

うつ病の扁桃体における FKBP5 の役割

泉 剛^{1,2)}, 鹿内浩樹^{1,2)}, 進藤つぐみ¹⁾

- 1) 北海道医療大学薬学部 薬理学講座 臨床薬理毒理学
- 2) 北海道医療大学 先端研究センター

【研究の背景】

FKBP5 は視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系関連分子であり、多型研究においてうつ病や自殺、PTSD との相関が報告されている。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)。最初、FKBP5 は免疫抑制剤 FK506 と結合する内因性分子として見出されたが、グルココルチコイド受容体の阻害作用やカルシニューリンの促進作用を有する他、細胞増殖、可塑性、神経新生やオートファジーなど多彩な生体機能に関与する hub 分子であることが明らかとなっている。

我々は前回申請の本基金の研究 (2016 年) で、うつ病モデル動物 (成熟ラットに対する 7 日間反復拘束ストレス) の扁桃体で FKBP5 が増加し、これが SSRI の投与で正常化することを明らかにした。これまで、抗うつ薬の投与により海馬で神経新生が亢進することから、うつ病の病態仮説として「海馬で神経新生が障害されることでうつ病が発症する。」という神経新生仮説が有力であった。しかし、うつ病の fMRI 研究では、多くの研究で扁桃体の過剰活性化が示されており (Arnone et al., 2019)、扁桃体の fMRI 反応を指標とする自己フィードバック訓練でうつ病が改善することも報告されている (Williams, 2017)。

現時点では、うつ病の動物モデルによる実験研究は海馬を主要なターゲットとして行われている。しかし、うつ病の臨床症状は複雑であり、不安がうつ病の主要症状のひとつであることを考えあわせると、不安の中核である扁桃体がうつ病の病態に関与していても不思議ではない。また、長年の研究にもかかわらず、うつ病の動物モデルには薬効相関モデルしか存在しないこと、うつ病の多型研究では個々の関連遺伝子の寄与が極めて低いこと等より、単一の動物モデルでうつ病の病態すべてを再現するのは困難であると考えられる (Athira et al., 2020)。

申請者は、「海馬で変化を示すモデル」、「扁桃体で変化を示すモデル」など、複数の動物モデルによる所見を組み合わせることにより、うつ病の病態が解明できると考えている。そして、本研究では、反復拘束ストレスモデルの扁桃体における FKBP5 の変化を手がかりとして、扁桃体に関連したうつ病の病態を明らかにすることを試みた。

【目 的】

本研究は、前回申請の本基金の研究 (2016 年) で得られた「うつ病モデル動物 (反復拘束ストレス負荷ラット) の扁桃体で FKBP5 が増加し、これが SSRI の投与で正常化する。」という結果を発展させ、うつ病における扁桃体の役割を探求する試みである。具体的には、1. 免疫染色により、脳内で FKBP5 が発現している神経細胞の種類と分布を明らかにする。2. 免疫染色により、コントロール群と反復拘束ストレス群の脳内 FKBP5 発現を比較する。3. 反復拘束ストレス群の扁桃体において、①ケタミンの抗うつ作用に関与しているとされる PI3K/Akt/mTOR 経路、②シナプス形成や神経新生を制御している Wnt/ β -カテニン経路、および③抗うつ薬の作用と関連しているとされるオートファジー等、うつ病との関連が報告されているシグナル伝達系の代表的な構成分子を Western blotting で定量し、FKBP5 との関連を考察する。

【方 法】

1. 10 週齢の雄性 Wistar/ST ラットをかん流固定し、抜脳した。FKBP5 と成熟ニューロンのマーカーである NueN、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである glutaminase、GABA 作動性ニューロンのマーカーである GAD67 を蛍光 2 重染色し、

共焦点レーザー顕微鏡で鏡検した。使用した 1 次抗体は以下である。Rabbit anti-FKBP5 antibody (1:250; ab126715; knockout validated; Abcam, UK)、mouse anti-NeuN antibody (1:500; ab104224; Abcam, UK)、guinea pig anti-glutaminase antibody (1:200, Gln-GP-Af330; Frontier Institute, Japan)、mouse anti-GAD67 (1:1000; MAB5406; Millipore, USA)。

2. 7 週齢雄性 Wistar/ST ラットに 1 日 3 時間の拘束ストレスを 7 日間負荷し(反復拘束ストレス)、2 週間後にかん流固定し、抜脳した。コントロール群は 10 週齢でかん流固定し、抜脳した。FKBP5 と glutaminase を蛍光 2 重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で鏡検した。コントロール群と RS7 群の扁桃体を亜核ごとに比較し、FKBP5 の発現に差がないかどうか検討した。

3. 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 7 日間負荷し、2 週間後に抜脳し、内側前頭前野(mPFC)、背側海馬および扁桃体の組織を切り出し、タンパクを抽出した。コントロール群はストレスを負荷せず、10 週齢で抜脳した。PI3K/Akt/mTOR 経路の構成分子である Akt およびリン酸化 Akt (pAkt)、Wnt/ β -カテニン経路の構成分子である GSK-3 β およびリン酸化 GSK-3 β (pGSK-3 β)、オートファジーのマーカーである beclin-1 を Western blotting で定量し比較した。使用した 1 次抗体は以下である。Mouse anti Akt antibody (1:500, sc-5298, SantaCruz)、rabbit anti-Phospho-Akt (Ser473) antibody (1:1000, #4058, CST)、rabbit anti-GSK-3 β antibody (1:10⁶, #12456, CST)、rabbit anti-phospho-GSK-3 β (Ser9) antibody (1:1000, #9323, CST)、rabbit anti-beclin-1 antibody (1:2,500, #3738, cell signaling technology)、mouse anti-GAPDH antibody (1:10⁶, MAB374, Milipore)。

4. 本研究は北海道医療大学動物実験委員会の承認の基に行った。

【結 果】

1. 脳内 FKBP5 の発現と分布

FKBP5 は核が濃く、核周囲の細胞質が薄い染色像を示し、軸索の染色像も観察された。FKBP5 陽性細胞は大脳皮質、線条体、海馬、扁桃体に広く分布して存在していた(図 1)。大脳皮質では II-III および V、VI 層に陽性細胞が多く、IV 層では少なかった。海馬では CA1-CA3 の錐体細胞層、歯状回の顆粒細胞層に陽性細胞が密に存在し、歯状回門にも陽性細胞が分布していた。扁桃体では外側核、基底外側核および中心核に陽性細胞が分布していたが、外側核、基底外側核に比べて中心核において陽性細胞の密度が高かった。蛍光 2 重染色では、FKBP5 陽性細胞の多くが NeuN 陽性であったが、NeuN 陰性の細胞も認められた(図 2A-C)。また、FKBP5 陽性細胞には glutaminase 陽性の細胞(図 2D-F)と GAD67 陽性の細胞(図 2G-I)の両方が存在していた。これより、FKBP5 はグルタミン酸作動性および GABA 作動性ニューロンの両方で発現しており、NeuN 陰性のグリア細胞にも発現している可能性が考えられた。

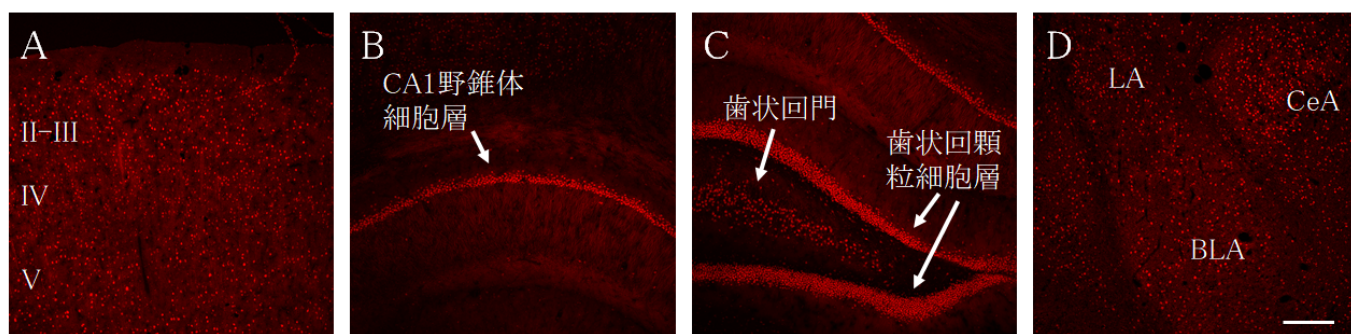


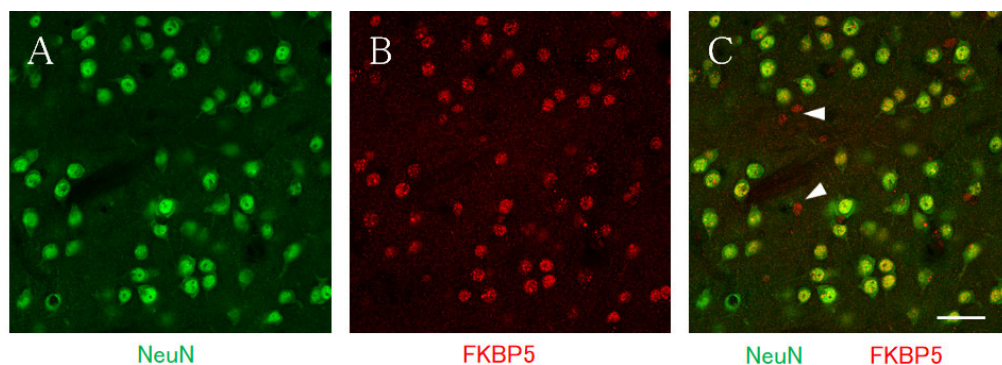
図 1. FKBP5 の蛍光染色像 (A) 体性感覚皮質 (B) 海馬 CA1 野 (C) 海馬歯状回 (D) 扁桃体
BLA: 基底外側核 CeA: 中心核 LA: 外側核 Bar = 2 mm

2. コントロール群と反復拘束ストレス群の脳内 FKBP5 発現の比較

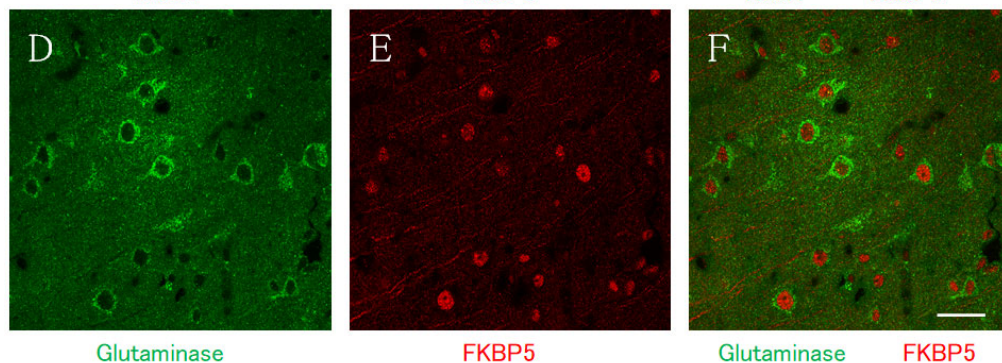
以前の研究で、反復拘束ストレスラットの脳内で FKBP5 発現を Western blotting で定量したところ、扁桃体で FKBP5 が増加しているという所見を得たため、今回は扁桃体において、FKBP5 の免疫染色像をコントロール群と反復拘束ストレス群で比較した。まず、glutaminase と FKBP5、および GAD67 と FKBP5 の蛍光 2 重染色像を比較した。しかし、外側核および基底外側核では、両群ともほとんどの glutaminase 陽性細胞および GAD67 陽性細胞が FKBP5 共陽性であった。つまり、外側核および基底外側核では、ほとんどのグルタミン酸作動性および GABA 作動性ニューロンが basal な状態で FKBP5 を発現しており、天井効果のため反復拘束ストレスによる FKBP5 発現は検出できなかった。中心核では大部分の細胞が GABA 作動

性ニューロンであるため、細胞の種類によらず細胞核を標識する DAPI と FKBP5 の蛍光 2 重染色像を比較した。その結果、コントロール群に比べて反復拘束ストレス群の中心核では、FKBP5 陽性細胞が増加している傾向が認められた(図 3)。

図 2. (A-C) 扁桃体基底核における NeuN と FKBP5 の蛍光 2 重染色像。矢頭: NeuN 陰性かつ FKBP5 陽性の細胞。Bar = 50 μ m



(D-F) 扁桃体基底核における glutaminase と FKBP5 の蛍光 2 重染色像。



(G-I) 扁桃体基底核における GAD67 と FKBP5 の蛍光 2 重染色像。

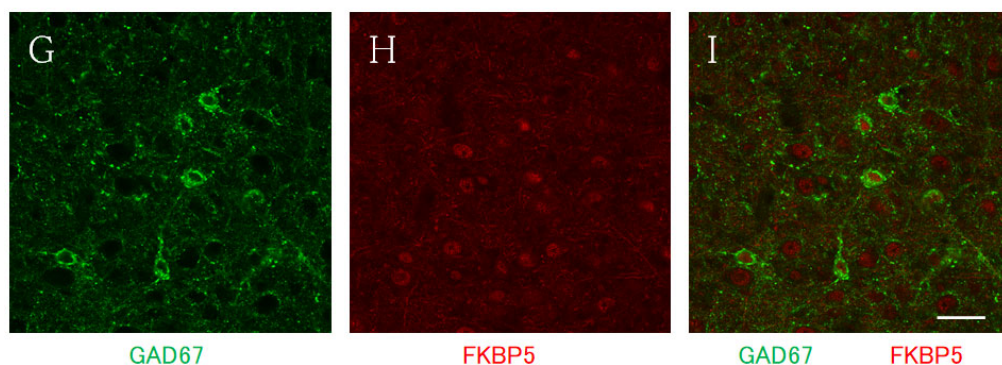
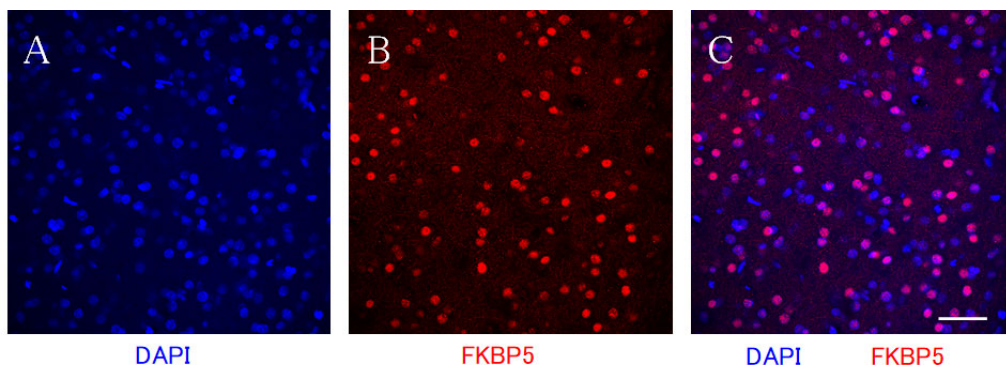
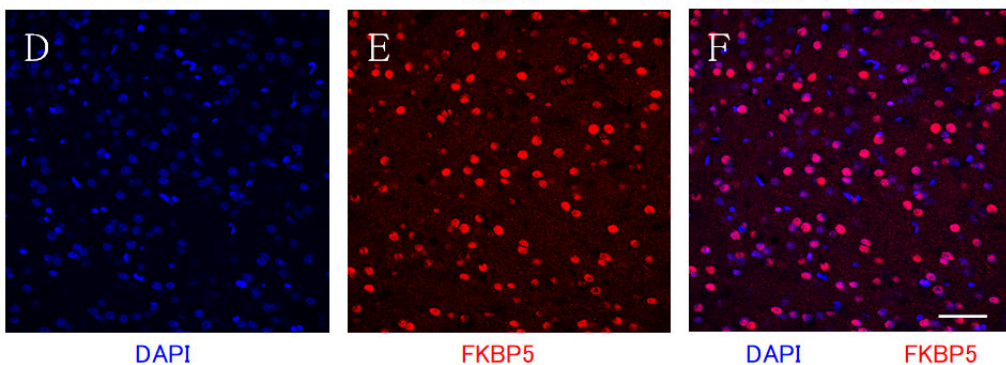


図 3. 扁桃体中心核における DAPI と FKBP5 の蛍光 2 重染色像. (A-C) コントロール群, Bar = 50 μ m



(D-F) 反復拘束ストレス群



3. Western blotting による検討

反復拘束ストレス群の

mPFC で、PI3K/Akt/mTOR 経路の構成分子である Akt の量はコントロール群と比べて変化なかったが、活性化体である pAkt の Akt に対する比 (pAkt/Akt) は有意に増加していた (図 4A, $P < 0.05$)。扁桃体では、Akt の量は有意に減少し ($P < 0.05$)、pAkt/Akt は有意に増加していた (図 4B, $P < 0.05$)。海馬では変化がなかった。Wnt/ β -カテニン経路の構成分子である GSK-3 β および pGSK-3 β 、オートファジーのマーカーである beclin-1 でも同様の検討を行ったが、変化は認められなかった (data not shown)。

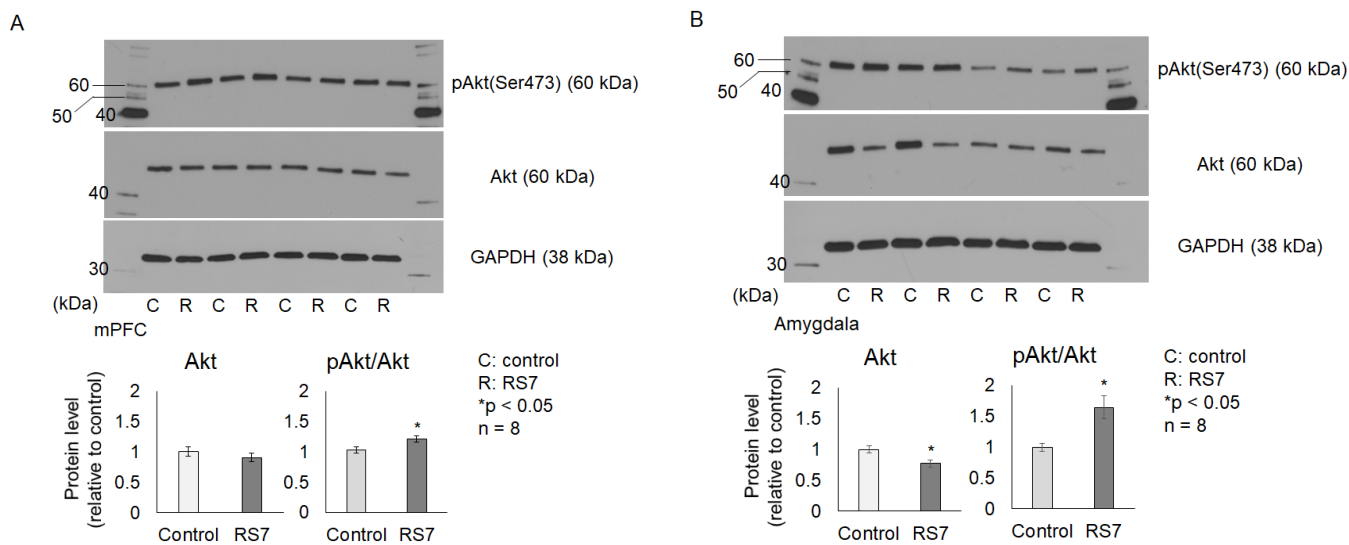


図 4. 扁桃体における Akt および pAkt の Western blotting. (A) 内側前頭野 (mPFC) (B) 扁桃体 RS7: 反復拘束ストレス 7 日間

【考 察】

前回申請の本基金の研究 (2016 年) では、反復拘束ストレスによってラットのうつ様行動が増加し、血中コルチコステロンの基礎値は上昇した。さらに扁桃体で FKBP5 が増加し、これは 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) であるエスシタロプラムの反復投与で拮抗された。今回の研究では、扁桃体における FKBP5 増加の所見を追及するため、FKBP5 の免疫染色を行った

ところ、FKBP5 は脳内でグルタミン酸作動性および GABA 作動性ニューロンの両方で発現しており(図 2)、扁桃体内では特に中心核に強い発現が認められた(図 1)。さらにコントロール群と反復拘束ストレス群で扁桃体中心核の染色像を比較したところ、反復拘束ストレス群で FKBP5 陽性細胞の数が増加している傾向が認められた(図 3)。

扁桃体は不安の中核であり、中心核は扁桃体から脳内の他部位へ不安を出力する役割を担う。中心核の細胞は大部分が GABA 作動性ニューロンであることが分かっている。また、中心核は、核外へ投射するニューロンが存在する内側部と、内側部のニューロンを抑制する介在ニューロンが存在する外側部に分けられる。そして、中心核を構成するニューロンは CRH やエンケファリンなどマーカーによって分類されているが、細胞の種類によってどのような機能の違いがあるかはまだ分かっていない(Beyeler et al., 2020)。今回の研究で見出した FKBP5 を発現している中心核の GABA 作動性ニューロンの性質については、今後、さらに検討する予定である。

FKBP5 の免疫染色像を検討していて意外であったのは、ほとんどの陽性細胞で細胞質より細胞核が濃く染色されていたことである。今回、用いた抗体は knockout mouse で特異性が確認されており(abcam product datasheet)、また同一の脳部位で FKBP5 陽性と陰性の細胞が存在しているため、染色の失敗による非特異的な染色像ではない。過去の FKBP5 の免疫染色の報告でも同様の所見が示されている(Zhang et al., 2008)。FKBP5 はグルココルチコイド受容体の阻害やカルシニューリンの促進など細胞質で機能するタンパクなので、細胞核に大量に存在するのは理にかなわない。この所見から予想されるのは、FKBP5 が核内で転写因子として機能している可能性である。この点について調べている研究は他に存在しないため、今後、追求してゆく予定である。

Western blotting による検討では、反復拘束ストレスにより、ラットの mPFC および扁桃体で PI3K/Akt/mTOR 経路(mTOR 系)の構成分子である Akt の活性化(リン酸化亢進)が認められた(図 4)。mTOR 系は細胞の増殖、分化、遊走、軸索伸長や細胞死などの制御に中心的な役割を有するシグナル伝達系であり、多くのがん細胞で mTOR 系の機能亢進が報告されている(Tian et al., 2019)。また ketamine の抗うつ作用は mTOR 系を介していることが報告されている(Niciu et al., 2014)。シグナル伝達系としては、mTOR 系は BDNF-TrkB 系の下流に存在するため、ketamine だけでなく、他の抗うつ薬も mTOR 系に作用しているのではないかと推測されている(Ignacio et al., 2016)。

Akt は、mTOR 系の構成分子であり、BDNF-TrkB 系の下流に位置し、それ自身が hub 分子として細胞増殖や細胞の生存を制御する(Ryskalin et al., 2017)。mTOR と Akt の関係は複雑である。mTOR は他の分子と複合して mTORC1 および mTORC2 を形成して機能するが、Akt は mTORC2 によって活性化される一方、リン酸化された Akt (pAkt) は mTORC1 を活性化する。今回認められた Akt のリン酸化亢進については、mTORC2 の活性化(リン酸化)の結果である可能性と、Akt のリン酸化が原因となって mTORC1 の活性化(リン酸化)を引き起こしている可能性が考えられる。これは mTOR のリン酸化部位を区別した定量(mTORC1 は Ser2448、mTORC2 は Ser2481 がリン酸化される)で確認できるが、今後の課題である。

元々、mTOR は免疫抑制剤 rapamycin のターゲット分子として発見された。その機序として、FKBP12 が rapamycin と複合体を形成し、それが mTOR を抑制することが見出された。その後の研究で FKBP5 を含む FKBP ファミリーの複数の分子が FKBP12 と同様な機能を有することが分かった。さらに、FKBP5 は rapamycin 非存在下でも Akt や mTOR の活性化を直接抑制することが培養細胞で報告されている(Hausch et al., 2013)。従って、今回までに得られた反復拘束ストレスによる扁桃体での FKBP5 増加および Akt リン酸化亢進の所見は、Akt リン酸化亢進に対する代償的な FKBP5 増加と解釈することが可能であるが、今後、mTOR およびリン酸化部位を区別した mTOR の測定を行い、mTOR 系全体の動きを評価したい。

慢性ストレスやコルチコステロン投与により、海馬では錐体細胞の樹状突起減少や細胞数減少が起きる(Watanabe et al., 1992)。ヒトのうつ病でも海馬の容積減少が MRI で確認されている(Videbech and Ravnkilde 2004)。一方、扁桃体では、慢性ストレスやコルチコステロン投与により軸索伸長やスパイン増加が起きる(シナプス・リモデリング)。この現象はヒトのうつ病における扁桃体過剰活性化に対応する現象である可能性が考えられる。扁桃体のシナプス・リモデリングの機序については、BDNF の関与を示唆する報告があるが、まだよく分かっていない(Licznerski and Duman 2013)。もし、BDNF が関与しているとすれば、その下流にある mTOR 系がシナプス・リモデリングをもたらしている可能性が高い。

【まとめ】

1. 前回申請の本基金の研究(2016 年)では、うつ病モデル動物であるラットの反復拘束ストレスの扁桃体で FKBP5 が増加し、これは 5-HT 再取り込み阻害薬(SSRI)であるエスシタロプラムの反復投与で拮抗された。

2. 今回の研究で、免疫染色により FKBP5 の脳内の発現と分布を調べたところ、FKBP5 はグルタミン酸作動性および GABA 作動性ニューロンの両方に発現しており、扁桃体内では特に中心核に強い発現が認められた。
3. 反復拘束ストレスにより、扁桃体中心核で FKBP5 陽性細胞の数が増加している傾向が認められた。
4. ほとんどの FKBP5 陽性細胞で細胞質より細胞核が濃く染色されており、FKBP5 が核内で転写因子として機能している可能性が考えられた。
5. Western blotting による検討で、反復拘束ストレスにより扁桃体で PI3K/Akt/mTOR 経路(mTOR 系)の構成分子である Akt の活性化(リン酸化亢進)が認められた。
6. mTOR 系は BDNF-TrkB 系の下流に位置し、細胞の増殖、分化、軸索伸長、細胞死などを制御しているため、今回の所見は、うつ病における扁桃体過剰活性化や、慢性ストレスによる扁桃体のシナプス・リモデリングと関連する可能性がある。
7. 今後、「扁桃体で変化を示すうつ病モデル」として、本研究を継続してゆく予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで、うつ病の動物モデルによる実験研究は、「神経新生仮説」に基づき海馬を主要なターゲットとして行われてきた。一方、うつ病の脳機能画像研究では、多くの研究で扁桃体の過剰活性化が示されているが、扁桃体をターゲットとしたうつ病の動物モデルによる実験研究はほとんど行われていない。うつ病の病態は複雑であり、単一の動物モデルでうつ病の病態をすべて再現できるとは考えられない。「海馬で変化を示すモデル」、「扁桃体で変化を示すモデル」など、複数の動物モデルの所見を組み合わせることで初めてうつ病の病態を再現できると考えられる。申請者は、本研究を「扁桃体で変化を示すうつ病モデル」として位置付け、今後もうつ病の病態解明と治療薬開発に貢献するために本研究を継続する予定である。

【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. Arnone D: Functional MRI findings, pharmacological treatment in major depression and clinical response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 91, 28-37, 2019
3. Williams LM: Amygdala-guided neurofeedback for major depression. *Am J Psychiatry* 174(8), 717-718, 2017
4. Athira KV, Bandopadhyay S, SamudralaIPK, Naidu VGM, Lahkar M, Chakravarty S: An overview of the heterogeneity of major depressive disorder: current knowledge and future prospective. *Current Neuropharmacology* 18, 168-187, 2020
5. Beyelera A, Dabrowska J: Neuronal diversity of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis. *Handb Behav Neurosci* 26, 63-100, 2020
6. Abcam product datasheet Anti-FKBP51 antibody [EPR6617] ab126715 <https://www.abcam.com/fkbp51-antibody-epr6617-ab126715.html>
7. Zhang X, Clark AF, Yorio T: FK506-binding protein 51 regulates nuclear transport of the glucocorticoid receptor β and glucocorticoid responsiveness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 (3), 1037-1047, 2008
8. Tian T, Li X, Zhang J: mTOR signaling in cancer and mTOR inhibitors in solid tumor targeting therapy. *Int J Mol Sci* 20, 755, 2019
9. Niciu MJ, Henter ID, Luckenbaugh DA, Zarate Jr CA, Charney DS: Glutamate receptor antagonists as fast-acting therapeutic alternatives for the treatment of depression: ketamine and other compounds. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54, 119-39, 2014
10. Ignacio ZM, Reus GZ, Arent CO, Abelaira HM, Pitcher MR, Quevedo J: New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs. *Br J Clin Pharmacol* 82(5), 1280-1290, 2016
11. Ryskalin L, Lazzeri G, Flaibani M, Biagioni F, Gambardella S, Frati A, Fornai F: mTOR-Dependent Cell Proliferation in the Brain. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 7082696

12. Hausch F, Kozany C, Theodoropoulou M, Fabian AK: FKBP5 and the Akt/mTOR pathway. *Cell Cycle* 12(15), 2366–2370, 2013
13. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS: Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588, 341–345, 1992
14. Licznarski P, Duman RS: Remodeling of axo–spinous synapses in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience*, 251, 33–50, 2013
15. Videbech P, Ravnkilde B: Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiat* 161(11), 1957–1966, 2004