

うつ病治療におけるセロトニン4型受容体の寄与の解明

京都大学大学院 薬学研究科 システム創薬科学講座
瀬木（西田）恵里

1. はじめに

セロトニン選択的阻害薬(SSRI)はうつ病治療に広く用いられているが、その作用メカニズムについては未だ不明な点が多い。海馬の歯状回においては、生涯を通じて新規の神経が産生されることが知られており、これを神経新生という。この神経新生は長期のSSRI投与により増加することが知られている。SSRIは歯状回において、神経前駆細胞の増加や未成熟神経の分化促進をもたらす。SSRI投与による幾つかの行動変化が海馬の神経新生を介していることが示されており、抗うつ治療における神経新生効果の重要性が示唆されている(1-4)。

14種類あるセロトニン受容体(5-HT)サブタイプのうち、プレシナプス側にある5-HT_{1A}受容体はSSRI誘導性の海馬神経新生に関与することが示唆されてきた。しかしながら、ポストシナプス側においてどの5-HT受容体が神経新生の促進に関与するかは明らかでない。これまで長期のSSRI投与がcAMPカスケードを活性化すること、またこの経路が歯状回での細胞増殖促進を活性化することから、Gsに共役した受容体が神経新生の促進に関与するものと予想された。5-HT受容体サブタイプの内、5-HT₄受容体はGs共役系で歯状回にも発現していることから、長期のSSRI投与による海馬神経新生効果は5-HT₄受容体を介している可能性を考え、5-HT₄受容体欠損マウス(5-HT₄RKO)を用いて検討を行った。

2. 方法

動物と薬物投与: 5-HT₄RKOと野生型マウスはジャクソンラボラトリーより購入し、交配した。9-10週齢のオスマウスを実験に用いた。フルオキセチン(22 mg/kg/day, LKT labs)は腹腔内に21日間投与した。

免疫染色: 投与最終日にBrdU(150mg/kg)投与し、その2時間後に4%PFAにて還流固定した。脳を単離後固定を行い、シュークロースで置換後凍結し、30 μmの海馬連続切片を作成した。BrdU抗体とダブルコルチン抗体を用いて免疫染色を行った。

定量的PCR: 海馬歯状回よりRNA抽出を行い、cDNAを合成した。定量PCRはライトサイクラーを用いた。

BDNF (352 bp), 5'-GACAAGGCAACTTGGCCTAC-3' and 5'-ACTGTCACACAGCTCAGCTC-3'; NPY (331 bp), 5'-GGAAAAGTCGGGAGAAC-3' and 5'-CCACGATGCTAGG TAACA-3'.

上記のプライマー配列を用い、10 min at 95°C, then 45 cycles of 10 sec at 95°C, 10 sec at 58°C, and 14 sec at 72°Cの条件で反応を行った。

3. 結果

①歯状回の細胞増殖に関する長期SSRIの効果

5-HT₄RKOと野生型はSSRIであるフルオキセチン22 mg/kg/day投与を21日間行った。歯状回での細胞増殖はチミジンアナログのBrdUの取り込みによって検討した。BrdU陽性細胞は主に歯状回の顆粒細胞下層に存在した。BrdU陽性細胞の計測から、フルオキセチンの長期投与によって、野生型歯状回での細胞増殖は有意に増加した(Fig 1a and 1c, BrdU陽性細胞数、コントロール群; 1940±158, フルオキセチン群; 3588±302; $p<0.05$)。一方、5-HT₄RKOマウスでの歯状回での細胞増殖はフルオキセチン投与とコントロール群で有意な変化は認められなかった(Fig 1b and 1c, BrdU陽性細胞数、コントロール群; 1886±217, フルオキセチン群; 2041±260)。

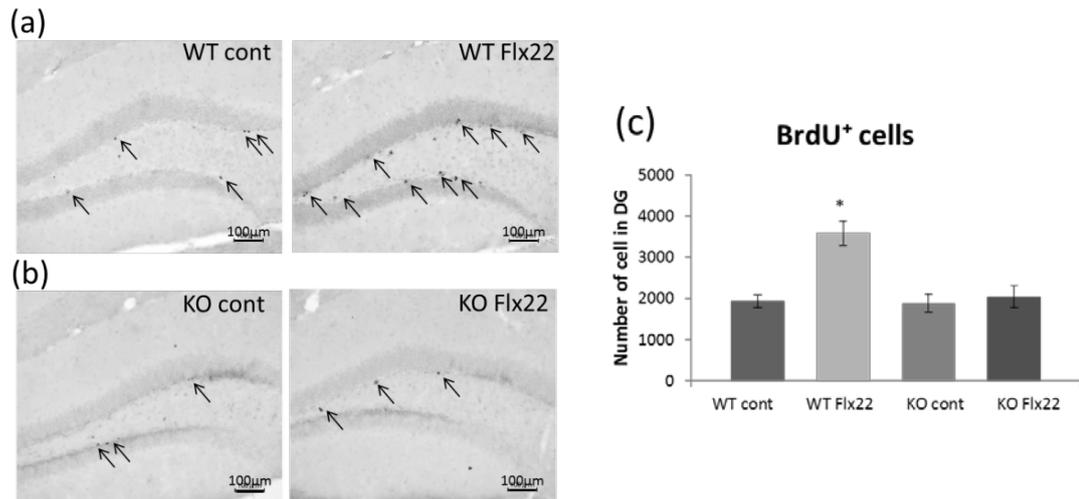


Figure 1. Effect of chronic fluoxetine treatment on cell proliferation in the DG.

(a, b) Representative of BrdU immunopositive cells in the DG of WT mice (a) or 5-HT4R KO mice (b) treated with saline (WT cont or KO cont) or fluoxetine (WT Flx22 or KO Flx22). (c) Chronic fluoxetine treatment increased the number of BrdU positive cells in the DG of WT mice, but not in that of 5-HT4R KO mice. Data are means \pm SEM of five mice per group. * $p < 0.05$, control group vs fluoxetine group by Student's t test.

② 歯状回の未成熟神経細胞マーカー発現に関する長期SSRIの効果

ダブルコルチンは未成熟神経細胞のマーカーであり、神経新生のマーカー指標として用いられる。ダブルコルチン免疫陽性染色は歯状回の顆粒細胞下層の細胞体と樹状突起に存在した。この染色像は野生型マウスにおいてフルオキセチン投与群で増強した。一方、5-HT4Rマウスでのフルオキセチン投与群とコントロール群で明らかな違いは認められなかった(Fig 2)。

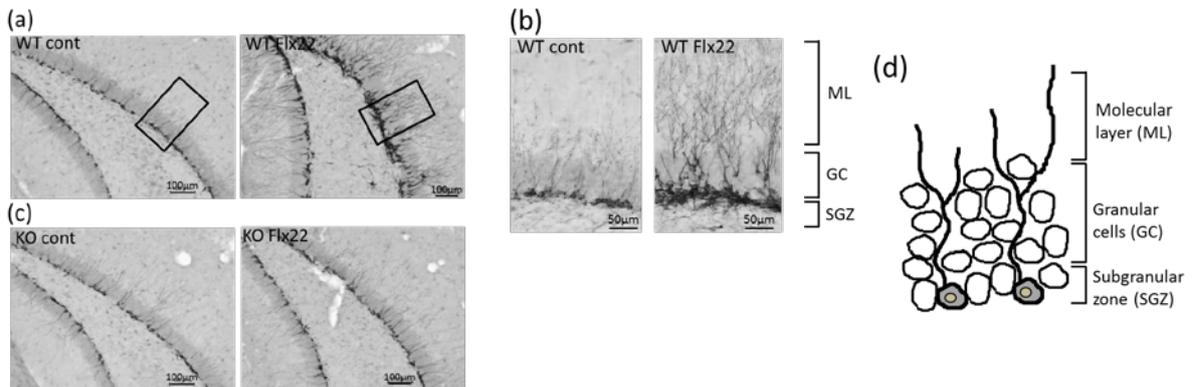


Figure 2. Effect of chronic fluoxetine treatment on neural differentiation in the DG.

Representative of DCX-expressing cells in the DG in WT mice (a, b) or 5-HT4R KO mice (c) treated with saline (WT cont or KO cont) or fluoxetine (WT Flx22 or KO Flx22). (b) Higher magnification microphotographs of the boxed areas in (a). (d) A scheme of the DG. DCX is expressed in the cell bodies and dendrites of immature neurons in the subgranular zone of the DG.

③ 歯状回の遺伝子発現に関する長期SSRIの効果

BDNFやNPYは神経新生に関与し、長期のSSRI投与により歯状回において発現が増大することが知られている。そこで、フルオキセチン投与によるBDNFやNPYの発現増大における5-HT4受容体の関与を検討した。野生型マウスでは長期フルオキセチン投与により、BDNFやNPY mRNA発現の増大が認められたが、5-HT4RKOではその発現はほとんど変化が認められなかった(Fig 3)。

これらの結果より、長期SSRI投与による歯状回での神経新生促進に5-HT4受容体が必須の役割を果たすことが示された。

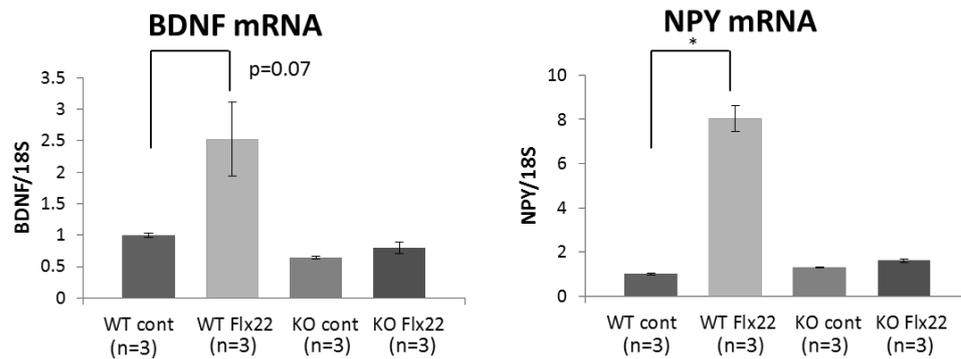


Figure 3. Effect of chronic fluoxetine on mRNA expression in the DG
Quantification of BDNF (left) and NPY (right) mRNA expression in the DG by reverse transcriptase-qPCR analysis. Data are means \pm SEM of three mice per group. * $p < 0.05$, control group vs fluoxetine group by Student's t test.

4. 考察

本研究においてSSRI投与による海馬神経新生には5-HT₄受容体の関与を示した。5-HT₄受容体はG_s共役型の受容体であることから、シナプス後膜ではcAMPシグナルの増強がおきていと予想される。本研究の結果はこれまでの報告にあるcAMP-CREBカスケードが海馬の細胞増殖を更新するという報告と一致している(5, 6)。

また本研究では長期のSSRI投与において、BDNFやNPYといった海馬の神経新生に関与する遺伝子の変化における5-HT₄受容体の関与も明らかにしている。5-HT₄受容体は海馬歯状回の成熟神経細胞に強く発現していること、またBDNFやNPY mRNAは海馬歯状回の成熟神経細胞でSSRI投与により発現増大することが報告されている(7,8)。従って、5-HT₄受容体による神経前駆細胞・幹細胞の増殖促進反応は、少なくとも一部はこれら神経新生関連遺伝子の増大を介した間接的な作用を介していることが予想される。

5. 参考文献

- [1] Pinnock SB, Blake AM, Platt NJ, Herbert J, The roles of BDNF, pCREB and Wnt3a in the latent period preceding activation of progenitor cell mitosis in the adult dentate gyrus by fluoxetine. *PLoS One*, 2010; 5 (10): e13652.
- [2] Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R, Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 2003; 301 (5634): 805-809.
- [3] Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R, Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci*, 2008; 28 (6): 1374-1384.
- [4] David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R, Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 2009; 62 (4): 479-493.
- [5] Lee JS, Jang DJ, Lee N, Ko HG, Kim H, Kim YS, Kim B, Son J, Kim SH, Chung H, Lee MY, Kim WR, Sun W, Zhuo M, Abel T, Kaang BK, Son H, Induction of neuronal vascular endothelial growth factor expression by cAMP in the dentate gyrus of the hippocampus is required for antidepressant-like behaviors. *J Neurosci*, 2009; 29 (26): 8493-8505.
- [6] Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS, Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci*, 2002; 22 (9): 3673-3682.
- [7] Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castrén M, Castrén E, Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 2005; 25 (5): 1089-1094.
- [8] Decressac M, Wright B, David B, Tyers P, Jaber M, Barker RA, Gaillard A, Exogenous neuropeptide Y promotes in vivo hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 2011; 21 (3): 233-238.