

自殺者死後脳およびうつ病モデルにおけるグルコルチコイド阻害因子 FKBP5 の検討

泉 剛^{1, 2)}, Robel Ghebream¹⁾, 吉田隆行¹⁾, 大塚郁夫³⁾, 菱本明豊³⁾, 吉岡充弘¹⁾

- 1) 北海道大学大学院医学研究科 神経薬理学分野
- 2) 北海道医療大学薬学部 薬理学講座 臨床薬理毒理学
- 3) 神戸大学大学院医学研究科 精神医学分野

【研究の背景】

うつ病の半数は視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系の機能亢進を示す。HPA 系は、最終産物であるグルコルチコイドによって視床下部と下垂体がネガティブ・フィードバックを受けているほか、上位脳による調節も受けている。破壊や電気刺激実験により、海馬は HPA 系を抑制的に、扁桃体は促進的に調節していることが分かっている。これまでの研究で、慢性ストレスにより海馬が萎縮すること、抗うつ薬による神経新生亢進が海馬で起きることにより、うつ病の責任脳部位として海馬が想定されてきた。一方、不安の中核である扁桃体は、海馬とは逆に慢性ストレスにより肥大することが報告されており、また、うつ病患者の扁桃体は fMRI で情動刺激に対する過剰反応を示すことが知られている。

HPA 系に対する分子レベルでのネガティブ・フィードバックも存在する。FKBP5 はグルコルチコイド受容体 (GR) の阻害因子であり、GR の活性化を妨げるが、GR は FKBP5 の転写を亢進させる。つまり HPA 系が亢進して GR が活性化されると、FKBP5 が増加して GR の過剰な活性化を防ぎ、GR の機能を一定範囲にセッティングしている。グルコルチコイドが GR を介して HPA 系にフィードバック阻害をかけるのに対し、GR と FKBP5 は細胞レベルで相互に調節し合う関係にある。さらに、FKBP5 はカルシニューリンの促進因子でもあり、mTOR 系を介してオートファジーを調節するなど、多面的な機能を持つことが報告されている (Gassen et al., 2015)。

近年、多型研究において FKBP5 とうつ病の相関が報告されている。共同研究者の菱本らは自殺既遂者の血液サンプルを用い、FKBP5 の機能的多型と自殺が相関することを報告した (Supriyanto et al., 2011)。多型研究やエピジェネティクスにおいて、FKBP5 と PTSD の相関も報告されている。特に early life stress の既往によって相関が強まることが判明しており、FKBP5 は個体要因と環境要因の相互作用を規定する因子ではないかと考えられている (Carvalho et al., 2017)。

【目 的】

本研究では、慢性ストレス負荷によるうつ病モデルラットにおける血中コルチコステロン基礎値、脳内の GR および FKBP5 を定量した。そして、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) であるエスシタロプラムの慢性投与が脳内 FKBP5 に及ぼす効果について検討した。さらに、自殺者死後脳で FKBP5 を定量した。うつ病は自殺の最大の危険因子であり、自殺者はその原因によらず自殺直前には重度のうつ状態にある。自殺既遂者のサンプルはうつ病の究極の表現型を反映していると言える。本研究により、FKBP5 がうつ病治療のターゲット分子となり得るかを検討し、将来の新規抗うつ薬の開発につなげたい。

【方 法】

- ① 7 週齢の雄性 Wistar/ST ラットに 1 日 3 時間の拘束ストレスを 1 日 (RS1 群) または 7 日間 (RS7 群) 負荷し、2 週間後に高架式十字迷路試験と強制水泳試験を施行した。また、同様のストレスを負荷した 2 週間後に、行動試験は行わずに採血と抜脳を行った (10:00 AM)。血中コルチコステロンの基礎値は EIA 法で測定した。また、内側前頭前野、海馬、扁桃体の GR および FKBP5 を Western blotting で定量した。さらに、このうつ病モデルラットに対し、SSRI であるエスシタロプラム (ESC) を、拘束ストレス後に 2 週間慢性投与した (10 mg/kg, i.p.)。これにより、ストレスによる行動および脳内 FKBP5 の変化が拮抗されるかどうかを検討した。

② 共同研究者(神戸大学)から提供を受けた非自殺者および自殺者サンプルを用い、背外側前頭前野皮質の FKBP5 量を Western blotting で定量し比較した。検体は法医学解剖の際に、遺族の同意のもと採取されたものである。提供者が自殺直前にどのような精神状態にあったかは不明であるが、自殺者の多くは抑うつ状態にあり、かつ衝動性・攻撃性亢進をきたしていることが知られており、脳内 FKBP5 量がこれらの精神状態と関連しているかどうかを推測することができる。

③本研究は神戸大学、北海道大学の研究倫理および動物実験倫理委員会の承認の下、指針に従って行った。

【結 果】

7 日間の拘束ストレスを負荷した群(RS7 群)では、最終ストレスの翌日、1 および 2 週間後において、コントロール群に対して有意な体重の減少が認められた(data not shown)。1 日だけの拘束ストレスを負荷した群(RS1 群)では有意な体重の減少は認められなかった。高架式十字迷路試験では、RS1 および RS7 群のいずれも、運動量の指標である total count および total distance、不安の指標である open time で、コントロール群との有意な差は認められなかった(data not shown)。強制水泳試験において、RS1 ($P<0.05$) および RS7 群 ($P<0.01$) のいずれも、うつ様行動の指標である immobility が有意に増加し、swimming も RS7 群で有意に減少していた ($P<0.01$) (図 1)。RS7 群の immobility 増加は、最終ストレス負荷から強制水泳試験施行前日までの 14 日間のエスシタロプラム(ESC)投与によって拮抗された ($P<0.05$) (図 2)。また、最終ストレスの 2 週間

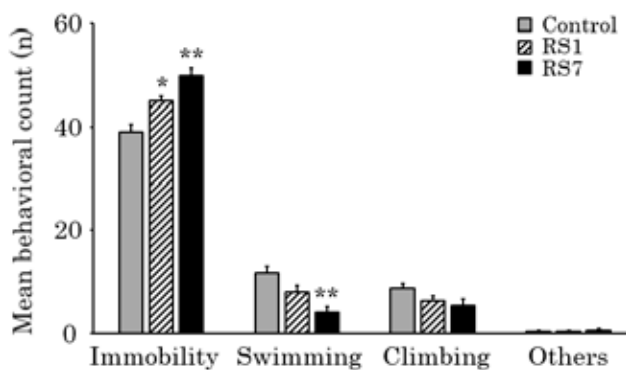


図 1 強制水泳試験に対する拘束ストレスの効果 (n=8-9)

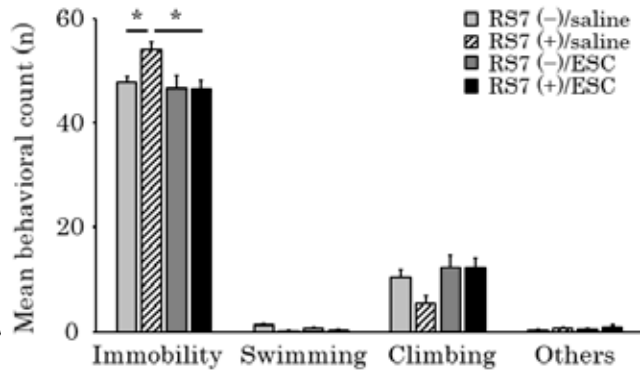


図 2 強制水泳試験に対する拘束ストレスおよびエスシタロプラム(ESC)の効果 (n=8-9)

後に、RS7 群の血中コルチコステロン(10:00AM)はコントロール群に対して有意に増加していた(コントロール群, 62.1 ± 5.7 ng/ml; RS1 群, 76.5 ± 5.2 ng/ml; RS7 群, 121.1 ± 13.7 ng/ml, $n=7-8$, $P<0.01$)。以上より、RS7 群はうつ病モデルとして妥当

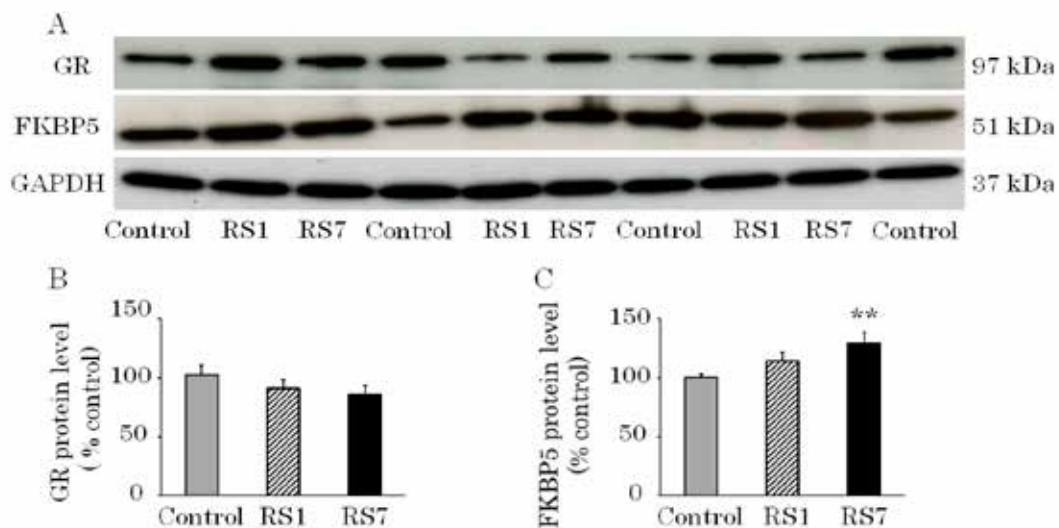


図 3 扁桃体の Western blotting、(A) 代表的な blotting の図、(B) GR および (C) FKBP5 に対する拘束ストレスの効果 (n=12-14)

であると考えられた。最終ストレスの 2 週間後に施行した脳組織の Western blotting では、RS7 群の FKBP5 は扁桃体においてコントロール群に対して有意に増加していた ($P<0.01$)。GR に変化はなかった (図 3)。内側前頭前野および背側海馬においてはこのような変化は認められなかった。RS7 群の扁桃体における FKBP5 増加は、ESC 投与を行った場合には認められなかった (図 4)。

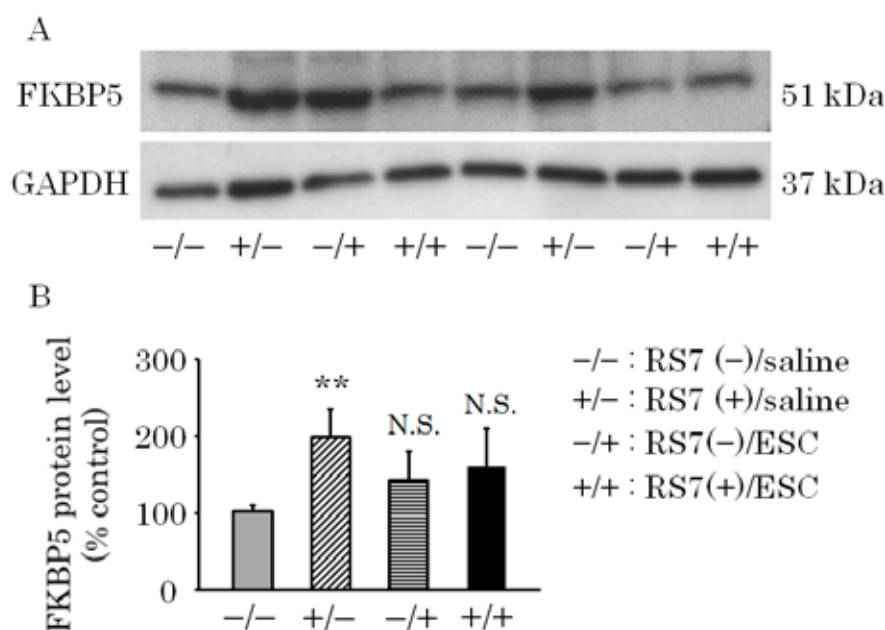


図 4 扁桃体の Western blotting、(A) 代表的な blotting の図、(B) FKBP5 に対する拘束ストレスおよびエスシトロプラムの効果 (n=8) N.S., コントロール群と有意差なし。

自殺者死後脳の背外側前頭前野皮質の Western blotting では、非自殺者群に対して、自殺者群で FKBP5 が減少傾向にあったが、有意な差ではなかった ($P=0.054$) (図 5)。

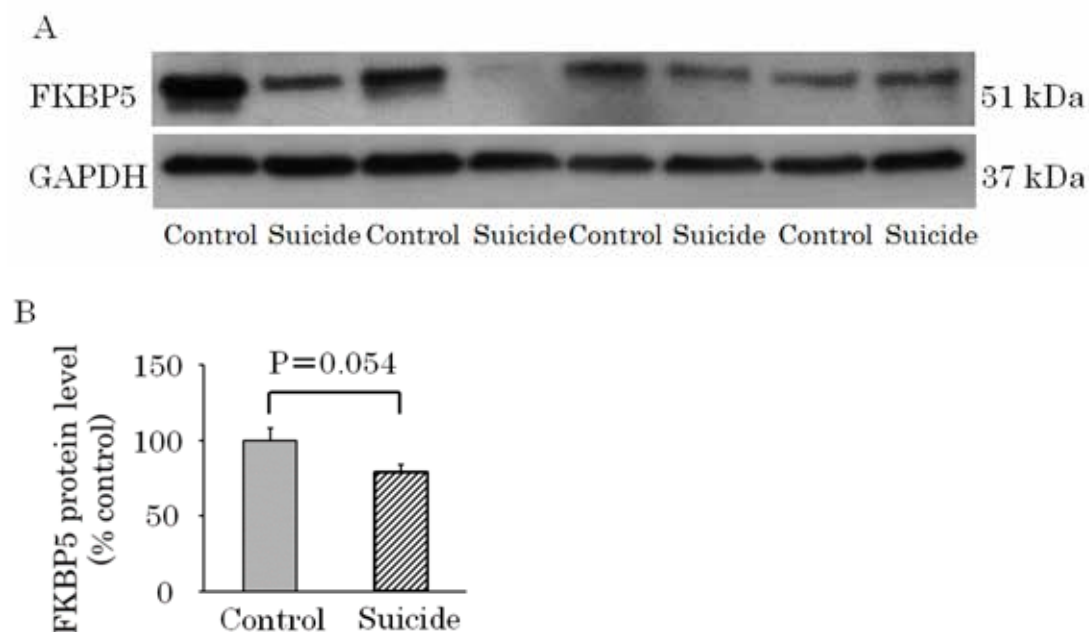


図 5 自殺者死後脳の背外側前頭前野皮質の Western blotting、(A) 代表的な blotting の図、(B) 非自殺者群と自殺者群の FKBP5 量の比較 (n=8)

【考 察】

破壊や電気刺激実験の結果より、扁桃体が視床下部室旁核の CRH 産生ニューロンに対してポジティブ・フィードバックをかけていることが知られている。GR は扁桃体の出力核である扁桃体中心核のニューロンに高密度に存在し、また扁桃体中心核から視床下部室旁核へ神経投射が存在することが報告されている。これより、ストレスによって上昇した血中コルチコステロンは、室旁核へ投射している扁桃体中心核のニューロンを GR を介してさらに活性化していることが推測される。FKBP5 は GR の抑制因子であり、また活性化された GR によって誘導される遺伝子産物のひとつである。

今回の実験では、反復拘束ストレスによってうつ様行動が増加し、さらに血中コルチコステロンの基礎値が上昇し、扁桃体で FKBP5 が増加した。このことから、反復拘束ストレスは扁桃体から室旁核への出力ニューロンを持続的に活性化し、これが反復拘束ストレスによる HPA 系の機能亢進とうつ様行動増加に寄与していることが推測される。そして、扁桃体から室旁核への出力ニューロンの活性化が GR を介しているとすれば、扁桃体の FKBP5 増加は、これに対して扁桃体ニューロンの過度の活性化を抑制する適応的变化であることが推測される。

臨床研究では、複数の多型研究において FKBP5 とうつ病の相関が報告されている。共同研究者の菱本らは自殺既遂者の血液サンプルを用い、FKBP5 の機能的多型と自殺が相関することを報告した。(Supriyanto et al, 2011)。FKBP5 が PTSD と相関することも報告されている。特に early life stress の既往によって相関が強まることが判明しており、FKBP5 は個体要因(遺伝および early life stress に影響されて決まる HPA 系の反応性)と環境要因(成人後のストレス)の相互作用を規定する因子ではないかと考えられている。

うつ病の病態は、気分・意欲の変化、自律神経症状、睡眠リズム障害、HPA 系をはじめとする内分泌系の異常と多岐にわたるため、ラットやマウスを用いた研究ですべての病態を網羅するのは不可能ではないかと思われる。本研究では HPA 系の異常に焦点をあて、扁桃体における FKBP5 の増加を検出することに成功した。自殺者死後脳の検討では、前頭葉背外側皮質で FKBP5 の減少傾向が認められたが、有意な差ではなかった。検体数がまだ少数(n=8)であるため、今後、研究を継続して検体数を増やし、病態生理的な意義を検討したい。

これまで、慢性ストレスにより海馬が萎縮すること、および抗うつ薬による神経新生亢進が海馬で起きることにより、うつ病の責任脳部位として海馬が想定されてきた。一方、不安の中枢である扁桃体は、海馬とは逆に慢性ストレスにより肥大することが報告されており、また、うつ病患者の fMRI 研究では、扁桃体が情動刺激に対して過剰反応を示すことが共通して報告されている。これより、うつ病の責任脳部位として海馬だけでなく、扁桃体も関与していることが予想される。しかし、うつ病の動物モデル研究で扁桃体の異常を指摘しているものは少なく、今後の研究の進展が望まれる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

複数の多型研究でうつ病との相関が報告されている GR 阻害因子 FKBP5 について、うつ病モデルラットの扁桃体で変化を検出した。FKBP5 はカルシニューリンの促進因子でもあり、mTOR 系を介してオートファジーを調節するなど、多面的な機能を持つことが報告されている。また、タクロリムスやラパマイシンなど、免疫抑制剤としてすでに臨床で使用されている薬物が FKBP5 と結合して作用することが知られている。今後、本研究の結果を手がかりとして、HPA 系だけでなく、カルシニューリン系、mTOR 系やオートファジーとうつ病との関連へ研究を広げ、またタクロリムスやラパマイシンの抗うつ作用を動物実験で検討するなど、将来の新規抗うつ薬の開発につなげていきたい。

【参考・引用文献】

1. Carvalho CM CB, Ota VK, Mello MF, Belangero SI: Single-nucleotide polymorphisms in genes related to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as risk factors for posttraumatic stress disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 174, 671-682, 2017
2. Gassen N, Hartmann J, Schmidt MV, & Rein T: FKBP5/FKBP51 enhances autophagy to synergize with antidepressant action. *Autophagy* 11, 578-58, 2015
3. Supriyanto I, Sasada T, Fukutake M, Asano M, Ueno Y, Nagasaki Y, Shirakawa, Hishimoto A: Association of FKBP5 gene

haplotypes with completed suicide in the Japanese population. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat 35, 252-256, 2011