尿病などの「四大疾病」に、うつ病をはじめとする精神疾患を追加して「五大疾病」とする方針を定めた。このように、うつ病は社会的・経済的・医療的な問題が複雑に絡み合った疾患であり、様々な観点からの対処・対策が必要である。

その中でも薬物治療に注目すると、現在のうつ病治療の場合では様々な種類の抗うつ薬が開発されており、有効性、安全性の面から選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRIs：selective serotonin reuptake inhibitors）が世界的に第 1 選択薬として使用されている（Anderson, 2000）。しかしながら、うつ病の大規模臨床試験である STAR*D（Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression）研究は、SSRIs の 1 つである citalopram を初発うつ病患者の治療薬として単独で使用した場合、約 30%しか寛解しないことや、寛解患者の半数が 1 年以内に再発することを報告している（Trivedi et al., 2006; Rush, 2007; Li et al., 2012）。これに加えて、抗うつ薬（特に SSRIs）は投与開始から治療効果発現までに 2~4 週間かかるという点も現状のうつ病治療の問題点として挙げられる（Wong and Licinio, 2001）。そのため、今後のうつ病治療をより良質なものにするために、うつ病の病態解明や新しい治療薬の優れた治療戦略開発が強く望まれている。

先述の STAR*D 研究において、SSRIs 単剤治療無効であった患者に対して、5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストである buspirone を併用すると、うつ病症状が改善することが明らかになった（Trivedi et al., 2006）。このような抗うつ作用を持たない薬物の追加により、抗うつ薬の薬効を増強させる治療戦略は「増強療法」と呼ばれている。5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストを用いた「増強療法」の有効性についてはいくつかの臨床試験において、SSRIs との併用により、SSRIs の抗うつ作用が増強されることが報告されている（Artigas, 2013; Yamada et al., 2003）、しかしながら、5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストの併用がどのようにして抗うつ薬の薬効を増強させるのか詳細なメカニズムに関しては未だに明らかになっていない。

近年、ヒトを含む様々な生物種の成体脳において確認されている海馬神経新生が、うつ病の発症機序に関係しているのではないかと注目されている（Fuchs and Flugge, 1998; Gould and Gross, 2002; Samuels and Hen, 2011; Petrik et al., 2012）。海馬神経新生とは、

成体脳において新たな神経細胞に分化しうる神経幹細胞および神経前駆細胞の産生のことである。海馬歯状回における海馬神経新生は、ストレスを負荷することにより減少すること、そして2~4週間のSSRIsの一つである fluoxetine の長期投与によりその減少が改善すること(Gould et al., 1998; Malberg et al., 2000) から、海馬神経新生がうつ病発症や、抗うつ薬の治療効果発現に関係しているのではないかと考えられている。SSRIs による海馬神経新生増加のメカニズムについては、Santarelli ら (2003) の研究によれば、SSRIs の一つである fluoxetine による海馬神経新生の増加には5-HT_{1A}受容体を介した反応が関与する可能性が示唆されている。さらに5-HT_{1A}受容体のリガンドと海馬神経新生との関係については、5-HT_{1A}受容体フルアゴニストである8-OH-DPATの投与により海馬神経新生が増加するという報告(Banasr et al., 2004; Soumier et al., 2010) や、5-HT_{1A}受容体アンタゴニストであるWAY100635の投与により減少するという報告(Radley and Jacobs, 2002) があり、5-HT_{1A}受容体と海馬神経新生の間には密接な関係があることが示唆されている。そこで私たちは、SSRIsの増強療法における抗うつ作用増強メカニズムには、海馬神経新生の増加促進が関与していると仮説を立てた。

以上の背景から、本研究では、SSRIsと5-HT_{1A}受容体部分アゴニストによる増強療法と海馬神経新生の関係性を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

第1章では、ヒトが臨床的に受けるものと同質の心理社会的ストレスを負荷する実験である Resident-Intruder 系を用いたうつ病の病態モデル動物を作製し、海馬神経新生に最も強く影響を与えるストレス負荷回数についての検討を行った。

第2章では、第1章で作製したうつ病モデル動物を用いて、SSRIsの1つである fluoxetine および、5-HT_{1A}受容体部分アゴニストである tandospirone の単独投与が、心理社会的ストレス負荷による海馬神経新生の減少に与える影響について検討を行った。

第3章では、第2章での検討を基に、fluoxetine と tandospirone の併用投与と各薬剤の単独投与による結果とを比較を行い、増強療法が海馬神経新生に与える影響を検討した。

第1章 Resident-Intruder 系を用いた心理社会的ストレスの負荷が海馬神経新生に及ぼす影響の評価と最適なストレス負荷プロトコールの確立

緒言

うつ病性障害（以下うつ病）の生涯有病率は10～20%と高く（Wong and Licinio, 2001）、本邦においては平成 11～17 年の間にうつ病を含む気分障害の総患者数は 44.1 万人から 92.4 万人へと増加している（厚生労働省ホームページ）。うつ病患者では、不眠や食欲低下をはじめとする身体症状や、集中力や判断力低下、自殺念慮などの精神症状がみられ、これらのうつ症状による仕事の能率低下や自殺者数の増加は社会的損失として問題視されている。現代社会において、うつ病による弊害は様々な側面からの問題を含んでいるが、特に病態生理学的な側面からみると、うつ病の詳しい発症メカニズムについてほとんど解明されていないことが大きな問題である。このことから、うつ病の病態解明は世界規模で望まれている課題であるといえる。

我々の生活する社会において、うつ病発症に寄与する主な要因の一つはストレスであると考えられている。そのため、ストレスを負荷することにより作製したうつ病モデル動物の意義は、うつ病の病態解明を目指す研究において重要である。これまで多くの基礎的研究において、うつ病モデル動物の作製には拘束ストレスや電気ショック、強制水泳試験といった身体的ストレス負荷法が用いられてきた。しかしながら、臨床においてうつ病発症に強く寄与するストレスは、心理社会的ストレスであると考えられている。

心理社会的ストレスを負荷した実験モデル動物では、行動学的変化として社会的相互作用行動の減少（Berton et al., 2006; Tsankova et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Krishnan and Nestler, 2008）、神経内分泌的变化として血中グルココルチコイド濃度の増加（Koolhaas et al., 1997a）、神経化学的变化として脳内モノアミン濃度の変化（Stefanski, 2000）などの様々な変化がみられる。これらのことから、うつ病の基礎的研究を行う上で、実際の臨床においてヒトが受けるストレスである心理社会的ストレス負荷により作製したうつ病モデル動物を用いる重要性は高いと考えられる。

我々の社会では人間関係、特に社会的上下関係による心理社会的ストレスがうつ病発症の主要因の一つであり、このようなストレスはヒト以外の動物種でも確認されている。Resident-Intruder (R-I) 系はこの社会的上下関係を利用して社会的敗北を負荷する自然なストレス実験系である（Koolhaas et al., 1997b; Kessler, 1997; Blanchard et al., 2001）。R-I 系を用いた心理社会的ストレス負荷はその強度や負荷時間によって生理学的、行動学的

な反応が変化することが知られている。例えば、心理社会的ストレスを 3 日間連続負荷した実験モデル動物においては、血中コルチコステロン濃度の有意な上昇、血中脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) 濃度の有意な減少と、様々なうつ病様行動がみられる (Razzoli et al., 2009)。また、心理社会的ストレスを 2 週間で間欠的に 4 回負荷した実験モデル動物においては、様々な脳の部位における BDNF mRNA 量の有意な減少がみられることが報告されている (Fanous et al., 2010)。

このように心理社会的ストレスは、生体に様々な悪影響を及ぼし、その多くはうつ病患者で見られる症状や病態生理学的な変化と類似している。心理社会的ストレスがどのようなメカニズムを介してうつ病発症に寄与するのかは明らかではないが、最近では、海馬神経新生が重要であると考えられている。海馬神経新生とは、海馬歯状回の顆粒細胞下帯 (subgranular zone) において神経細胞が新しく生み出されている現象のことであり、ヒトを含めた哺乳類の成体脳で確認されている (Eriksson et al., 1998; Gould and Gross, 2002)。ストレスを負荷することにより作製したうつ病実験モデル動物では海馬神経新生が減少しており (Gould et al., 1998)、うつ病治療の第一選択薬である SSRI の長期間投与により、ストレスによる海馬神経新生減少作用が改善される (Santarelli et al., 2003) ことが報告されている。このことから、海馬神経新生はうつ病の発症メカニズムと密接な関係があるとして注目されている。

R-I 系を用いた心理社会的ストレス負荷が海馬神経新生に及ぼす影響を調べた過去の報告では、心理社会的ストレスを単回負荷した実験モデル動物において、海馬歯状回における神経新生の有意な減少がみられた (Thomas et al., 2007)。しかしながら、心理社会的ストレスの強度、負荷期間の違いが海馬神経新生にどのような影響を及ぼすかを調べた研究はない。これらのことから R-I 系によるストレス負荷回数の違いにより、海馬神経新生に与える影響の度合いが異なる可能性が考えられる。また、ストレス負荷による海馬神経新生の減少には視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系の調節が重要であると考えられており (Murray et al., 2007)、副腎皮質から分泌されるコルチコステロンなどの副腎皮質ホルモンはストレス強度のマーカーになりうると思われている (Armario, 2006)。

そこで本研究では、ストレス単回負荷、3 日連続負荷、間欠的負荷 (2 週間で 4 回) の 3 種の実験スケジュールを選択し、ストレス負荷回数と血漿コルチコステロン濃度と海馬神経新生の関係について検討を行った。

方法

1-1. 実験動物

全ての実験動物は、Sprague-Dawley (SD) ラット (九動) を用いた。飼育条件は、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、絶対湿度 $60\pm 2\%$ 、および 12 時間周期の逆転型明暗サイクル (19:00~7:00:明期、7:00~19:00:暗期) の環境で飼育した。ラットに与える飼料は CE-2 (日本クレア) を用い、餌・水は共に自由に摂取できるようにした。動物実験の取り扱いについては、福岡大学実験委員会 (Experimental animal care and use committee) による動物実験倫理規定に準じた。

1-2. Resident-Intruder 系を用いた心理社会的ストレス負荷

1-2-1. 飼育環境

Resident-Intruder (居住者/侵入者) 系で用いる Intruder ラットとして、Sprague-Dawley 雄性 7~9 週齢ラットを中型プラスチックケージ (幅 23cm×奥行 14cm×高さ 12cm) で単独飼育した。Resident colony は、同種のラット雄性 2 匹 (1 年齢)、雌性 1 匹 (6 週齢) を専用の大型プラスチックケージ (幅 50cm×奥行 40cm×高さ 20cm) で 4 週間飼育し作製した。

1-2-2. 衝動性 training

Resident colony の衝動性を高めるため、colony 作製開始から週に 1 回 10 分間、本実験までに計 3 回の training を行った。衝動性 training では、本実験で用いる Intruder ラットとは別に、10 週齢の未処置の雄性 training ラットを用いた。この 3 回の training を通して、衝動性の高い Resident colony を選別した。計 3 回の衝動性 training において training ラットを Submissive posture (降伏体勢) にさせた Resident colony のみを本実験で有効な colony とみなした。

1-2-3. Resident-Intruder 系を用いた心理社会的ストレス負荷実験

心理社会的ストレス負荷実験は全て暗期に赤色灯下の実験室で行った。実験室に Resident colony および Intruder ラットを運び、adaptation を 10 分間行なった。ストレス負荷開始 10 分前に Resident colony から雌性ラットを取り出した。その後、Resident colony に Intruder ラットを 1 匹入れて 20 分間観察した (Fig. 1)。Intruder ラットは Resident 雌性ラットから攻撃行動を受けるが、その中でもストレス負荷開始 5 分以内に Submissive posture (降伏体勢) が見られた Intruder ラットを心理社会的ストレスが負荷された個体とみなした (Fig. 2)。ストレス負荷後、Intruder ラットはホームケージに戻した。

この負荷実験を用いて、ストレス単回負荷群、3 日連続負荷群、間欠的負荷 (2 週間で 4 回) 群の 3 つのストレス群を作製した。

Control 群は、実験室で 10 分間の adaptation の後、清潔な床敷きを敷いた Resident colony 作製用の大型プラスチックケージ内に入れて、20 分間観察した後、ホームケージに戻した。

【Resident-Intruder (居住者-侵入者)系ストレス負荷プロトコール】

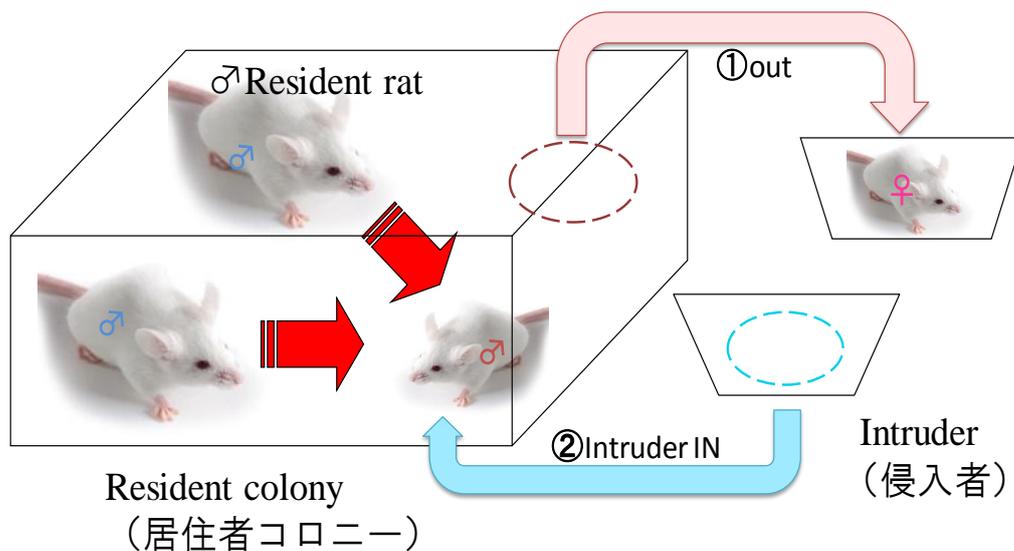


Fig.1 Resident-Intruder 系ストレス負荷プロトコールの模式図

- ①雌性ラットを 10 分前にケージから取り出した。
- ②雌性ラットを取り除いた Resident(居住者)コロニーに、Intruder(侵入者)ラットを 1 匹入れ 20 分観察した。
- ③その間、Intruder ラットは Resident ラットから様々な攻撃を受ける。

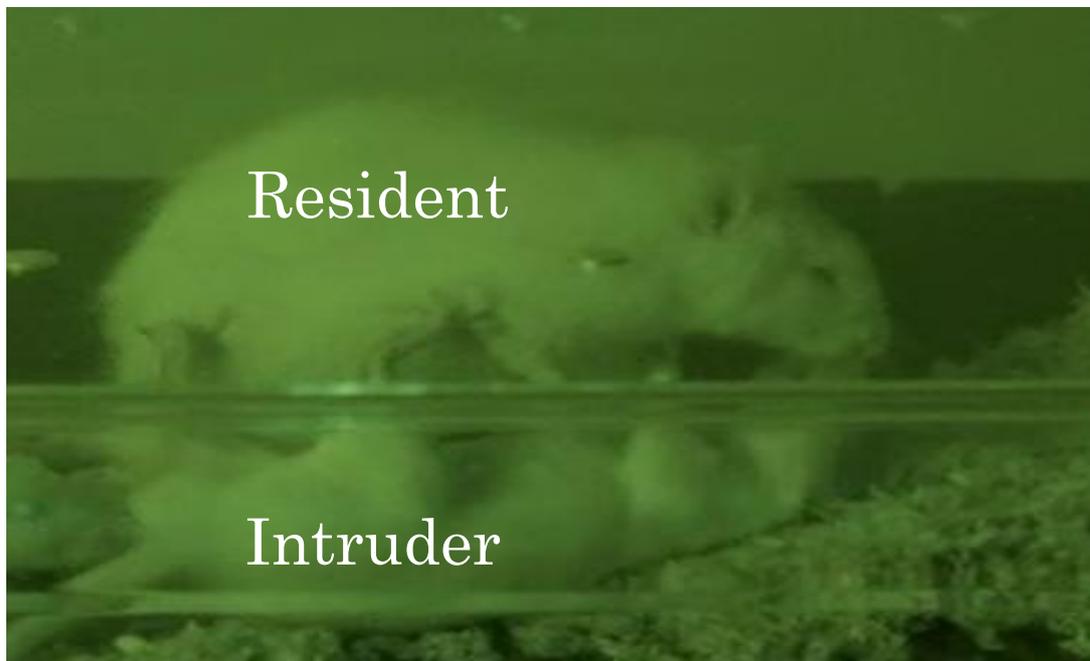


Fig.2 Submissive posture (降伏行動)

Intruder が背中を地面に向け、両手足を広げる行動
Intruder の降伏行動を social defeat の指標とした。

1-3. 血漿コルチコステロン濃度測定

各ラットはストレス負荷直後に断頭採血を行い、ヘパリン(扶桑薬品)を適量充填した採血管に血液を採取した。血液を遠心分離後(4°C,3000rpm,15min)、血漿を分取し、Assay Max Corticosterone ELISA kit (Assay Pro 社) を使用して血漿コルチコステロン濃度を測定した。

1-4. 灌流固定および凍結切片作製

灌流固定および凍結切片作製には、1-3. とは別の個体を用いた。ストレス負荷 1 週間後の Intruder ラットを、ペントバルビタールナトリウム塩 (50mg/kg)で麻酔し、正向反射の消失確認後、開胸、心尖部より大動脈弓までゾンデを刺入し、鉗子でゾンデの固定および下大静脈の結紮を行い、生理食塩水 (1000ml/kg) で経心的に灌流した。続いてリン酸緩衝液 (PBS、pH7.4) の中に溶かした 4%paraformaldehyde250ml にて固定を行った。十分な固定を行うため、屍体を 4°Cで 1 日保管後、脳を摘出、一晚同種の固定液で後固定を行い、アジ化ナトリウム入りの PBS にて冷蔵保存した。

凍結組織の作製には、15%、30%スクロース溶液の順に浸漬して脳組織内の水分をスクロースと置換し、O.C.T コンパウンド (サクラファインテック) : 30%スクロース=2 : 1 の包埋剤の中に組織を浸漬させ、ドライアイスを中心に敷き詰めた 99.5%エタノールの中で急冷し凍結組織を作製した。凍結マイクロトーム (Leica) を用いて 30 μ m の冠状凍結切片を作製し、シランコートスライドガラス(松浪工業)に貼付、風乾後、-80°Cにて保存した。

1-5. 免疫組織学的染色

海馬全域の連続冠状切片を、切片 8 枚おきに 1 枚抽出し、新生ニューロンのマーカーとして doublecortin (DCX) を抗原とした免疫組織学的染色を行った。まず切片を 0.1M PBS で洗い、0.3% H_2O_2 /メタノールに 30 分間漬け内因性ペルオキシダーゼを阻害した。洗浄後、5%正常ヤギ血清 (Vector Laboratories) で 30 分間インキュベートし、二次抗体の非特異的結合を防いだ。切片は一次抗体 (DCX 抗体,1:1000,Abcam 社) で 4°Cにて一晚インキュベートした。翌日、切片を 0.1M PBS で数回洗い、ビオチン化二次抗体 (ヤギ由来ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体、1 : 200、Vector Laboratories) で 2 時間インキュベートし、洗浄後ストレプトアビジン/ペルオキシダーゼ複合体 (1:300,Dako 社) で 1 時間インキュベートした。洗浄後、diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector) を 10 分前後で反応させ、1 時間風乾させた。切片はヘマトキシリンで対比染色し、アルコールで段階的に脱水、キシレンで透徹した後、最後にエンテランニュー (Merck) にて封入した。

1-6. doublecortin (DCX) 陽性細胞数の定量

各ラットの海馬歯状回顆粒細胞下帯 (subgranular zone: SGZ) における DCX 陽性細胞数の定量は、StereoInvestigator software (MBF Bioscience) をインストールした、Z 軸電動ステージ搭載デジタルイメージング顕微鏡 (ECLIPSE 80i, Nikon) を用いて行った。免疫組織学的染色を行った各切片の左脳海馬における DCX 陽性細胞数を、拡大率 400 倍の顕微鏡像を基に、実験条件に対して blind である観察者が定量した。海馬における神経細胞の立体構造学的定量法として West ら (1991) の提案する Optical Fractionator 法を選択し、以下の等式に基づいて総陽性細胞数 (N) を概算した。Fig. 3 に海馬歯状回における Doublecortin 免疫染色画像を示す。

$$N = \frac{t}{h} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{ssf} \times \Sigma Q^{-}$$

- ΣQ^{-} : 実際にカウントした陽性細胞数の和
t : 凍結切片作製時の切片の厚さ [30 μ m]
h : Optical disector height [10 μ m]
asf : area sampling fraction = counting frame の大きさ (75 μ m \times 75 μ m) \div sampling grid の大きさ (250 μ m \times 150 μ m) [0.15]
ssf : section sampling fraction = 切片を何枚に 1 枚抽出したか [1/8]

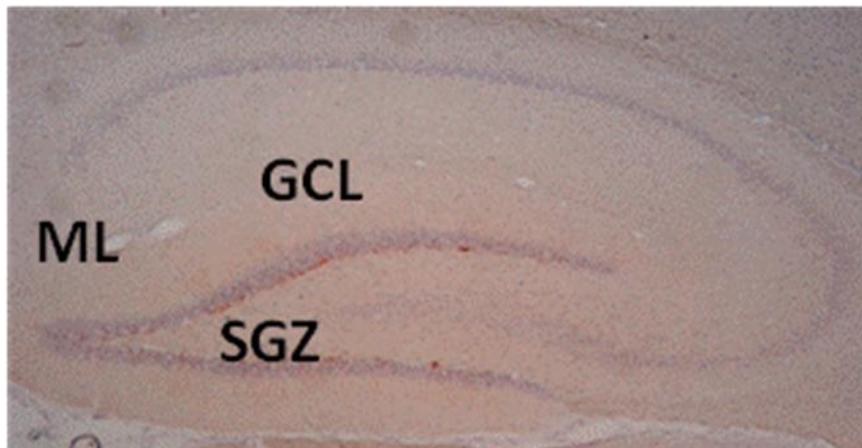


Fig.3 海馬歯状回における Doublecortin 免疫染色画像(拡大倍率 40 倍)

GCL(granular cell layer) : 顆粒細胞層

SGZ(subgranular zone) : 顆粒細胞下帯

ML(molecular layer) : 分子層

1-7. 統計学的解析

Control 群、ストレス単回負荷群、3 日連続負荷群、間欠的負荷 (2 週間で 4 回) 群の 4 群間におけるストレス負荷後の血漿コルチコステロン濃度、DCX 陽性細胞数に差があるかどうかについては One-way ANOVA を用いて解析を行った。ANOVA で有意差が認められ場合、Post hoc analysis として Bonferroni/Dunn test を行った。全てのデータは平均値 ± S.E. で表示した。なお危険率が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

結果

1. R-I系を用いた心理社会的ストレス負荷直後の血漿コルチコステロン濃度の変化

ストレス負荷直後の血漿コルチコステロン濃度を4群間で比較したところ、Control群に比べて単回負荷群、3日連続負荷群、間欠的負荷(2週間で4回)群では血漿コルチコステロン濃度が有意に増加していた。また、間欠的負荷(2週間で4回)群は単回負荷群、3日連続負荷群に比べて、血漿コルチコステロン濃度が有意に増加していた。(Fig.4)

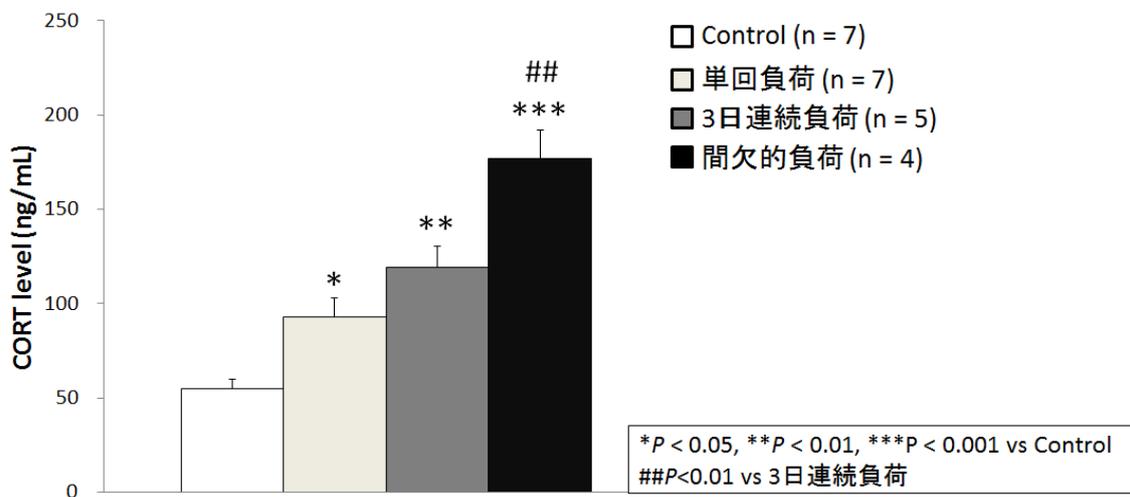
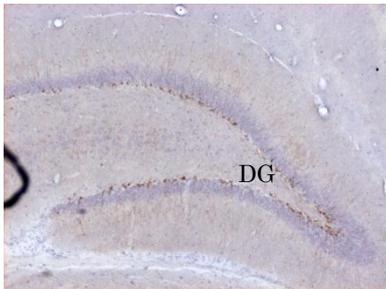


Fig. 4 心理社会的ストレス負荷直後の血漿コルチコステロン濃度

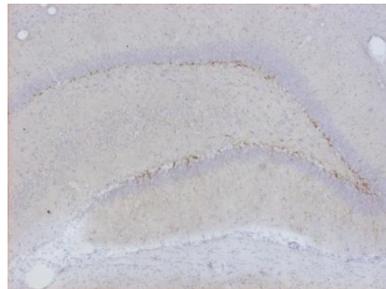
2. R-I系を用いた心理社会的ストレス負荷1週間後の doublecortin (DCX) 陽性細胞数の変化

ストレス負荷1週間後の海馬歯状回顆粒細胞下帯における DCX 陽性細胞数を4群間で比較したところ、Control群に比べて3日連続負荷群および間欠的負荷(2週間で4回)群では DCX 陽性細胞数が有意に減少していた (Fig.5,6)。

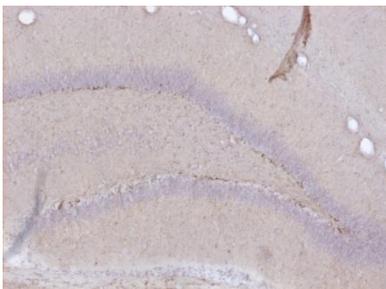
(a) Control 群



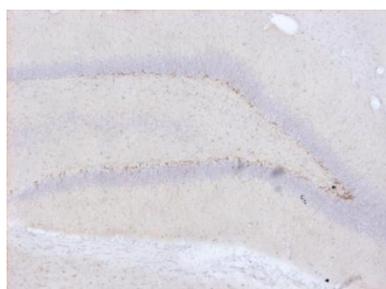
(b) 単回負荷群



(c) 3日連続負荷群



(d) 間欠的負荷(2週間で4回)群



DG :dentate gyrus

Fig.5 各群の海馬歯状回における doublecortin 染色像 (拡大倍率 400 倍)

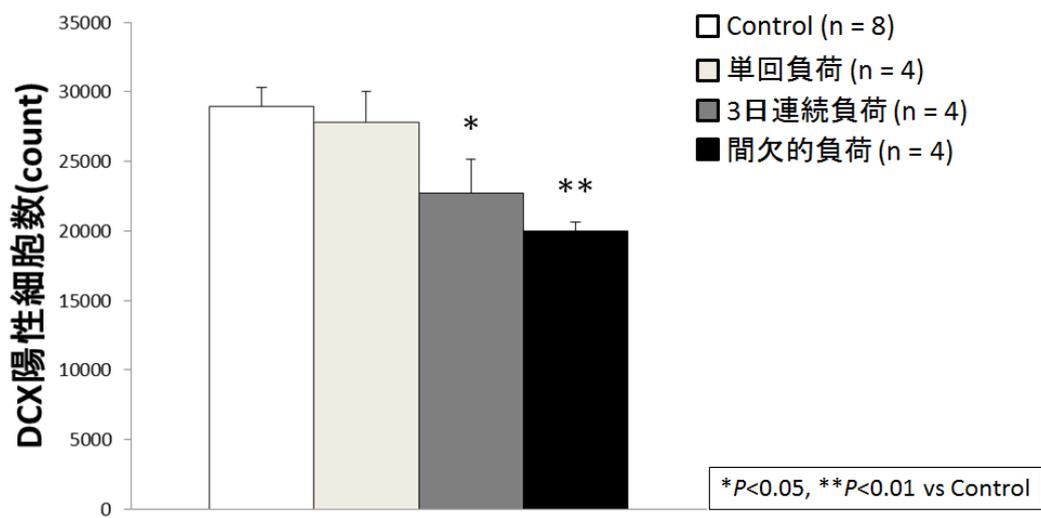


Fig.6 心理社会的ストレスがラット海馬歯状回顆粒細胞下帯におけるDCX陽性細胞数に与える影響

考察

本章では、ヒトが臨床的に受けるものと同質の心理社会的ストレスを負荷する実験である Resident-Intruder (R-I) 系を用いて、ストレス単回負荷、3日連続負荷、間欠的負荷(2週間で4回)が血漿コルチコステロン濃度と、海馬神経新生数に与える影響を調べ、これらの観点から、うつ病の病態モデル動物を作製するために適したストレス負荷回数について検討した。

最初に R-I 系による心理社会的ストレス負荷直後の血漿コルチコステロン濃度を比較したところ、Control 群に比べて単回負荷群、3日連続負荷群、間欠的負荷(2週間で4回)群では血漿コルチコステロン濃度が有意に増加しており、かつ段階的に有意な増加が認められた。ストレス負荷を行うと、視床下部からコルチコトロピン放出ホルモン(CRH)が分泌され、CRHは下垂体から副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を分泌させる。分泌された ACTH は副腎皮質を刺激し、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモンを分泌させるというカスケードで視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系の活動が亢進することが知られている。過去の報告により、ストレス強度のマーカールには血漿コルチコステロン濃度の変化が最も感度が良いとされている(Armario, 2006)ことから、本研究でみられた血漿コルチコステロン濃度の段階的な増加は、R-I 系による心理社会的ストレス負荷の回数が単回、3日連続、間欠的(2週間で4回)と増加するに伴い、ストレス負荷強度が段階的に増加することを反映していると考えられる。

次に R-I 系による心理社会的ストレス負荷1週間後の海馬歯状回顆粒細胞下帯における DCX 陽性細胞数を4群間で比較したところ、Control 群に比べて3日連続負荷群および間欠的負荷(2週間で4回)群では DCX 陽性細胞数が有意に減少していた。本研究において、海馬神経新生の評価に用いた Doublecortin (DCX) は、未成熟な新生ニューロンにのみ発現するタンパク質であり、神経新生の内因性マーカーとなりうる可能性が高いと報告されている(Rao and Shetty, 2004; Couillard-Despres et al., 2005)。このことは、心理社会的ストレスの3日連続負荷もしくは間欠的負荷(2週間で4回)により海馬神経新生が減少したことを示唆している。今回の結果は、海馬神経新生数が心理社会的ストレス負荷により減少するという過去の報告(Mitra et al., 2006)と一致しており、R-I 系による心理社会的ストレス負荷の強度が高いほどより大きく海馬神経新生数が減少することを示唆している。

今回の結果から、うつ病の病態モデルの作製法として、3日連続負荷もしくは間欠的負荷(2週間で4回)がふさわしいのではないかと考えられる。間欠的負荷(2週間で4回)群における血漿コルチコステロン濃度は、3日連続負荷群と比べて、有意な増加が認められた。

過去の報告において、コルチコステロンを慢性投与した動物では、海馬神経新生の減少がみられることが報告されている (Cameron et al., 1998; Karishma and Herbert, 2002; Murray et al., 2008)。また、副腎摘出を行った動物では海馬神経新生の増加がみられることも報告されている (Cameron and Gould, 1994)。このことは、海馬神経新生に影響を与える因子として、HPA 系が極めて重要な調節能を持つことを示唆している。以上のことから、間欠的負荷 (2 週間で 4 回) 群の方がうつ病モデル動物に作製に適したストレス負荷回数であると考えられる。

しかしながら、本研究では、3 日連続負荷群と間欠的負荷 (2 週間で 4 回) 群間では DCX 陽性細胞数に差を認めず、ストレス負荷強度と海馬神経新生数の間に段階的な変化はみられなかった。この理由としては、ストレス負荷による海馬神経新生数の減少に血漿コルチコステロン濃度の増加が寄与するだけでなく、海馬における脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) の減少が寄与している可能性が考えられる。海馬神経新生と BDNF の関係については、海馬への BDNF の慢性的局所投与により、海馬神経新生が増加することが報告されている (Madsen et al., 2005)。また、BDNF 受容体である TrkB を海馬限定的に欠損させたマウスでは海馬神経新生が減少しており、抗うつ薬投与に対して反応を示さないことも報告されている (Li et al., 2008)。その他にも、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) と海馬神経新生の関係が報告されており、抗うつ薬の慢性投与により海馬 VEGF mRNA 量が増加すること、VEGF 受容体である Flk-1 の阻害剤の投与により、抗うつ薬の海馬神経新生増加作用がブロックされることが報告されている (Warner-Schmidt and Duman, 2007)。よって、3 日連続負荷群と間欠的負荷 (2 週間で 4 回) 群の 2 群間において、血漿コルチコステロン濃度の増加以外で海馬神経新生数に影響を及ぼす因子に差があるかを今後検討する必要があると考えられる。

参考文献

- 厚生労働省政策レポート：自殺・うつ病等対策プロジェクトチームとりまとめについて
URL：<http://www.mhlw.go.jp/seisaku/2010/07/03.html>
- Anderson IM. 2000. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord.* 58, 19-36.
- Armario A. 2006. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 5, 485-501.
- Artigas F. 2013. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther.* 137, 119-31.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 29, 450-460.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science.* 311, 864-868.
- Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav.* 73, 261-271.
- Cameron HA, Gould E. 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience.* 61, 203-209.
- Cameron HA, Tanapat P, Gould E. 1998. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience.* 82, 349-354.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. 2005. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 21, 1-14.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313-1317.
- Fanous S, Hammer RP Jr, Nikulina EM. 2010. Short- and long-term effects of intermittent social defeat stress on brain-derived neurotrophic factor expression in mesocorticolimbic brain regions. 167, 598-607.

- Fuchs E, Flügge G. 1998. Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 295-300.
- Gould E, Gross CG. 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci.* 22, 619-623.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 3168-3171.
- Karishma KK, Herbert J. 2002. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci.* 16, 445-453.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A. 1997a. Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl.* 640, 69-72.
- Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH, Bohus B. 1997b. The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci Biobehav Rev.* 21, 775-782.
- Kessler RC. 1997. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol.* 48, 191-214.
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ. 2007. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell.* 131, 391-404.
- Krishnan V, Nestler EJ. 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 455, 894-902.
- Li X, Frye MA, Shelton RC. 2012. Review of pharmacological treatment in mood disorders and future directions for drug development. *Neuropsychopharmacology.* 37, 77-101.
- Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon CH, Kernie SG, Bassel-Duby R, Parada LF. 2008. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron.* 59, 399-412.
- Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingström A. 2000. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry.* 47, 1043-1049.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 20, 9104-9110.
- Mitra R, Sundlass K, Parker KJ, Schatzberg AF, Lyons DM. 2006. Social stress-related

- behavior affects hippocampal cell proliferation in mice. *Physiol Behav.* 89, 123-127.
- Murray F, Smith DW, Hutson PH. 2008. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol.* 583, 115-127.
- Petrik D, Lagace DC, Eisch AJ. 2012. The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology.* 62, 21-34.
- Radley, JJ, Jacobs BL. 2002. 5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res.* 955, 264-267.
- Rao MS, Shetty AK. 2004. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 19, 234-46.
- Razzoli M, Carboni L, Arban R. 2009. Alterations of behavioral and endocrinological reactivity induced by 3 brief social defeats in rats: relevance to human psychopathology. *Psychoneuroendocrinology.* 34, 1405-1416.
- Rush AJ. 2007. Limitations in efficacy of antidepressant monotherapy. *J Clin Psychiatry.* 68 (Suppl 10), 8-10.
- Samuels BA, Hen R. 2011. Neurogenesis and affective disorders. *Eur J Neurosci.* 33, 1152-1159.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.
- Soumier A, Banasr M, Goff LK, Daszuta A. 2010. Region- and phase-dependent effects of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptor activation on adult neurogenesis. *Eur Neuropsychopharmacol.* 20, 336-345.
- Stefanski V. 2000. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. *Psychoneuroendocrinology.* 25, 389-406.
- Thomas RM, Hotsenpiller G, Peterson DA. 2007. Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *J Neurosci.* 27, 2734-2743.
- Trivedi MH, Fava M, Wisniewski SR, Thase ME, Quitkin F, Warden D, Ritz L, Nierenberg AA, Lebowitz BD, Biggs MM, Luther JF, Shores-Wilson K, Rush AJ; STAR*D Study Team. 2006. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N Engl J Med.* 354, 1243-1252.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and

- antidepressant action. *Nat Neurosci.* 9, 519-525.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS. 2007. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 4647-4652.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231, 482-497.
- Wong ML, Licinio J. 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2, 343-351.
- Yamada K, Yagi G, Kanba S. 2003. Clinical efficacy of tandospirone augmentation in patients with major depressive disorder: a randomized controlled trial. *Psychiatry Clin Neurosci.* 57, 183-7.

第2章 Resident-Intruder 系を用いて作製したうつ病モデル動物における tandospirone28 日間投与が海馬神経新生に与える影響

緒言

現在、うつ病の薬物治療には、抗うつ薬として選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRIs: selective serotonin reuptake inhibitors) が使用されている。SSRIs は従来使用されてきた三環系抗うつ薬に比べて、心毒性や起立性低血圧などの副作用が少なく、安全性・耐容性の面で優れていることから、うつ病治療の第 1 選択薬として用いられている (Anderson, 2000)。しかしながら、SSRIs は投与開始から薬効発現まで 2~4 週間かかる (Wong and Licinio, 2001) ことや、30~40%の症例には効果が発現しないという治療抵抗性うつ病の存在が問題となっている (Kato and Chang, 2013)。これらの治療抵抗性うつ病患者に対して抗うつ薬の高用量投与や、抗うつ薬治療と精神療法の併用療法といった治療法が行われているが十分な効果を示すという確証は得られていない (Anderson et al., 2008; Freemantle et al., 2000)。また、治療抵抗性うつ病患者に対して、電気けいれん療法が有効であるという報告もあるが、治療効果を持続させるために繰り返し行う必要があること、治療期間が長期にわたるといった問題点がある。臨床におけるこれらの問題点は、うつ病治療の分野において早急に解決すべき課題であるといえる。

第 1 章でも述べたように、近年の研究の中で、海馬神経新生とうつ病の関係が注目されている。海馬神経新生はストレス負荷により減少し (Gould et al., 1998)、ストレスによる海馬神経新生減少は、SSRIs の投与により回復する (Santarelli et al., 2003) ことが報告されている。また、この神経新生回復作用は、SSRIs を 2 週間以上長期投与した時のみ見られる現象であり、急性および亜慢性投与では見られないことが報告されている (Duman et al., 1997; Malberg et al., 2000)。このことは臨床における抗うつ薬の薬効発現までのタイムラグに海馬神経新生の回復が関与している可能性を示唆している。以上のことから、海馬神経新生は、うつ病発症メカニズムだけでなく抗うつ薬の薬効発現にも寄与すると考えられている。

抗うつ薬による海馬神経新生の増加がどのようなメカニズムを介しているかについて Santarelli ら (2003) は、慢性軽度ストレスを負荷したマウスで見られる海馬神経新生の減少は fluoxetine (FLX) の 28 日間投与により改善するが、5-HT_{1A} 受容体欠損マウスではその反応が見られないことを報告している。これは FLX による海馬神経新生の増加が 5-HT_{1A} 受容体を介する反応である可能性を示唆している。また、5-HT_{1A} 受容体リガンドと海馬神経新生の関連については、5-HT_{1A} 受容体アゴニストである 8-OH-DPAT の投与によ

りラット海馬の神経新生が増加 (Banasr et al., 2004) し、5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストである WAY100635 の投与により減少する (Radley and Jacobs, 2002) という報告がある。しかし、これらのリガンドは研究用の試薬であり、臨床応用されている 5-HT_{1A} 受容体リガンドが海馬神経新生にどのような影響を及ぼすかはほとんど報告されていないのが現状である。

Tandospirone (TDS) は、5-HT_{1A} 受容体部分アゴニスト作用をもつアザピロン系の抗不安薬であり、現在本邦の臨床で不安障害治療薬として広く用いられている。臨床場面では、うつ病患者が不安障害を併発していることが多く (Klenk et al., 2011)、そのような場合、TDS やベンゾジアゼピン (BZP) 系薬物などの抗不安薬と抗うつ薬を併用して治療に用いるケースが多い (Davidson, 2010)。本邦の臨床では BZP 系抗不安薬が併用されることが多いが、BZP 系抗不安薬は薬物依存性、鎮静作用、認知障害といった副作用を示すことから、特に高齢者の治療では大きな問題点となっている (Chouinard, 2004; Chamberlain et al., 2007; Lader et al., 2009; Okamoto et al., 2013)。また、動物研究において FLX と BZP 系抗不安薬である diazepam を併用投与すると、FLX の海馬神経新生増加作用がブロックされることが報告されている (Wu and Castren, 2009; Sun et al., 2013)。このことは、BZP 系抗不安薬の併用は抗うつ薬の治療効果発現を遅延させる可能性を示唆している。BZP 系抗不安薬に関する報告とは対照的に、アザピロン系抗不安薬は、上記のような副作用の発現がほとんどないことが知られている (Suzuki et al., 1993; Evans et al., 1994; Nishitsuji et al., 2004)。また、SSRIs と TDS の同種同効薬である buspirone の併用により、抗うつ作用が増強されることが大規模臨床試験で明らかにされており (Trivedi et al., 2006)、三環系抗うつ薬であるクロミプラミンと TDS の併用は、抗うつ作用の発現を早めることも報告されている (Yamada et al., 2003)。また、TDS と同じアザピロン系 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストである gepirone は、抗不安作用だけでなく抗うつ作用も有することが臨床的に確かめられている (Blier and Ward, 2003)。これらのことから、TDS をはじめとする 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストは、うつ病治療の選択肢を広げる重要な薬剤であると考えられる。

上記の研究報告から、TDS の抗うつ作用の発現には海馬神経新生の増加が関与していると仮説を立てた。私たちの研究室では予備的に、非ストレス条件下のラットに TDS を 2 週間反復投与して海馬神経新生へ与える影響を検討した。その結果、海馬歯状回顆粒細胞下帯 (subgranular zone) において、神経新生数のマーカーである doublecortin (DCX) 陽性細胞数が用量依存的に有意に増加しており、海馬における神経新生数を増加させることが示唆された。

この予備的研究の結果および第 1 章で得られた知見を踏まえて本章では、TDS を 28 日間反復投与したラットに対して Resident-Intruder 系の間欠的負荷 (2 週間で 4 回) を行い、

ストレスによる反応が TDS の長期投与によってブロックされるかどうかを検討した。ポジティブコントロールとして SSRI である FLX を用いて同様の実験を行い、TDS と FLX それぞれの単剤投与結果を比較することで、TDS の海馬神経新生増加作用について検討を行った。

方法

1-1. 実験動物

第 1 章 1-1. と同様である。

1-2. 薬物投与

ラット搬入の 1 週間後から、saline、fluoxetine hydrochloride (FLX, 5mg/ml in saline, LKT Laboratories) もしくは tandospirone citrate (TDS, 10mg/ml in saline, 大日本住友製薬より寄贈) を 1ml/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間連続で腹腔内投与した。投与量は、週に 1 回体重を測定して補正した。後述する心理社会的ストレス負荷の有無により、各動物を control 群、stress 群、control + FLX 群、control + TDS 群、stress + FLX 群、stress + TDS 群の 6 群に分類した。

1-3. Resident-Intruder 系を用いた心理社会的ストレス負荷

1-3-1. 飼育環境

Resident/Intruder(居住者/侵入者)paradigm(R/I 系)で用いる Intruder ラットとして、搬入時 6 週齢の SD 雄性ラットを中型プラスチックケージ(幅 23cm×奥行 14cm×高さ 12cm)で単独飼育した。Resident colony は第 1 章 1-2-1 と同様に作製した。

1-3-2. 衝動性 training

第 1 章 1-2-2. と同様である。

1-3-3. 心理社会的ストレス負荷実験

心理社会的ストレス負荷方法は、第 1 章 1-2-3. と同様である。心理社会的ストレス負荷回数は、第 1 章で得られた結果より、薬物投与 3 週目から間欠的 (2 週間で 4 回) に行った。

1-4. 灌流固定および凍結切片作製

本研究において神経新生の指標として用いている DCX は、神経幹細胞の細胞増殖開始から約 1 週間で発現し始めるタンパクであることが報告されている。そのため第 1 章では、ストレス負荷直後では海馬神経新生に与える影響が観察できないと考え、ストレス負荷 1 週間後に灌流固定を行った。本章では間欠的負荷 (2 週間で 4 回) のプロトコールを選択しているため、最終ストレス負荷の直後においても、海馬神経新生に対する影響が現れていると考えられる。この可能性を検討するための予備研究として、saline28 日間投与を行い、投与終了 1 日後、もしくは 7 日後に灌流固定する群の 2 群に分け、それぞれの DCX 陽性細胞数を調べた所、いずれのタイミングで評価した場合においても、control 群に比べ stress 群で有意な減少を認めた。そのため、本章では第 1 章と異なりストレス負荷 1 日後に灌流固定を行った。

凍結マイクロトーム (Leica) を用いて 40 μ m の冠状凍結切片を作製した。その他の灌流固定および凍結切片作製法については第 1 章 1-4. と同様である。

1-5. 免疫組織学的染色

海馬全域の連続冠状切片を、切片 8 枚おきに 1 枚抽出し doublecortin (DCX) 抗体にて染色した。DCX 染色については、まず切片を 0.1M PBS で洗い、0.3% H_2O_2 /メタノールに 30 分間漬け内因性ペルオキシダーゼを阻害した。洗浄後、5%正常ウマ血清 (Vector Laboratories) で 1 時間インキュベートし、二次抗体の非特異的結合を防いだ。切片は一次抗体 (ヤギ由来抗 DCX ポリクローナル抗体、1 : 250、Santa Cruz 社) で 4 $^{\circ}$ C にて一晩インキュベートした。翌日、切片を 0.1M PBS で数回洗い、ビオチン化二次抗体 (ウマ由来ビオチン化抗ヤギ IgG 抗体、1 : 200、Vector Laboratories) で 2 時間インキュベートし、洗浄後ストレプトアビジン/ペルオキシダーゼ複合体 (1 : 300、Dako 社) で 1 時間インキュベートした。洗浄後、diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector) を 5 分前後で反応させ、1 時間風乾させた。切片はヘマトキシリンで対比染色し、アルコールで段階的に脱水、キシレンで透徹した後、最後にエンテランニュー (Merck) にて封入した。

1-6. doublecortin (DCX)陽性細胞数の定量

各ラットの海馬歯状回顆粒細胞下帯 (subgranular zone: SGZ) における DCX 陽性細胞数の定量は、StereoInvestigator software (MBF Bioscience) をインストールした、Z 軸電動ステージ搭載デジタルイメージング顕微鏡 (ECLIPSE 80i, Nikon) を用いて行った。免疫組織学的染色を行った各切片の左脳海馬における DCX 陽性細胞数を、拡大率 400 倍の顕微鏡像を基に、実験条件に対して blind である観察者が定量した。海馬における神経細胞の立体構造学的定量法として West ら (1991) の提案する Optical Fractionator 法を選択し、以下の等式に基づいて総陽性細胞数 (N) を概算した。

$$N = \frac{t}{h} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{ssf} \times \Sigma Q^{-}$$

- ΣQ^{-} : 実際にカウントした陽性細胞数の和
t : 凍結切片作製時の切片の厚さ [40 μ m]
h : Optical disector height [20 μ m]
asf : area sampling fraction = counting frame の大きさ (75 μ m \times 75 μ m) \div sampling grid の大きさ (250 μ m \times 150 μ m) [0.15]
ssf : section sampling fraction = 切片を何枚に 1 枚抽出したか [1/8]

1-7. 統計学的解析

Control 群、Stress 群、Control + fluoxetine 群、Control + tandospirone 群、Stress + fluoxetine 群、Stress + tandospirone 群の 6 群間における DCX 陽性細胞数に差があるかどうかについては Two-way ANOVA を用いて解析を行った。ANOVA で有意差が認められ場合、Post hoc analysis として Bonferroni/Dunn test を行った。全てのデータは平均値 \pm S.E. で表示した。なお危険率が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

結果

R-I系を用いた心理社会的ストレス負荷および fluoxetine (FLX) または tandospirone (TDS) の長期投与が doublecortin (DCX) 陽性細胞数に与える影響

間欠的なストレスの最終負荷1日後の海馬歯状回顆粒細胞下帯における DCX 陽性細胞数について6群間で Two way ANOVA を行ったところ、薬物投与の有無 ($p = 0.004$)、薬物投与×ストレス負荷の有無の相互作用 ($p = 0.005$) において有意な差を認めた。Post hoc analysis として Bonferroni/Dunn test を行ったところ、stress + saline 群は control + saline 群に比べて DCX 陽性細胞数の有意な減少を認めた ($p = 0.003$)。また stress + FLX 群および stress + TDS 群は stress + saline 群に比べて、DCX 陽性細胞数に有意に増加していたが ($p = 0.002$, $p = 0.001$)、control + saline 群との間には有意な差を認めなかった。

また control + FLX 群と control + TDS 群の間、および stress + FLX 群と stress + TDS 群の間には、有意な差を認めなかった。

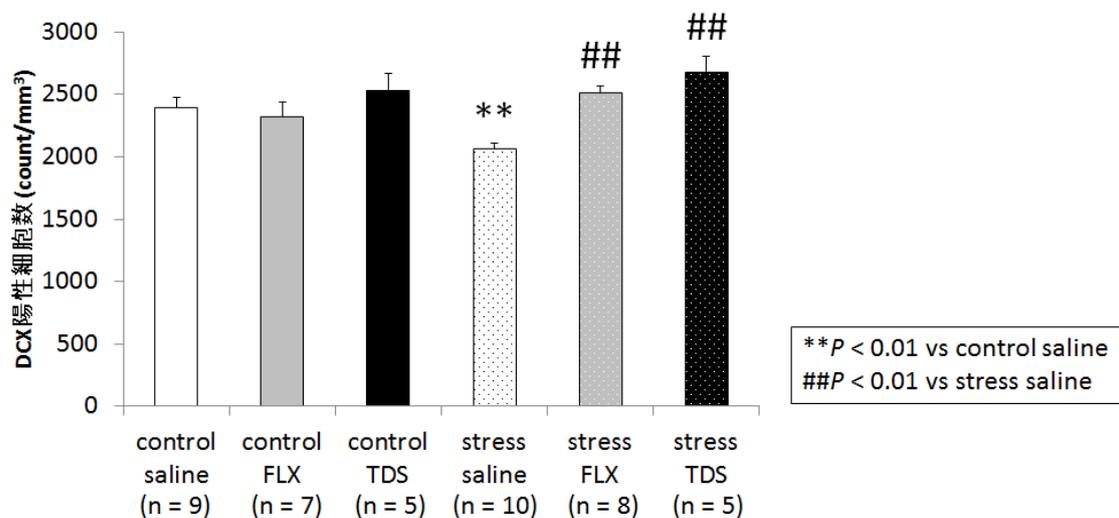


Fig. 1 TDS 慢性投与が海馬歯状回 DCX 陽性細胞数に与える影響

考察

本章では、fluoxetine (FLX) もしくは tandospirone (TDS) の 28 日間投与を行い、R-I 系を用いた心理社会的ストレスを間欠的 (2 週間で 4 回) に負荷したラットにおける海馬神経新生の変化について比較検討した。

最初に R-I 系による間欠的なストレス負荷が、海馬歯状回顆粒細胞下帯における DCX 陽性細胞数に及ぼす影響を評価したところ、Stress 群が Control 群に比べて有意な DCX 陽性細胞数の減少が認められた。この結果は、第 1 章で得られた知見と同様であり、心理社会的ストレス負荷は、海馬神経新生を減少させるという過去の研究結果とも一致している (Thomas et al., 2007)。

次に R-I 系による間欠的なストレス負荷に対する FLX28 日間投与の影響について海馬歯状回での DCX 陽性細胞数を Stress 群と Stress + FLX 群で比較すると、Stress + FLX 群は、Stress 群に比べて有意な DCX 陽性細胞数の増加が認められた。また、同様の比較を Control 群と Stress + FLX 群の 2 群間で行ったところ、有意な差は認められなかった。このことは、間欠的な心理社会的ストレス負荷による海馬歯状回での神経新生減少が、FLX の長期投与により回復したことを示唆しており、この結果は、FLX 慢性投与がストレスによる神経新生減少をブロックするという過去の報告と一致している (Santarelli et al., 2003)。すなわち、FLX をポジティブコントロールに用いることで実験系としての妥当性が保証されたことを示している。

そこで TDS28 日間投与の影響を調べた所、FLX 投与群で得られた結果と同様に、Stress + TDS 群は Stress 群に比べて有意な DCX 陽性細胞数の増加を認めた。また、Control 群と Stress + TDS 群の 2 群間では有意な差は認められなかった。さらに、Control + FLX 群と Control + TDS 群の間にも有意な差は認められず、Stress + FLX 群と Stress + TDS 群の間においても同様であった。このことは、TDS の長期投与は、間欠的な心理社会的ストレス負荷による海馬歯状回での神経新生減少を回復することを示唆すると共に、その回復レベルが FLX と同様であったことを示しており、TDS は海馬神経新生の増加を介して抗うつ作用を示す可能性が考えられる。

TDS が海馬神経新生を増加させるメカニズムは未解明だが、いくつかの可能性が考えられる。一つ目として、5-HT_{1A} 自己受容体の脱感作の関与が考えられる。5-HT_{1A} 自己受容体は、前シナプスである線条体の細胞体および樹状突起に存在しており、シナプス間隙におけるセロトニン濃度の増加に反応してネガティブフィードバックを行うことでセロトニン

濃度を制御している (Gardier et al., 1996)。本研究で用いた TDS をはじめとするアザピロン系抗不安薬は、後シナプスに存在する 5-HT_{1A} 受容体には部分アゴニストとして作用し、前シナプスに存在する 5-HT_{1A} 自己受容体にはフルアゴニストとして作用することが知られている。過去の報告によると、TDS 慢性投与は、縫線核に局在している前シナプス 5-HT_{1A} 自己受容体の電気生理学的反応を減弱させるが、海馬に局在している後シナプス 5-HT_{1A} 受容体には影響を与えないことが報告されている (Godbout et al., 1991)。このことは、TDS の慢性投与は、5-HT_{1A} 自己受容体の脱感作を引き起こし、ネガティブフィードバックを抑制することでシナプス間隙のセロトニン濃度を増加させることを示唆している。5-HT_{1A} 自己受容体の脱感作は SSRI の薬効発現にも重要なカスケードであると同時に、海馬神経新生の増加に寄与すると考えられている。

二つ目として、後シナプス 5-HT_{1A} 受容体の関与が考えられる。後シナプス 5-HT_{1A} 受容体は、海馬、扁桃核、皮質辺縁系などの大脳辺縁系に広く存在しており、5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストの全身投与により刺激されることが知られている (Pazos and Palacios, 1985; Pompeiano et al., 1992; Artigas, 2013)。また、過去の研究において、海馬歯状回に存在する後シナプス 5-HT_{1A} 受容体が海馬神経新生の増加に関与していることが報告されている (Jacobs et al., 2000; Banasr et al., 2004; Soumier et al., 2010)。

これらのことから、TDS 慢性投与による 5-HT_{1A} 自己受容体の脱感作がシナプス間隙でのセロトニン濃度を増加させ、海馬歯状回に存在する後シナプス 5-HT_{1A} 受容体において、TDS と協奏的な作用を示すことにより海馬神経新生が増加したというメカニズムが考えられる。今後は、このメカニズムが TDS 長期投与による海馬神経新生増加に関係しているかどうかを確認するために、縫線核における 5-HT_{1A} 自己受容体レベルや海馬歯状回におけるセロトニン濃度を検討していく必要があるだろう。

参考文献

- Anderson IM. 2000. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord.* 58, 19-36.
- Anderson IM, Ferrier IN, Baldwin RC, Cowen PJ, Howard L, Lewis G, Matthews K, McAllister-Williams RH, Peveler RC, Scott J, Tylee A. 2008. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. *J Psychopharmacol.* 22, 343-396.
- Artigas F. 2013. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther.* 137, 119-31.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 29, 450-460.
- Blier P, Ward NM. 2003. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry.* 53, 193-203.
- Chamberlain SR, Müller U, Deakin JB, Corlett PR, Dowson J, Cardinal RN, Aitken MR, Robbins TW, Sahakian BJ. 2007. Lack of deleterious effects of buspirone on cognition in healthy male volunteers. *J. Psychopharmacol.* 21, 210-215.
- Chouinard G. 2004. Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, and rebound. *J. Clin. Psychiatry.* 65 (Suppl 5), 7-12.
- Davidson JR. 2010. Major depressive disorder treatment guidelines in America and Europe. *J. Clin. Psychiatry.* 71 (Suppl E1), e04.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. 1997. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 54, 597-606.
- Evans SM, Troisi JR 2nd, Griffiths RR. 1994. Tansospirone and alprazolam: comparison of behavioral effects and abuse liability in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 683-694.
- Freemantle N, Anderson IM, Young P. 2000. Predictive value of pharmacological activity for the relative efficacy of antidepressant drugs. Meta-regression analysis. *Br J Psychiatry.* 177, 292-302.
- Gardier AM, Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Artigas F. 1996. Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs:

- recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 10, 16–27.
- Godbout R, Chaput Y, Blier P, de Montigny C. 1991. Tansospirone and its metabolite, 1-(2-pyrimidinyl)-piperazine--I. Effects of acute and long-term administration of tansospirone on serotonin neurotransmission. *Neuropharmacology.* 30, 679–690.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 3168-3171.
- Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry.* 5, 262–269.
- Kato M, Chang CM. 2013. Augmentation treatments with second-generation antipsychotics to antidepressants in treatment-resistant depression. *CNS Drugs.* 27(Suppl 1), S11-9.
- Klenk MM, Strauman TJ, Higgins ET. 2011. Regulatory Focus and Anxiety: A Self-Regulatory Model of GAD-Depression Comorbidity. *Pers. Individ. Dif.* 50, 935-943.
- Lader M, Tylee A, Donoghue J. 2009. Withdrawing benzodiazepines in primary care. *CNS Drugs.* 23, 19-34.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 20, 9104-10.
- Nishitsuji K, To H, Murakami Y, Kodama K, Kobayashi D, Yamada T, Kubo C, Mine K. 2004. Tansospirone in the treatment of generalised anxiety disorder and mixed anxiety-depression: results of a comparatively high dosage trial. *Clin. Drug Investig.* 24, 121-126.
- Okamoto R, Itoh Y, Murata Y, Kobayashi D, Hosoi M, Mine K. 2013. Reduction of group II metabotropic glutamate receptors during development of benzodiazepine dependence. *Pharmacology.* 91, 145-152.
- Pazos A, Palacios JM. 1985. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* 346, 205–230.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. 1992. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci.* 12, 440–453.
- Radley JJ, Jacobs BL. 2002. 5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res.* 955, 264-267.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. 2003. Requirement of hippocampal

- neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.
- Soumier A, Banasr M, Goff LK, Daszuta A. 2010. Region- and phase-dependent effects of 5-HT(1A) and 5-HT(2C) receptor activation on adult neurogenesis. *Eur Neuropsychopharmacol.* 20, 336–345.
- Sun Y, Evans J, Russell B, Kydd R, Connor B. 2013. A benzodiazepine impairs the neurogenic and behavioural effects of fluoxetine in a rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology.* 72, 20-28.
- Suzuki M, Uchiumi M, Murasaki M. 1993. Effects of tandospirone, a 5-HT1A receptor-related anxiolytic, on daytime sleepiness and psychomotor functions: a comparative double-blind study with diazepam. *Yakubutsu Seishin Kodo* 13, 213–224.
- Thomas RM, Hotsenpiller G, Peterson DA. 2007. Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *J Neurosci.* 27, 2734-2743.
- Trivedi HM, Fava M, Wisniewski RS, Thase EM, Quitkin F, Warden D, Ritz L, Nierenberg AA, Lebowitz DB, Biggs MM, Luther FJ, Shores-Wilson K, Rush JA. 2006. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N. Engl. J. Med.* 354, 1243-1252.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231, 482-497.
- Wong ML, Licinio J. 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2, 343-351.
- Wu X, Castrén E. 2009. Co-treatment with diazepam prevents the effects of fluoxetine on the proliferation and survival of hippocampal dentate granule cells. *Biol. Psychiatry.* 66, 5-8.
- Yamada K, Yagi G, Kanba S. 2003. Clinical efficacy of tandospirone augmentation in patients with major depressive disorder: a randomized controlled trial. *Psychiatry Clin Neurosci.* 57, 183-187.

第3章 Resident-Intruder 系を用いて作製したうつ病モデル動物における fluoxetine と tandospirone の併用投与による増強療法の海馬神経新生に与える影響

緒言

第2章でも述べたように、抗うつ薬の薬効発現にはタイムラグが存在する (Wong and Licinio, 2001) ことや、抗うつ薬単剤で治療を行った患者の 30~40%には効果が発現しないという治療抵抗性うつ病の存在が問題となっている (Rush et al., 2006; Kato and Chang, 2013)。そのため、臨床におけるこれらの問題点を解決するために、うつ病の病態メカニズムの解明と、より優れたうつ病治療法の開発が強く望まれている。

現在の臨床において、抗うつ薬単剤治療が無効であった場合、その対処法として以下のような治療戦略が推奨されている。服用していた抗うつ薬を中止し、別の抗うつ薬に切り替える方法 (変更療法)。別の抗うつ薬を併用する方法 (併用療法)。抗うつ作用を持たない薬物を追加して抗うつ薬の作用を増強する方法 (増強療法) の3つである (Rush et al., 2011)。この中でも 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストを用いた「増強療法」の有効性については複数のエビデンスがある。

うつ病の大規模臨床試験である STAR*D (Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression) 研究は、SSRIs 単剤治療無効であった患者に対して、5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストである buspirone を併用すると、うつ病症状が改善することを報告している (Trivedi et al., 2006)。その他にもいくつかの臨床試験において、5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストと SSRIs の併用が、SSRIs の抗うつ作用の増強や発現の早期化につながることを報告している (Yamada et al., 2003; Artigas, 2013)。このように増強療法は、抗うつ薬単剤治療よりも優れた治療法であるといえるが、抗うつ作用が増強する詳細なメカニズムに関しては未だに明らかになっていない。

抗不安薬として使用されているアザピロン系 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストである buspirone や gepirone は、抗不安作用だけでなく、抗うつ作用も有することが臨床的に確かめられている (Blier and Ward, 2003)。第2章において、本邦で臨床使用されているアザピロン系 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストである Tandospirone (TDS) の 28 日間投与は、SSRIs である fluoxetine (FLX) と同等のレベルでストレス負荷による海馬神経新生の減少を回復した。このことは、TDS を含むアザピロン系 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストの抗うつ作用発現メカニズムには、海馬神経新生増加作用が寄与していることを示唆している。こ

これらの結果から、私たちは 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストと SSRI_s の併用による抗うつ作用増強メカニズムには、海馬神経新生の増加作用の相加的・相乗的促進が関係していると仮説を立てた。

そこで本研究では、FLX と TDS 併用投与を 28 日間行ったラットに対して Resident-Intruder 系の間欠的負荷 (2 週間で 4 回) を行った。この併用投与による反応と、第 2 章で得た各薬剤の単独投与による結果とを比較することで、両薬剤の併用による増強療法としての基礎的有効性を明らかにすることを目的とした。

方法

1-1. 実験動物

第2章 1-1. と同様である。

1-2. 薬物投与

ラット搬入の1週間後から、saline、fluoxetine hydrochloride (FLX, 5mg/ml in saline, LKT Laboratories)、tandospirone citrate (TDS, 10mg/ml in saline, 大日本住友製薬より寄贈) もしくは FLX と TDS の併用投与を行なった。単剤投与群では、1ml/kg の用量で1日1回、28日間連続で腹腔内投与した。併用投与群では、FLX と TDS をそれぞれ 1ml/kg の用量で1日1回、28日間連続で腹腔内投与した。なお、併用投与を行う際には、連続した腹腔内投与による腹部への痛み刺激を避けるために FLX 投与から 30 分後に TDS を投与した。投与量は、週に1回体重を測定して補正した。後述する心理社会的ストレス負荷の有無により、各動物を Control 群、Stress 群、Control + FLX 群、Control + TDS 群、Control + FLX + TDS 群、Stress + FLX 群、Stress + TDS 群、Stress + FLX + TDS 群の8群に分類した。

1-3. Resident/Intruder 系を用いた心理社会的ストレス負荷

1-3-1. 飼育環境

第2章 1-3-1. と同様である。

1-3-2. 衝動性 training

第1章 1-3-2. と同様である。

1-3-3. 心理社会的ストレス負荷実験

第2章 1-3-3. と同様である。

1-4. 灌流固定および凍結切片作製

第2章 1-4. と同様である。

1-5. 免疫組織学的染色

第 2 章 1-5. と同様である。

1-6. doublecortin (DCX)陽性細胞数の定量

第 2 章 1-6. と同様である。

1-7. 統計学的解析

FLX および TDS の単剤、併用投与が DCX 陽性細胞数に与える影響を統計学的に確認するため、control 条件と stress 条件の 2 群に大別した。そして control 群、control + FLX 群、control + TDS 群、control + FLX + TDS 群の 4 群間および stress 群、stress + FLX 群、stress + TDS 群、stress + FLX + TDS 群の 4 群間において DCX 陽性細胞数に差があるかどうかについては Two-way ANOVA を用いて解析を行った。ANOVA で有意差が認められ場合、Post hoc analysis として Bonferroni/Dunn test を行った。全てのデータは平均値±S.E.で表示した。なお危険率が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

結果

tandospirone (TDS) と fluoxetine (FLX) 併用投与が R-I系を用いた心理社会的ストレス負荷 1 日後の doublecortin (DCX) 陽性細胞数に与える影響

control 条件の 4 群間において、間欠的なストレスの最終負荷 1 日後の海馬歯状回顆粒細胞下帯における DCX 陽性細胞数を Two-way ANOVA を行ったところ、FLX の有無 ($p < 0.001$)、TDS の有無 ($p < 0.001$)、FLX×TDS の相互作用 ($p < 0.001$) において有意な差が認められた。Post hoc analysis として Bonferroni/Dunn test を行ったところ、control + FLX + TDS 群では control + saline 群、control + FLX 群および control + TDS 群に比べて DCX 陽性細胞の有意な増加が認められた (いずれも $p < 0.001$)。また、control + saline 群、control + FLX 群および control + TDS 群の 3 群間には有意な差は認められなかった (Fig. 1)。

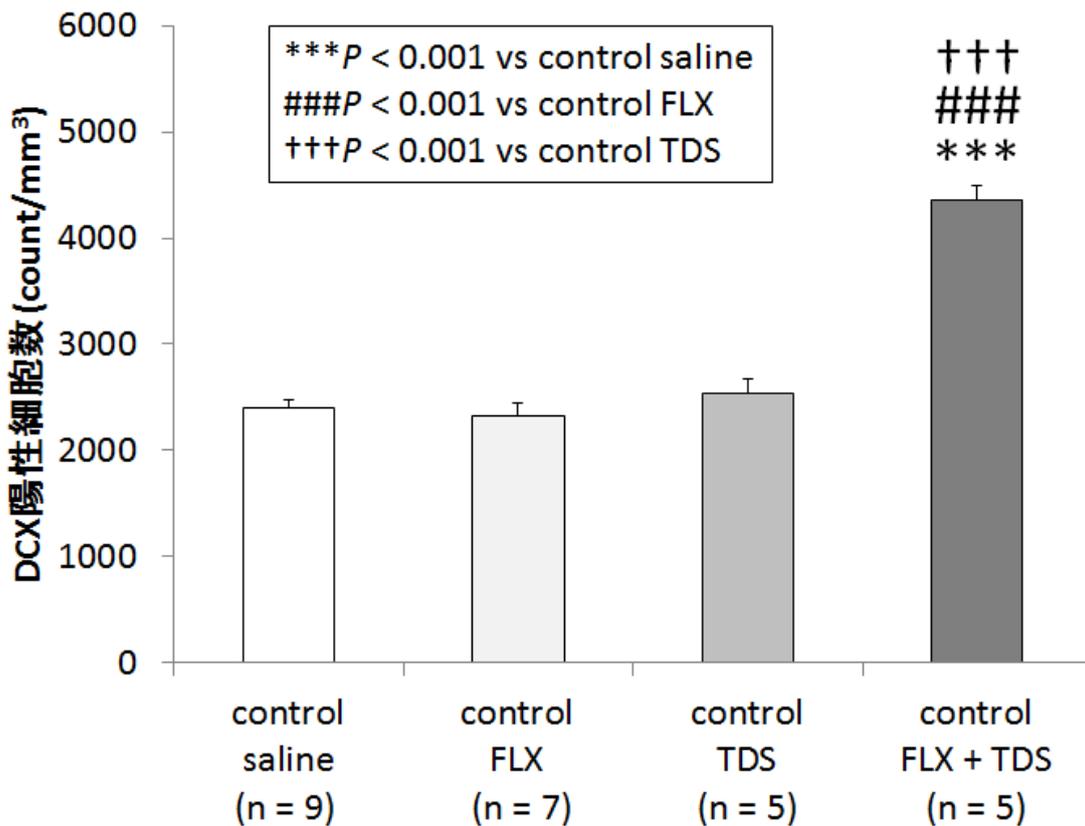


Fig. 1 control 条件において FLX と TDS の併用投与が海馬歯状回 DCX 陽性細胞数に与える影響

stress 条件の 4 群間において Two-way ANOVA を行ったところ、control 群と同様に FLX の有無 ($p < 0.001$)、TDS の有無 ($p < 0.001$)、FLX×TDS の相互作用 ($p < 0.001$) において有意な差が認められた。Post hoc analysis として Bonferroni/Dunn test を行ったところ、stress + FLX + TDS 群は stress + saline 群、stress + FLX 群および stress + TDS 群に比べて DCX 陽性細胞の有意な増加が認められた (いずれも $p < 0.001$)。

stress + FLX 群と stress + TDS 群は、stress + saline 群に比べて DCX 陽性細胞の有意な増加が認められた ($p = 0.01$ 、 $p = 0.03$)が、stress + FLX 群と stress + TDS 群の間には有意な差は認められなかった (Fig. 2)。

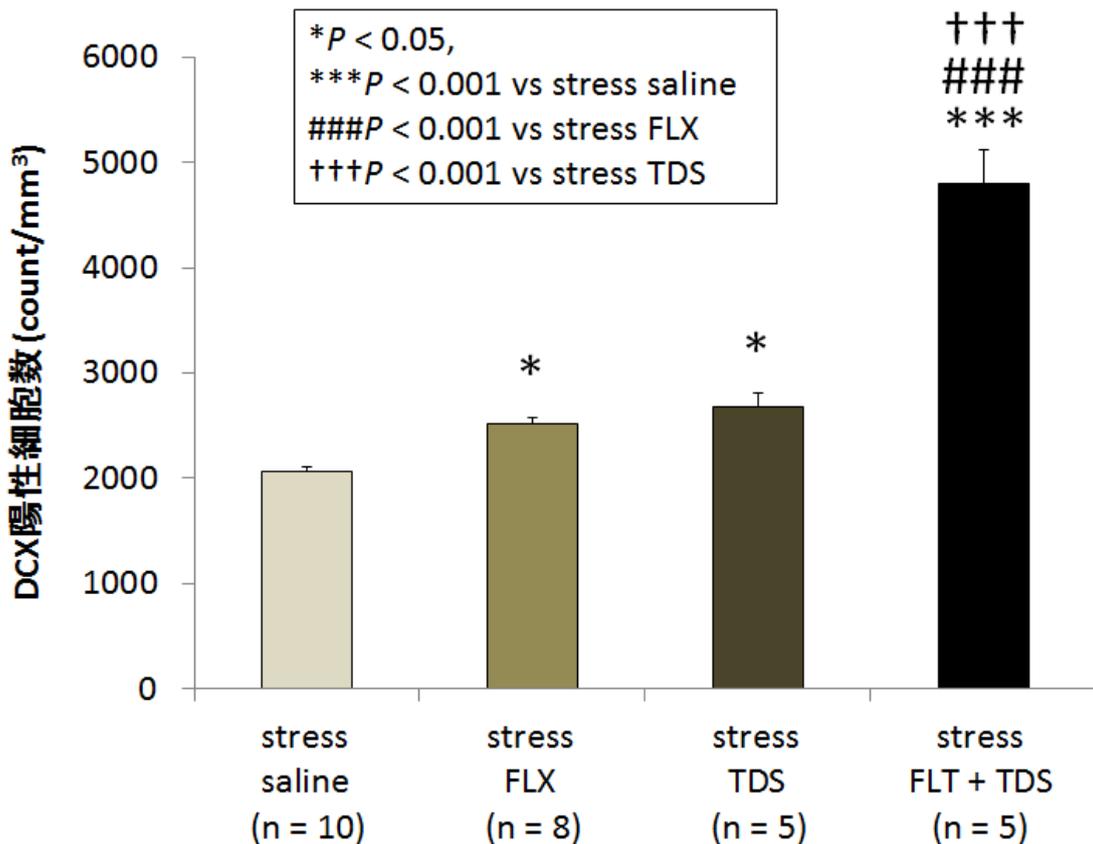


Fig. 2 心理社会的ストレス負荷条件において FLX と TDS の併用投与が海馬歯状回 DCX 陽性細胞数に与える影響

考察

本章では、fluoxetine (FLX) と tandospirone (TDS) の 28 日間併用投与を行い、R-I 系を用いた心理社会的ストレスを間欠的 (2 週間で 4 回) に負荷したラットにおける海馬神経新生の変化について比較検討した。

FLX と TDS の 28 日間併用投与が、海馬歯状回顆粒細胞下帯における DCX 陽性細胞数に及ぼす影響を確かめるために control 条件下と stress 条件下の 2 つの集団に大別し、それぞれの集団において統計学的検討を行ったところ、いずれの集団においても FLX + TDS 群は saline 群、FLX 群および TDS 群に比べて、DCX 陽性細胞数の有意な増加が認められた。このことは、各薬剤単剤の海馬神経新生増加作用が、FLX と TDS の 28 日間併用投与により増強されたことを示唆している。また、stress 条件下において、stress + FLX 群と stress + TDS 群は、stress + saline 群に比べ、DCX 陽性細胞の有意な増加が認められた。これは、第 2 章で得られた結果と同様であり、FLX と TDS の 28 日間投与が、心理社会的ストレス負荷による海馬神経新生の減少を回復させたことを示唆している。

FLX と TDS の併用投与による海馬神経新生増加作用の増強メカニズムには、第 2 章でも述べたように前シナプス 5-HT_{1A} 自己受容体脱感作と、後シナプス 5-HT_{1A} 受容体の関与が考えられる。このメカニズムに注目する根拠としては、「増強療法」の優れたうつ病治療効果の発現に同様のメカニズムの関与を示唆する報告がある。Artigas の総説 (2013) では、βアドレナリン受容体/5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストであるピンドロールが、5-HT_{1A} 自己受容体のブロック作用により併用した抗うつ薬の抗うつ作用を促進することが述べられている。ピンドロールの急性投与は、5-HT_{1A} 自己受容体のネガティブフィードバック機能を抑制し、シナプス間隙のセロトニン濃度を増加させることで抗うつ薬の薬効を増強させると考えられている。第 2 章で得られた知見を交えて考察すると、TDS 長期投与による海馬神経新生増加には、5-HT_{1A} 自己受容体の脱感作が関わっており、ピンドロール急性投与と同様に FLX の抗うつ作用の促進に寄与している可能性が考えられる。また FLX をはじめとする SSRI の抗うつ作用発現には、セロトニントランスポーター阻害作用によるシナプス間隙のセロトニン濃度の増加と、長期投与による 5-HT_{1A} 自己受容体の脱感作が重要であり、セロトニン神経におけるこのような変化は海馬神経新生の増加にも寄与している。これらのことから、FLX と TDS の併用投与は、FLX による 5-HT_{1A} 自己受容体脱感作を TDS が加速することにより、シナプス間隙のセロトニン濃度の増加作用が増強され、海馬神経新生の増加が著しく促進されたのではないかと考えられる。

FLX と TDS の併用投与による海馬神経新生の著しい増加に対する後シナプス 5-HT_{1A} 受

容体の関与については、第2章でも述べたように、海馬歯状回の後シナプス 5-HT_{1A} 受容体の刺激が関与していると考えられる (Jacobs et al., 2000; Banasr et al., 2004; Soumier et al., 2010)。Nishikawa ら (2007) は、恐怖条件付けラットに対する FLX と TDS の併用投与による影響を検討しており、両者の併用による抗不安作用の増強には縫線核の 5-HT_{1A} 自己受容体ではなく、後シナプス 5-HT_{1A} 受容体に対する協奏的な刺激作用が重要であると報告している。また不安行動と海馬神経新生の関連について、Snyder ら (2011) は、海馬神経新生欠損マウスへのストレス負荷が新奇環境下食餌行動抑制試験 (Novelty-suppressed feeding test) の不安行動に与える影響を調べている。その結果、非ストレス条件下では、海馬神経新生を欠損させていない正常マウスと海馬神経新生欠損マウス間では不安行動に差が認められなかった。しかしストレス条件下では、海馬神経新生欠損マウスにおいて有意な不安行動の増加が認められたことを報告している。これらの報告から、海馬神経新生と不安行動との間に密接な関係があることが示唆され、FLX と TDS の併用投与による後シナプス 5-HT_{1A} 受容体の協奏的な刺激作用が、海馬神経新生の著しい増加を引き起こしたと考えられる。

FLX と TDS 併用投与による海馬神経新生増加促進に関与する可能性のある他の因子としてドパミンの関与が挙げられる。ドパミンは気分・動機・行動の制御に関わっており、臨床的うつ症状だけでなく海馬神経新生にも関与していると考えられている (Borta and Hoglinger, 2007; Campbell et al., 2010)。過去の研究では、ドパミン D2 受容体ブロッカー作用を持つ非定型抗精神病薬である quetiapine の投与により、海馬神経新生が増加することが報告されている (Luo et al., 2005)。また、同様の作用を持つ非定型抗精神病薬である olanzapine を長期投与すると、海馬と前頭皮質において細胞増殖のレベルが増加することも報告されている (Kodama et al., 2004)。また Yoshino ら (2002) の研究によると、TDS は 5-HT_{1A} 受容体を介して前頭皮質におけるシナプス間隙ドパミン濃度を増加させることが報告されており、この現象は FLX 投与でも確認されている。そして同様の実験を FLX と TDS の併用投与で行うと、各薬剤の単剤投与に比べて有意なシナプス間隙ドパミン濃度の増加が見られることが報告されている。前頭皮質は、海馬の領域でも特に感情や情動を司る腹側海馬との間に強い情報入出力の関係を持っていることが知られており (Sahay and Hen, 2007)、上記のようなドパミン神経系の変化が、FLX と TDS 併用投与による海馬神経新生増加の促進に関与している可能性が考えられる。

もう1つの可能性として、薬物動態学的な相互作用の影響を考慮する必要がある。SSRIs の中にはシトクロム P450 を阻害する薬剤もあり、FLX は CYP2D6 を阻害する作用を持つことが知られている。そして、TDS は主として CYP3A4 により、また CYP2D6 でも代謝されるため、FLX の併用による TDS の血中濃度の上昇が、海馬神経新生増加促進に関与している可能性が考えられる。しかし、CYP3A4 阻害作用をもつ SSRIs である fluvoxamine

と TDS の併用投与を行い、抗不安作用と血中濃度の関係を検討した過去の報告では、TDS の血中濃度は変化することなく抗不安作用が有意に増強することが確認されている (Nishikawa et al., 2008)。この知見は FLX 併用により、TDS の血中濃度が変化する可能性が低いことを示唆しているが、今後の検討において、各薬剤の血中濃度を実際に測定する必要があるだろう。

以上の考察から、FLX と TDS の 28 日間併用投与は、薬力学および薬物動態学的な見地から、様々な相互作用のメカニズムを介して相乗的に海馬神経新生増加を引き起こしたと考えられる。近年、本邦において増強療法の有効性を検討した臨床研究として、The Aripiprazole Depression Multicenter Efficacy (ADMIRE) study が実施された結果、非定型抗精神病薬の aripiprazole が、抗うつ薬と併用して増強療法に用いる場合に限り、うつ病治療の薬剤として適応を獲得した (Kamijima et al., 2013)。また前臨床的には、FLX 単剤に対して反応を示さない治療抵抗性うつ病モデルラットに対して、quetiapine を追加すると抗うつ作用が認められることが報告されている (Wang et al., 2013)。このように抗うつ薬の増強療法についての研究は、基礎・臨床を問わず増えてきており、その優れたうつ病治療効果のメカニズムについて様々な形の情報が蓄積されていくと考えられる。本研究の結果もその 1 つであり、TDS はうつ病治療の選択を広げる有効性・有用性の高い薬剤であることが示唆された。

今後の課題として、5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストと SSRI の併用が、SSRI の抗うつ作用発現の早期化につながることを臨床的に報告されているため (Yamada et al., 2003)、FLX と TDS 併用投与と、併用投与で用いた各薬剤の投与期間を変化させ、海馬神経新生に与える影響を検討していく必要があるだろう。

参考文献

- Artigas F. 2013. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther.* 137, 119-31.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 29, 450-460.
- Blier P, Ward NM. 2003. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry.* 53, 193-203.
- Borta A, Hoglinger GU. 2007. Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem.* 100, 587-595.
- Campbell NR, Fernandes CC, Half AW, Berg DK. 2010. Endogenous signaling through alpha7-containing nicotinic receptors promotes maturation and integration of adult-born neurons in the hippocampus. *J Neurosci.* 30, 8734-8744.
- Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry.* 5, 262-269.
- Kamijima K, Higuchi T, Ishigooka J, Ohmori T, Ozaki N, Kanba S, Kinoshita T, Koyama T; ADMIRE Study Group. 2013. Aripiprazole augmentation to antidepressant therapy in Japanese patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled study (ADMIRE study). 151, 899-905.
- Kato M, Chang CM. 2013. Augmentation treatments with second-generation antipsychotics to antidepressants in treatment-resistant depression. *CNS Drugs.* 27(Suppl 1), S11-9.
- Kodama M, Fujioka T, Duman RS. 2004. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol Psychiatry.* 56, 570-580.
- Luo C, Xu H, Li XM. 2005. Quetiapine reverses the suppression of hippocampal neurogenesis caused by repeated restraint stress. *Brain Res.* 1063, 32-39.
- Nishikawa H, Inoue T, Izumi T, Koyama T. 2007. Synergistic effects of tandospirone and selective serotonin reuptake inhibitors on the contextual conditioned fear stress response in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17, 643-650.
- Nishikawa H, Inoue T, Masui T, Izumi T, Nakagawa S, Koyama T. 2008. Pharmacokinetic interaction between tandospirone and fluvoxamine in the rat contextual conditioned fear stress model and its functional consequence:

- Involvement of cytochrome P450 3A4. *Psychiatry Clin Neurosci.* 62, 591-596.
- Rush AJ, Trivedi MH, Stewart JW, Nierenberg AA, Fava M, Kurian BT, Warden D, Morris DW, Luther JF, Husain MM, Cook IA, Shelton RC, Lesser IM, Kornstein SG, Wisniewski SR. 2011. Combining medications to enhance depression outcomes (CO-MED): acute and long-term outcomes of a single-blind randomized study. *Am J Psychiatry.* 168, 689-701.
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M. 2006. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry.* 163, 1905-17.
- Sahay A, Hen R. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci.* 10, 1110-1115.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. 2011. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature.* 476, 458-461.
- Soumier A, Banasr M, Goff LK, Daszuta A. 2010. Region- and phase-dependent effects of 5-HT(1A) and 5-HT(2C) receptor activation on adult neurogenesis. *Eur Neuropsychopharmacol.* 20, 336-345.
- Trivedi HM, Fava M, Wisniewski RS, Thase EM, Quitkin F, Warden D, Ritz L, Nierenberg AA, Lebowitz DB, Biggs MM, Luther FJ, Shores-Wilson K, Rush JA. 2006. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N. Engl. J. Med.* 354, 1243-1252.
- Wang Y, Chang T, Chen YC, Zhang RG, Wang HN, Wu WJ, Peng ZW, Tan QR. 2013. Quetiapine add-on therapy improves the depressive behaviors and hippocampal neurogenesis in fluoxetine treatment resistant depressive rats. *Behav Brain Res.* 253, 206-211.
- Wong ML, Licinio J. 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2, 343-351.
- Yamada K, Yagi G, Kanba S. 2003. Clinical efficacy of tandospirone augmentation in patients with major depressive disorder: a randomized controlled trial. *Psychiatry Clin Neurosci.* 57, 183-187.
- Yoshino T, Nisijima K, Katoh S, Yui K, Nakamura M. 2002. Tandospirone potentiates the fluoxetine-induced increases in extracellular dopamine via 5-HT(1A) receptors in the rat medial frontal cortex. *Neurochem Int.* 40, 355-360.

総括

近年のうつ病性障害（うつ病）患者数の増加に対し第1選択薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRIs）には薬効発現のタイムラグや、非反応症例の多さといった問題点がある。そのような問題点を解決するために、抗うつ作用を持たない薬物の追加により抗うつ薬の薬効を増強させる治療戦略「増強療法」に注目し、抗うつ作用が増強する詳細なメカニズムに関して海馬神経新生の観点から検討を行った。本研究の成果は以下のとおりである。

第1章では、ヒトが臨床的に受けるものと同質の心理社会的ストレスを負荷する実験である Resident-Intruder (R-I) 系を用いて、ストレス単回負荷、3日連続負荷、間欠的負荷（2週間で4回）の3種の実験スケジュールを選択し、うつ病モデル動物に作製に適したストレス負荷回数を、ストレス負荷後の血漿コルチコステロン濃度と海馬神経新生の変化の観点から検討を行った。その結果として、間欠的負荷（2週間で4回）群における血漿コルチコステロン濃度と海馬神経新生の変化が最も大きかったことから、間欠的負荷（2週間で4回）がうつ病モデル動物に作製に適したストレス負荷回数であることが示唆された。

第2章では、tandospirone (TDS) の28日間投与を行い、R-I系を用いた心理社会的ストレスを間欠的（2週間で4回）に負荷したラットにおける海馬神経新生の変化について比較検討した。TDS28日間投与は、R-I系を用いた心理社会的ストレスによる海馬神経新生の減少を、ポジティブコントロールとして用いた FLX と同レベルまで回復させた。このことから、TDS は、海馬神経新生の増加を介して抗うつ作用を示す可能性が示唆された。

第3章では、tandospirone (TDS) と fluoxetine (FLX) の28日間併用投与を行い、R-I系を用いた心理社会的ストレスを間欠的（2週間で4回）に負荷したラットにおける海馬神経新生の変化について比較検討した。FLX と TDS の28日間併用投与は、R-I系を用いた心理社会的ストレスによる海馬神経新生の減少を回復させた。また、FLX と TDS の28日間併用投与は、併用投与に用いた各薬剤と比べて有意な海馬神経新生の増加が認められた。このことは、併用投与による抗うつ作用増強メカニズムに海馬神経新生の増加の著しい促進が関与している可能性を示唆している。

本研究は、TDS をはじめとする 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストの抗うつ作用発現と、SSRIs と 5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストの併用投与による抗うつ作用増強メカニズムについて検討を行い、これらのメカニズムには海馬神経新生が関与している可能性を示した。海馬神経新生の観点から、増強療法はより良いうつ病治療法であると共に、5-HT_{1A} 受容体部分アゴニストはうつ病治療の選択を広げる有効性・有用性の高い薬剤であると考えられる。

謝辞

本研究の機会を与えて下さり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻、御高閲を賜りました福岡大学大学院 薬学研究科 免疫分子治療学教室 中島学 教授に謹んで深謝致します。本論文を査読して頂き、貴重な御意見と御高閲を賜りました福岡大学大学院薬学研究科臨床疾患薬理学教室 岩崎克典 教授ならびに三島健一 准教授、美根和典 前薬学部教授に謹んで深謝致します。

本論文執筆に際し、数々の御助言、激励を頂きました小山進 准教授、村田雄介 助教、杉本裕子 助教をはじめとする福岡大学薬学部臨床心身治療学教室の皆様に深く感謝致します。

また本研究に尊い命を提供していただきました実験動物諸霊に深く感謝致します。最後に、この長い学生生活において、終始御支援賜りました両親や友人に深く感謝致します。