

うつ病治療における5-HT_{1A}受容体部分アゴニストを用いた「増強療法」が 海馬神経新生に与える影響についての基礎的検討

森 征慶

福岡大学薬学部 免疫・分子治療学教室, 814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

The effects of augmentation therapy consisting of a combination of antidepressants with 5-HT_{1A} receptor agonist on rat hippocampal neurogenesis.

Masayoshi Mori

Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka, 814-0180, Japan

Abstract

Major depressive disorder (MDD) is a leading cause of disability worldwide. There is great need for improved therapy for MDD. Several clinical studies have reported that augmentation therapy consisting of a combination of antidepressants with 5-HT_{1A} receptor agonist treatment is a better therapeutic strategy for MDD than antidepressant monotherapy. However, the mechanism underlying the augmentation therapy is still poorly understood. Recent studies suggested that hippocampal neurogenesis is one of several mechanisms that antidepressants may harness to exert their therapeutic effects. Then, we designed this study in order to elucidate the effect of augmentation therapy (fluoxetine + tandospirone) on neurogenesis in rat hippocampus using resident-intruder paradigm. Rats were administered intraperitoneally with saline, fluoxetine (FLX, 5 mg/kg), tandospirone (TDS, 10 mg/kg) or FLX + TDS once daily for 28 days. Stress group rats were experienced four social defeat exposures within the last half 2 weeks of drug treatment. The effects of chronic drug treatment were evaluated one day after the last injection. The quantification of hippocampal neurogenesis was estimated using immunostaining of doublecortin (DCX), a marker protein of newborn neurons. In saline treated group, stressed rats showed a significant reduction in the number of DCX-positive cells in the DG of hippocampus compared to control rats. Chronic treatment with FLX and TDS reversed the stress-induced decrease in the number of DCX-positive cells. In control and stress condition, FLX + TDS treated group showed a significant increase in the number of DCX-positive cells compared to saline, FLX and TDS treated group. In the present study, augmentation therapy consisting of a combination of FLX with TDS significantly increased the number of DCX-positive cells in the DG of hippocampus compared to monotherapy in the treatment of FLX or TDS. These results suggest that augmentation therapy might be partly mediated by increasing hippocampal neurogenesis.

Keyword : neurogenesis, augmentation therapy, depression, serotonin 1 A receptor partial agonist

【緒言/目的】

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¹⁾、非反応症例が多いといった問題点がある^{2,3)}。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、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」が注目されており、臨床研究においても、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を併用するとうつ病症状が改善することが報告されている^{2,4,5)}。しかしながら、増強療法において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。近年、海馬神経新生が、うつ病の発症機序や抗うつ薬の薬効発現に関係しているのではないかと注目されている^{6,7)}。また、SSRIsの海馬神経新生改善作用には、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⁸⁾。このことから、SSRIsと5-HT_{1A}受容体部分アゴニストを併用した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考えられる。今回、我々は心理社会的ストレスを負荷する方法であるResident-Intruder (R-I)系を用いてうつ病モデル動物を作製した⁹⁾。そのうつ病モデル動物にSSRIsであるfluoxetine (FLX)と、5-HT_{1A}受容体部分アゴニストである tandospirone (TDS)の投与を行い、海馬神経新生に与える影響を検討して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】

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 ± 2℃、絶対湿度60 ± 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。

Resident-Intruder 系

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。

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。

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。Intruder ラットは Resident 雄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。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。

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℃,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。

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%paraformaldehyde 250mlにて固定を行った。十分な固定を行うため、屍体を4℃で1日保管後、脳を摘出、一晩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30μm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℃にて保存した。

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℃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(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。

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 [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]

薬物投与

ラット搬入の1週間後から saline, fluoxetine hydrochloride (FLX, 5 mg/ml in saline, LKT Laboratories), tandospirone citrate (TDS, 10 mg/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, 1 ml/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1 ml/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。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。

【結果】

1. R-I系を用いた心理社会的ストレス負荷による血漿コルチコステロン濃度および海馬歯状回における doublecortin (DCX) 陽性細胞数の変化

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, 有意な血漿コルチコステロン濃度の増加が認められた (Fig.1A)。

また, 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 陽性細胞数の有意な減少が認められた (Fig.1B)。

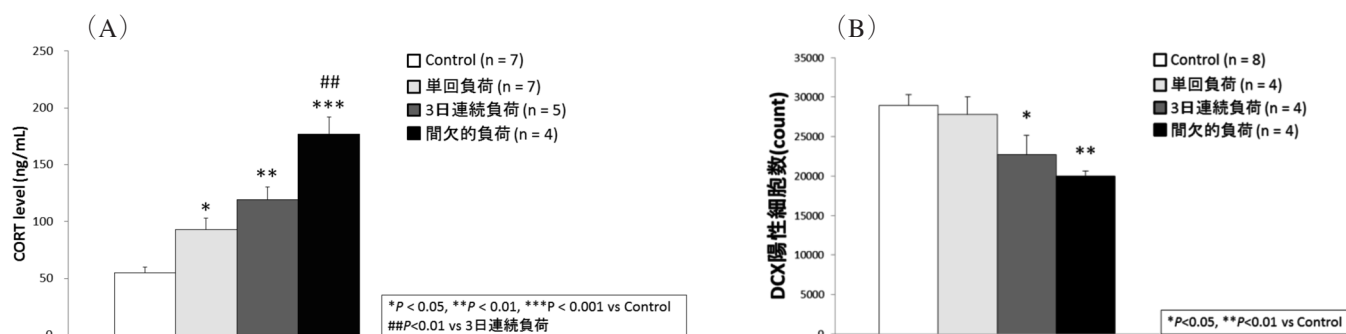


Fig.1 The effects of psychosocial stress by Resident-Intruder paradigm
 (A) plasma corticosterone levels
 (B) total number of doublecortin positive cells in dentate gyrus

2. tandospirone (TDS) 28日間投与がR-I系を用いた心理社会的ストレス負荷ラットのDCX陽性細胞数に与える影響

前項で得られた知見に基づき、ストレス負荷プロトコールとして間欠的負荷を選択した。TDSまたはFLXの28日間投与を行ったラットに対し、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6群間で比較したところ、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陽性細胞数が有意に増加していた ($p < 0.001$, $p = 0.001$)が、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.2)。

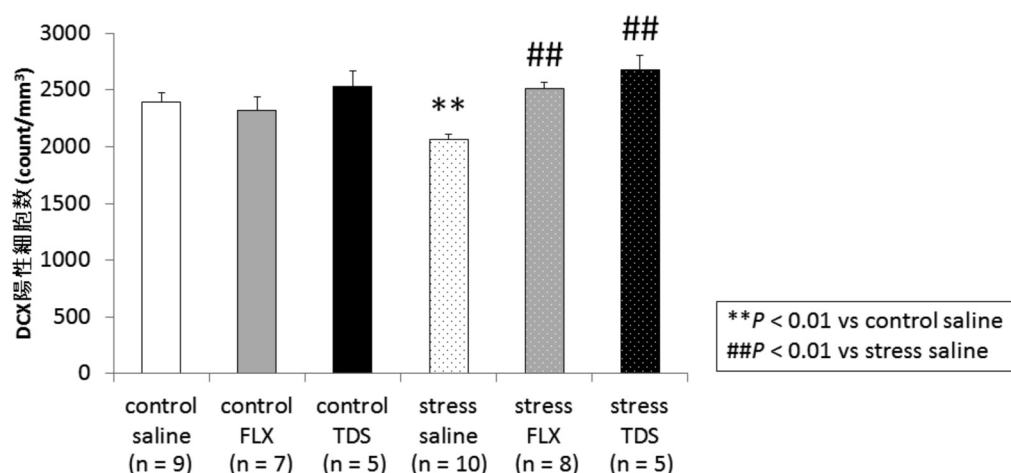


Fig.2 The effect of chronic treatment of fluoxetine or tandospirone on the number of doublecortin positive cells per volume of dentate gyrus

3. tandospirone (TDS) と fluoxetine (FLX) 28日間併用投与がR-I系を用いた心理社会的ストレス負荷ラットのDCX陽性細胞数に与える影響

前項と同様の実験プロトコールを用いて、FLXとTDSの28日間併用投与を行ったラットに対し、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検討した。control条件下の4群間で比較したところ、control + FLX + TDS群はcontrol + saline群、control + FLX群およびcontrol + TDS群に比べてDCX陽性細胞数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. 3A)。また同様の検討をstress条件下の4群間において行ったところ、stress + FLX + TDS群はstress + saline群、stress + FLX群およびstress + TDS群に比べてDCX陽性細胞数の有意な増加が認められた (いずれも $p < 0.001$)。また、stress + saline群、stress + FLX群およびstress + TDS群の3群間には有意な差は認められなかった。stress + FLX群とstress + TDS群は、stress + saline群に比べてDCX陽性細胞数の有意な増加が認められた ($p = 0.01$, $p = 0.03$)。しかし、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. 3B)。

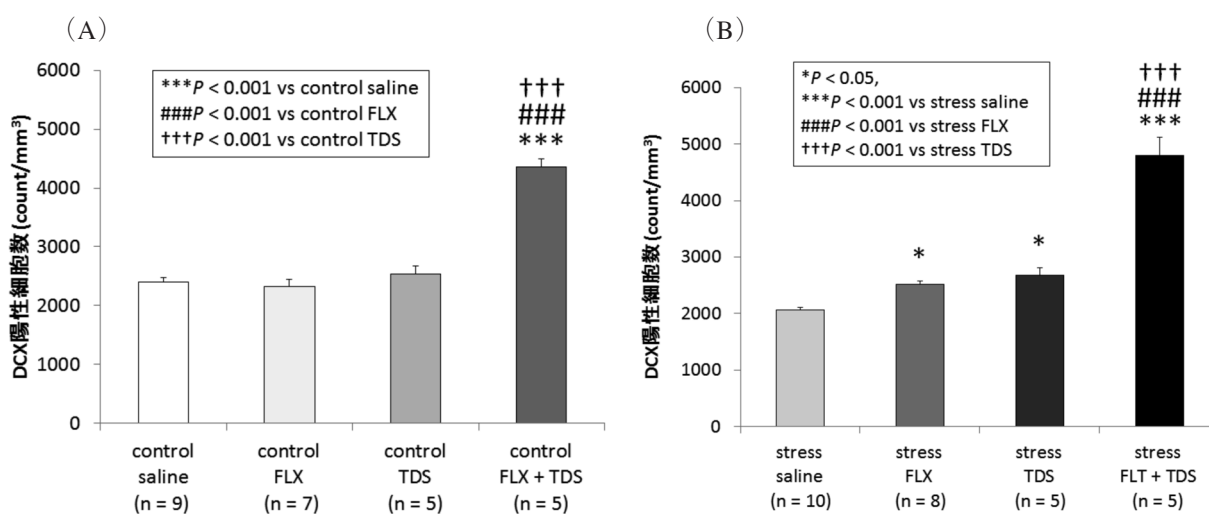


Fig.3 The effects of augmentation therapy on the number of doublecortin positive cells per volume of dentate gyrus

(A) basal condition

(B) stress condition

【考察】

本研究では、SSRIsと5-HT_{1A}受容体部分アゴニストの併用による増強療法と海馬神経新生の関係性について検討を行った。R-I系を用いて作製したうつ病モデル動物において、TDSの長期投与により、DCX陽性細胞数がFLXと同等のレベルまで回復したことから、TDSは海馬神経新生を増加させることで抗うつ作用を示す可能性が示唆された。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¹⁰⁾。これらのことから、TDSの長期投与による海馬神経新生増加メカニズムには、5-HT_{1A}自己受容体の脱感作と、海馬歯状回における後シナプス5-HT_{1A}受容体刺激作用が関係していることが示唆される。前シナプス5-HT_{1A}自己受容体の脱感作はSSRIs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ため、FLXとTDS併用投与による増強療法は、FLXとTDSが協奏的に上記のカスケードを活性化することで海馬神経新生を増加させると考えられる。

【参考文献】

- 1) Wong ML, Licinio J. 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2, 343-351.
- 2) 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.
- 3) Rush AJ. 2007. Limitations in efficacy of antidepressant monotherapy. *J Clin Psychiatry.* 68 (Suppl 10), 8-10.
- 4) Artigas F. 2013. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther.* 137, 119-31.
- 5) 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.

- 6) Gould E, Gross CG. 2002 . Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci.* 22 , 619-623 .
- 7) Samuels BA, Hen R. 2011 . Neurogenesis and affective disorders. *Eur J Neurosci.* 33 , 1152-1159 .
- 8) 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 .
- 9) Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH, Bohus B. 1997 . The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci Biobehav Rev.* 21 , 775-782 .
- 10) 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 .