

氏名（本籍）	<small>ふくもと けんいち</small> 福本 健一（神奈川県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 345 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用の機序に関する研究
論文審査委員	（主査） 教授 高木 教夫 教授 田野中 浩一 教授 立川 英一 教授 馬場 広子

論文内容の要旨

【背景】

うつ病は抑うつ気分又は興味・喜びの喪失などの症状を呈する精神疾患であり、その治療には選択的モノアミン再取り込み阻害薬が第 1 選択薬として使われている。しかし、既存の抗うつ薬では効果が不十分であること、及び遅効性であることが問題となっている。近年、NMDA 受容体拮抗薬の Ketamine がうつ病患者及び治療抵抗性うつ病患者に対して、即効性かつ持続性の抗うつ作用を示し、注目を集めている。Ketamine の抗うつ作用にはグルタミン酸遊離促進→AMPA 受容体活性化→BDNF/TrkB→mTOR シグナル経路活性化を介した神経可塑的な変化が関与することが示唆されている。しかしながら、Ketamine は投与初期及び長期使用による副作用発現の懸念や投与方法の問題により、その使用は制限されている。そこで、Ketamine と同様の薬効を有し、かつ安全でより使いやすい治療薬の創製が望まれている。

グルタミン酸神経機能に対して調節的な役割を有するタンパク質として代謝型グルタミン酸（mGlu）受容体がある。その中でも mGlu2/3 受容体拮抗薬及び mGlu5 受容体拮抗薬が動物モデルにおいて、抗うつ作用を示すことが報告されている。興味深いことに、これらの化合物は臨床試験において、その安全性と良好な忍容性が確認されており、Ketamine よりも使いやすい治療薬となる可能性が示されている。しかし、これらの化合物及び Ketamine の抗うつ作用の機序については未だ不明な点が多い。これらの化合物について、Ketamine の作用機序との共通性を見出すことは臨床における抗うつ効果の予測に繋がり、延いては新たな創薬標的の発見にも繋がる可能性がある。

そこで本研究では、第 1 章において、新奇環境摂食抑制試験（NSFT）を用い mGlu 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現及びその作用における TrkB/mTOR シグナルの関与について、第 2 章では同試験を用いて、mGlu 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現

におけるセロトニン神経系の関与について、そして、第3章では mGlu 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現に関与するセロトニン神経の局在について、行動薬理学的手法、脳内微量注入法及び免疫組織化学的手法を用いて検討した。

第1章 新奇環境摂食抑制試験における代謝型グルタミン酸 5 受容体拮抗薬の作用とその作用機序の検討

これまでに、mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用には Ketamine 様の作用機序が関与するという画期的な報告がなされている。しかし、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ作用の機序については明らかにされていない。そこで、第1章では Ketamine の急性及び持続性の抗うつ作用が検出可能な NSFT を用いて、mGlu5 受容体拮抗薬 (MPEP) の作用及びその作用機序を検討し、Ketamine のそれらと比較した。その結果、MPEP (3 mg/kg, i.p.) は投与1時間後及び24時間後に摂食までの潜時を短縮し、Ketamine (30 mg/kg, i.p.) と同様に急性及び持続性の抗うつ作用を示した。また、MPEP の急性作用はタンパク質合成阻害薬 (Anisomycin: 100 mg/kg, i.p.) 及び mTOR 阻害薬 (Rapamycin: 0.2 nmol/2 µl, i.c.v.) により拮抗されなかった。さらに、Ketamine の急性作用も Rapamycin により拮抗されなかった。MPEP の持続性作用は Anisomycin により拮抗された。また、この持続性作用は Rapamycin により一部拮抗されたものの、Trk チロシンキナーゼ阻害薬 (K252a: 2.0 nmol/2 µl, i.c.v.) により拮抗されなかった。一方、Ketamine の持続性作用は Rapamycin により拮抗された。

これらの結果から、mGlu5 受容体拮抗薬は NSFT において、Ketamine と同様に急性及び持続性の抗うつ作用を有し、その持続性作用の機序には新規タンパク質の合成が関与するものの、mTOR シグナルの関与は Ketamine と異なり部分的であり、BDNF/TrkB シグナルは関与しないことが示唆された (Fig. 1)。

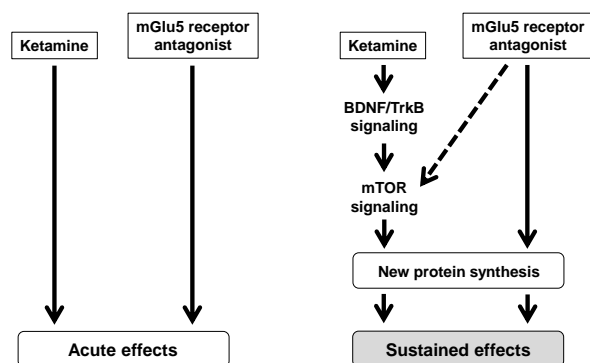


Fig. 1 Proposed mechanisms of the effects of Ketamine and the mGlu5 receptor antagonist. (standard arrow: involvement, dotted line arrow: partial involvement)

第2章 新奇環境摂食抑制試験における代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬及び Ketamine の作用に対するセロトニン神経系の関与

これまでに、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は AMPA 受容体の活性化を介してラット内側前頭前皮質 (mPFC) の細胞外セロトニン量を増加させること、また、mGlu5 受容体拮抗薬はラット前頭前皮質において細胞外セロトニン量を上昇させることが報告されている。しかし、NSFT において、これらの薬物による抗うつ作用発現にセロト

ニン神経系が関与するか否かは明らかになっていない。そこで、第 2 章では mGlu2/3 受容体拮抗薬 (LY341495)、mGlu5 受容体拮抗薬 (MPEP) 及び Ketamine の急性抗うつ作用発現における AMPA 受容体、セロトニン及びセロトニン受容体の関与について、NSFT を用いて検討した。その結果、LY341495 (1 mg/kg, i.p.) 及び Ketamine (30 mg/kg, i.p.) の抗うつ作用は AMPA 受容体拮抗薬 (NBQX: 10 mg/kg, s.c.) により拮抗されたものの、MPEP (3 mg/kg, i.p.) の抗うつ作用は拮抗されなかった。また、LY341495、MPEP 及び Ketamine の抗うつ作用はセロトニン拮抗薬により拮抗された。さらに、LY341495 及び Ketamine の抗うつ作用は 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬 (WAY100635: 3 mg/kg, s.c.) により拮抗され、5-HT_{2A/2C} 受容体拮抗薬 (Ritanserin: 0.5 mg/kg, i.p.) により拮抗されなかった。一方、MPEP の抗うつ作用は WAY100635 により拮抗されず、Ritanserin により拮抗された。

これらの結果と既報より、NSFT における mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用には AMPA 受容体活性化→セロトニン遊離促進→5-HT_{1A} 受容体活性化が関与する可能性が考えられた。一方、NSFT における mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ作用には AMPA 受容体非依存的なセロトニン遊離促進→5-HT_{2A/2C} 受容体活性化が関与する可能性が考えられた (Fig. 2)。

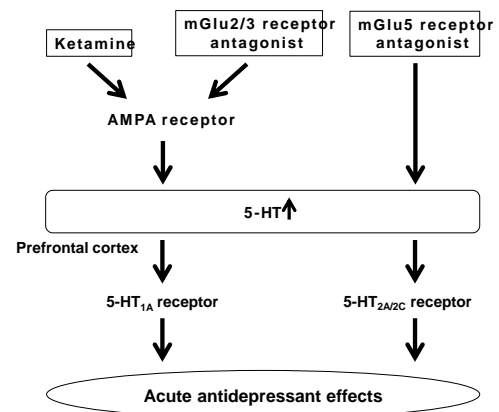


Fig 2 Proposed mechanisms of the acute effects of Ketamine, mGlu2/3 receptor antagonist and mGlu5 receptor antagonist.

第 3 章 代謝型グルタミン酸 2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用における内側前頭前皮質－背側縫線核回路を介したセロトニン神経の関与

第 2 章において、NSFT における mGlu2/3 受容体拮抗薬の作用機序は Ketamine の作用機序と共通することが示唆された。最近、ラットの mPFC から背側縫線核 (DRN) に投射するグルタミン酸神経を光遺伝学的手法により選択的に刺激すると抗うつ作用が発現し、DRN の神経全体を刺激すると抗うつ作用は発現しないことが報告された。DRN は主にセロトニン神経の神経核を有する。これらのことから、mPFC から DRN に投射しているグルタミン酸神経により選択的に活性化されるセロトニン神経が抗うつ作用の発現において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、mGlu2/3 受容体拮抗薬がラット DRN のセロトニン神経発火を促進すること、及び mGlu2/3 受容体拮抗薬と NMDA 受容体拮抗薬が AMPA 受容体の活性化を介してラット mPFC における細胞外セロトニン量を増加させることが報告されている。これらの報告と第 2 章の結果から、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現には mPFC の AMPA 受容体の活性化を介した DRN のセロトニン神経の活性化が関与している可能性が考えられる。

そこで、第 3 章では、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現におい

て mPFC-DRN 回路により制御されるセロトニン神経が関与するか否かについて、最も一般的な抗うつ活性の評価方法である強制水泳試験 (FST)、脳内微量注入法及び免疫組織化学的手法を用いて検討した。その結果、LY341495 (1 mg/kg, 0.03 pmol/side) 及び Ketamine (30 mg/kg, 3 nmol/side) は全身投与及び mPFC 内投与により、抗うつ作用を示し、それらの作用はセロトニン枯渇薬により拮抗された。また、LY341495 及び Ketamine の全身投与による抗うつ作用は、AMPA 受容体拮抗薬 (NBQX) の全身投与 (10 mg/kg, s.c.) 及び mPFC 内投与 (0.03 nmol/side) により拮抗された。さらに、LY341495 及び Ketamine の全身投与及び mPFC 内投与は DRN において c-Fos を発現するセロトニン神経細胞の割合を上昇させ、全身投与によるこれらの抗うつ作用は NBQX の mPFC 内投与により拮抗された (Table 1, Fig. 3)。一方、NBQX の mPFC 内投与は DRN において c-Fos を発現するセロトニン神経細胞の割合に影響を及ぼさなかった。以上の結果を Table 1 に示した。

これらの結果から、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現には mPFC における AMPA 受容体を介した DRN のセロトニン神経の活性化が関与する可能性が示された (Fig. 3)。

Table 1

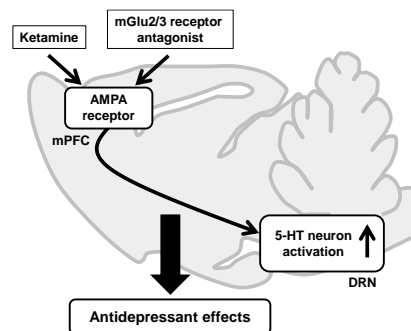
Drugs		Antidepressant effect			c-Fos/5-HT (colocalization)	
		-	+ PCPA (systemic)	+ NBQX (mPFC)	-	+ NBQX (mPFC)
mPFC	LY341495	○	Block	n.d.	↑	n.d.
	Ketamine	○	Block	n.d.	↑	n.d.
	NBQX	×	n.d.	n.d.	→	n.d.
Systemic	LY341495	○	Block	Block	↑	Block
	Ketamine	○	Block	Block	↑	Block

Summary of the antidepressant effect of LY341495 or Ketamine, and the effect of LY341495 or Ketamine on the c-Fos immunoreactivity colocalized with 5-HT neuron cells in the DRN.
(○: effect, ×: no effect, →: not affected, ↑: increase, n.d.: not determined)

【結論】

本研究は、NSFT において、mGlu5 受容体拮抗薬が Ketamine と同様に急性及び持続性の抗うつ作用を発現し、その持続性作用については Ketamine と作用機序が異なることを示した。また、NSFT において、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現に AMPA 受容体を介したセロトニン神経系の活性化が関与することを初めて明らかにし、それらの作用機序は mGlu5 受容体拮抗薬とは異なることを示した。さらに、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現には mPFC-DRN 回路により制御されるセロトニン神経が関与することを示した。以上のことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の作用機序について新たな知見を提示した。また、mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用の機序について、Ketamine の作用機序との共通

Fig. 3



Proposed neural mechanisms of the antidepressant effects of mGlu2/3 receptor antagonist and Ketamine in the FST.

性を見出したことで、mGlu2/3 受容体拮抗薬が Ketamine 様の抗うつ作用を発現し、Ketamine よりも使いやすい有望な治療薬となる可能性を示した。本研究結果は mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用の機序にセロトニン神経系が神経回路レベルで関与する可能性を示した初めての知見であり、今後、うつ病領域における創薬研究に有用な情報を与えるものである。

【研究結果の掲載誌】

- 1) Behav Brain Res, 235, 287-292 (2012)
- 2) Psychopharmacology (Berl), 231, 2291-2298 (2014)
- 3) J Pharmacol Sci, 127, 57-61 (2015)
- 4) Neuropsychopharmacology, 41, 1046-1056 (2016)

論文審査の結果の要旨

うつ病は抑うつ気分又は興味・喜びの喪失などの症状を呈する精神疾患であり、その治療には選択的モノアミン再取り込み阻害薬が第1選択薬として使われている。しかし、既存の抗うつ薬では効果が不十分であることや遅効性であることが問題となっている。近年、NMDA受容体拮抗薬の Ketamine がうつ病患者及び治療抵抗性うつ病患者に対して、即効性かつ持続性のある抗うつ作用を示し、注目を集めている。しかし、Ketamine は投与初期及び長期使用による副作用発現の懸念などにより、その使用は制限されている。そこで、Ketamine と同様の薬効を有しながら安全でより使いやすい治療薬の創製が望まれている。福本健一氏の学位論文は、臨床上、安全性が確認されている代謝型グルタミン酸 (mGlu) 受容体拮抗薬、特に mGlu2/3 受容体及び mGlu5 受容体に着目し、それらの拮抗薬を Ketamine と比較しながら、両者の作用機序を薬理的・生化学的側面から検討し、その抗うつ薬としての有用性を示唆したものである。

第1章では、マウス新奇環境摂食抑制試験 (NSFT) を用い、mGlu 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現及びその作用における TrkB/mTOR シグナルの関与について検討した。その結果、mGlu5 受容体拮抗薬は Ketamine と同様に急性及び持続性の抗うつ様作用を発揮し、その持続性作用の機序には Anisomycin で阻害される新規タンパク質の合成が関与することを明らかにした。一方、mGlu5 受容体拮抗薬の持続性作用では Ketamine と異なり mTOR シグナルの関与は部分的であり、さらに BDNF/TrkB シグナルは関与しないことを示した。

第2章では、同試験を用いて、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ様作用発現におけるセロトニン神経系の関与について検討した。NFST において mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は、AMPA 受容体を介して前頭前皮質でのセロトニン遊離を促進し、さらに 5-HT_{1A} 受容体を刺激することで抗うつ様作用を発現する可能性を初めて明らかにした。一方、NSFT における mGlu5 受容体拮抗薬は AMPA 受容体非依存的に前頭前皮質のセロトニン遊離を促進し、その結果 5-HT_{2A/2C} 受容体を刺激することで抗うつ様作用を発現していることを見出だした。

第3章では、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現において内側前頭前皮質から背側縫線核に投射する神経制御が関与するか否かについて、抗うつ活性の評価方法であるマウス強制水泳試験、脳内微量注入法及び免疫組織化学的手法を用いて検討した。その結果、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現には内側前頭前皮質における AMPA 受容体を介した背側縫線核のセロトニン神経の活性化が関与する可能性を見出だした。

以上、本研究は mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用の発現機序には内側前頭前皮質から背側縫線核に投射する神経回路によって制御されるセロトニン神経系が関与する可能性を初めて示したものである。本研究結果により、今後、Ketamine に相当する効果を発揮しつつ、安全性が確認されている mGlu 受容体拮抗薬に着目す

ることは、うつ病領域の創薬研究に有用な情報を与えることが示された。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しい内容であると判断する。