

氏 名（本籍）

てらだ かずき

寺田 一樹

（三重県）

学 位 の 種 類

博士（薬学）

報 告 番 号

甲第 1507 号

学位授与の日付

平成 26 年 3 月 25 日

学位授与の要件

学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学 位 論 文 題 目

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

論文審査委員（主 査）

福岡大学

教授

加留部 善晴

（副 査）

福岡大学

教授

高田 二郎

福岡大学

教授

原 周司

福岡大学

教授

松永 和久

【緒論】

日本ではこれまで過去 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。うつ病は深刻な社会問題であり、対策に必要とな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。

うつ病の病態研究において、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、核磁気共鳴画像法 (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、神経解剖学的異常はないという従来の定説が覆されるような状況になってきている。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、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、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。また、ストレスは生体内でグルココルチコイドであるコルチゾールを上昇させる。また、高濃度のグルココルチコイドは海馬神経新生を障害することが明らかになり、これらの現象はステロイド誘起性うつ病とも深く関連すると考えられている。従って、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、未だなされていない。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新たな進展が期待される。

そこで本研究では、ステロイド誘起性うつ病に着目し、うつ病発症機序の解明を目的として合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンを用いた *in vitro*

および *in vivo* 実験モデルの構築を試みた。第一に、*in vitro* 実験モデルとして神経系モデルとして様々な研究に用いられている PC12 細胞へのデキサメタゾンの曝露を行ない、その影響を検討した。次に *in vivo* 実験としてマウスへのデキサメタゾンの反復投与による影響を行動試験により検討した。

【研究 1】*In vitro* における検討：デキサメタゾンによる PC12 細胞の神経成長因子依存性突起伸展への影響とその機構探索

検討 1 神経成長因子誘起性の突起伸展に対するデキサメタゾンの影響

PC12 細胞は、神経成長因子 (NGF) の添加により分化して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。これまでもステロイドの併用によってその突起伸展が抑制するとの結果が示されてきた。本検討では、あらかじめ PC12 細胞にデキサメタゾン (1 μ M) の曝露を 24 時間行い、その後デキサメタゾンを取り除いた後に NGF を添加し、24 時間後の突起伸展について検討した。その結果、NGF による突起伸展はデキサメタゾンの前曝露によって有意に抑制された。また、NGF を添加しない条件 (vehicle とデキサメタゾン前曝露のみ) での比較においては、その突起伸展に差がみられないことから、デキサメタゾンに NGF 依存性の突起伸展機構に対する阻害作用があることが判明した。

検討 2 神経成長因子依存性のシグナル活性化に対するデキサメタゾンの影響

デキサメタゾンによる神経成長因子 (NGF) 依存性の突起伸展機構に対する阻害作用の機構を明らかにするために、NGF によって増強される細胞内シグナルへのデキサメタゾンの影響について検討を行なった。NGF の受容体としてチロシンキナーゼ受容体 (TrkA) や非酵素的受容体 (p75^{NTR}) の存在が知られ、これらの受容体からのシグナル伝達によって神経細胞の生存や分化、突起伸展に対して調節が行われているといわれている。その中で、NGF はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) -セリン/スレオニンキナーゼ (Akt) 経路や低分子 GTP 結合蛋白質 (Ras) -細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2 シグナルを活性化することによって突起伸展を増強することが明らかにされている。本検討ではデキサメタゾンの前曝露によるこれら NGF の Akt および ERK1/2 活性への影響を Western blot により解析した。測定サンプルとして PC12 細胞へのデキサメタゾンの 24 時間曝露、または未処理群に対して NGF を添加し添加後

0~60 min の各時間において細胞を回収しサンプルの調製を行なった。

その結果、NGF の添加により Akt, ERK1/2 の活性化は 10 min をピークに増強した。また、これらの活性はデキ

サメタゾン (DEX) の前曝露によって明らかに阻害された (Fig.1)。

これらの結果は、ステロイドを用いた *in vitro* 研究における新たな発見であり、デキサメタゾンによる NGF 依存性の突起伸展抑制作用と相関し、デキサメタゾンの突起伸展抑制機構として重要な役割を果たしていることが明確に示された。

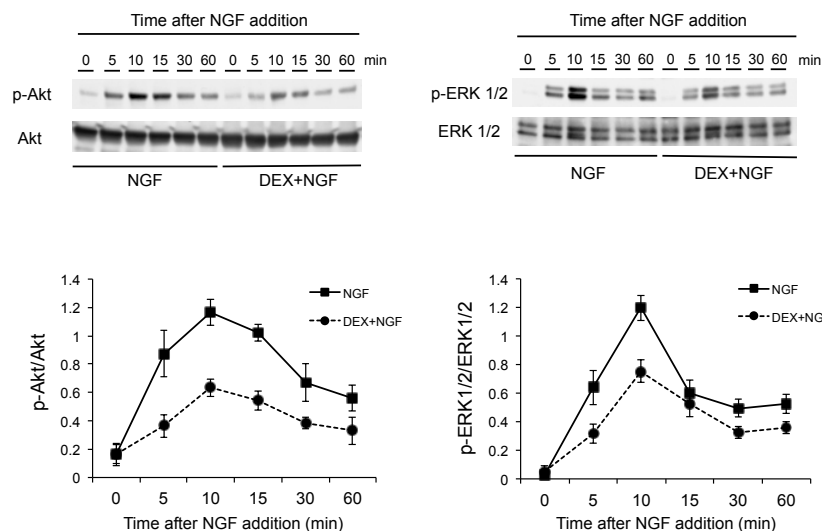


Fig.1

検討3 検討1および検討2におけるグルコルチコイドレセプターの関与

検討1および検討2において明らかとなった PC12 細胞における突起伸展の抑制とそれらに関わるシグナルの抑制についてさらなる機構解明として、グルコルチコイドレセプターの阻害剤である RU38486 (2 μ M) をデキサメタゾンと併用し、突起伸展抑制効果に対する影響を検討した。検討1の結果でみられたデキサメタゾン (DEX) による NGF 依存性突起伸展の抑制は、RU38486 の併用によってその抑制が改善した (Fig.2A)。また、検討2においてデキサメタゾンによ

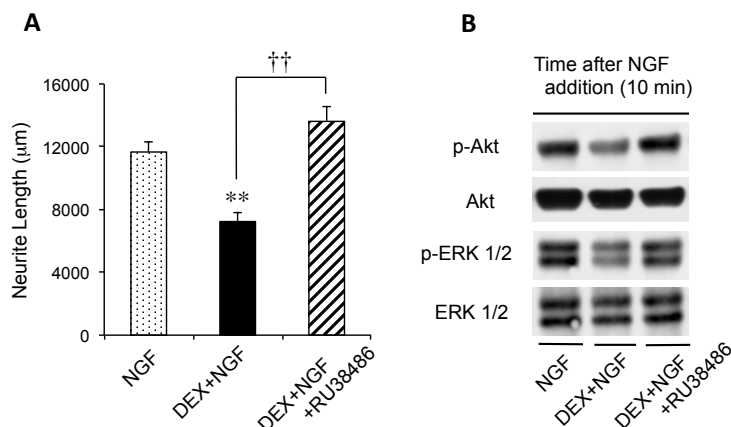


Fig.2

て抑制された Akt や ERK1/2 の活性化について、そのピークである NGF 添加後 10 min における解析について RU38486 を併用した。その結果、デキサメタゾンによって阻害された Akt および ERK1/2 の活性化が RU38486 の併用により改善効果が確認された (Fig.2B)。これらの結果から、デキサメタゾンの PC12 細胞における突起伸展の抑制は、グルココルチコイドレセプターを介して引き起こされていることを証明した。

本研究では、PC12 細胞でのデキサメタゾンによる突起伸展の抑制は、グルココルチコイドレセプターを介して Akt および ERK1/2 の活性化を抑制することによって引き起こされるという新たな知見が得られ、さらに、本モデルにおける突起伸展の抑制はフルボキサミンの併用により改善効果が示されたことから (data not shown)、ステロイド誘起性突起伸展抑制機構の新たな *in vitro* 実験モデルの構築に成功した。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 つと考えられた。

【研究 2】*In vivo* における検討：デキサメタゾンの持続注入マウスによる行動試験とそれらに対する抗うつ剤の効果

検討 1 デキサメタゾン持続注入マウスにおける自発運動試験および強制水泳試験

In vitro 実験モデルによって得られた結果に基づき、デキサメタゾンをマウスに投与し、その神経系における影響を行動試験によって評価を行なった。Alzet 社のミニポンプをマウスに埋め込み、デキサメタゾン (0.5 mg/kg/day) を 2 週間持続注入した。また、ミニポンプに生理食塩液 (saline) を注入したものを比較対象とした。自発運動試験 (明期~暗期) の結果、デキサメタゾンの持続注入により、saline 群と比較してデキサメタゾン (DEX) 群において自発運動量の

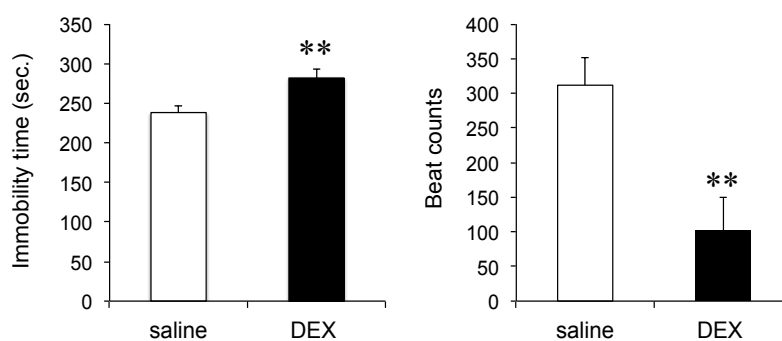


Fig.3

抑制傾向がみられ、マウス活動期（暗期）の合計運動量においては有意な減少が確認された (Fig.3)。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おいて、デキサメタゾン (DEX) 持続注入マウスにおいて無動時間の延長、足のばたつき回数の低下が認められた (Fig.3)。これらの結果、デキサメタゾンの持続注入がマウスのうつ様行動を誘起することが示唆され、*in vitro* によって得られた神経系への影響がマウスにおいても同様に引き起こされている可能性を示すことができた。

検討2 デキサメタゾン持続注入マウスへのフルボキサミン投与の効果

マウスへのデキサメタゾンの持続注入により、うつ様行動を誘起することが確認されたので、抗うつ剤の中で PC12 細胞や神経細胞に対して分化や突起伸展を促進するといわれる選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) のフルボキサミンを併用し、デキサメタゾンによる行動抑制への効果を検討した。フルボキサミン (5 mg/kg/day) は2週間のデキサメタゾン注入期間、1日1回腹腔内に投与した。その結果、フルボキサミン投与は、デキサメタゾン投与により抑制された自発運動に対して影響を与えなかった。しかし、強制水泳試験においてデキサメタゾン (DEX) 投与における無動時間の延長、足のばたつき回数の低下は、フルボキサミン

(Flv) の併用により有意に改善されることが認められた (Fig.4)。

本研究では、*in vivo* においてデキサメタゾン投与によりうつ様行動が誘起されることを確認した。また、

選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) のフルボキサミンを併用し、デキサメタゾン投与により誘起された運動量低下に対しては影響を与えず、強制水泳試験での行動抑制を有意に改善した。その結果、フルボキサミンが本モデルに対して抗うつ薬の特徴的な効果を示したことから、デキサメタゾンの持続注入によってうつ様行動が誘起されたと考えられた。

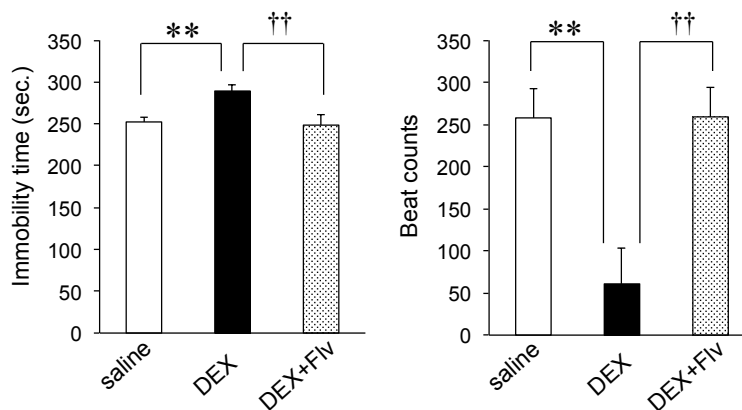


Fig.4

【結論】

ステロイド誘起性うつ病に着目し、うつ病発症機序の解明を目的として合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンを用いた *in vitro* および *in vivo* 実験モデルの構築を試みた。

まず、*in vitro* 実験モデルとしてあらかじめ PC12 細胞における神経成長因子 (NGF) による突起伸展は、デキサメタゾンの前曝露によって有意に抑制されたことから、デキサメタゾンに NGF 依存性の突起伸展機構に対する阻害作用があることを示した。次に NGF 依存性のシグナル活性化に対するデキサメタゾンの影響を調べ、Akt および ERK1/2 の活性化を抑制することによって突起伸展抑制が引き起こされるという新たな知見が得られた。さらに、これらの反応はグルココルチコイドレセプターを介することが明らかとなった。以上から、本研究によりステロイド誘起性の突起伸展抑制機構において細胞内シグナルをマーカーとした新たな *in vitro* 実験モデルの構築に成功した。

次に *in vivo* 実験としてマウスへのデキサメタゾンの持続注入がマウスの行動抑制を誘起することが確認され、*in vitro* 実験によって得られた神経系への影響がマウスにおいても同様に引き起こされている可能性を示すことができた。しかし、強制水泳試験による行動抑制は運動量の低下によるものであることも考えられ、そこで選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) であるフルボキサミンをさらに併用した際の効果について検討を行なった。その結果、デキサメタゾン誘起性の行動抑制はフルボキサミンによってその運動量には影響を与えずに強制水泳試験での行動抑制が改善され、抗うつ薬特有の効果が認められたことから、本 *in vivo* モデルにおいてうつ様行動が引き起こされるということが示された。

本研究によって、ステロイド誘起性突起伸展抑制機構の新たな *in vitro* 実験モデルが構築された意義は大きい。*In vitro* 実験においてデキサメタゾンにより抑制された突起伸展がフルボキサミンによって改善され、また、*in vivo* 実験で認められたデキサメタゾンによるうつ様行動誘起についてもフルボキサミンによって改善された。*In vitro* と *in vivo* が連結した体系的実験モデルの構築は、うつ病のような複雑な反応のスクリーニングに非常に有用であり、今後、*in vitro* および *in vivo* の両方の系に各種治療薬あるいはシグナルの作動・遮断薬を適用し、各種シグナルに基づくパラメータの相関を記述できるシステムファーマコロジー (SP) モデルの構築を行なうことが可能になった。