



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Stem cell therapy as a candidate option for pharmacological treatment of refractory depression (幹細胞療法は、難治性うつ病の薬理的治療におけるオプションの候補となりうる)
Author(s) 著者	木川, 昌康
Degree number 学位記番号	甲第 2784 号
Degree name 学位の種類	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 2784 号	氏 名	木川 昌康
論文題名 Stem cell therapy as a candidate option for pharmacological treatment of refractory depression (幹細胞療法は、難治性うつ病の薬理的治療におけるオプションの候補となりうる)			
研究目的 近年、病態仮説に基づいて、様々なタイプの抗うつ薬の開発が進み、市場にも登場しているが、一方で、抗うつ薬に治療抵抗性である、難治性うつ病の問題はますますクローズアップされてきている。特に、若年の難治性うつ病の患者では、社会性行動の障害や焦燥・衝動性の亢進が目立ち、自殺企図や自傷行為が多く、またアルコール問題との関連性も示唆されている。再発・再燃を繰り返し、学業や就労を含め、社会生活に支障をきたしている難治例に対して、より有効な治療法の確立は、現代社会における急務と考えられる。 こうしたうつ病の難治化には胎生期、思春期におけるストレスが関係していると言われていることから、本研究では、難治性うつ病の動物モデルを作製するとともに、新たな治療手段としての神経幹細胞移植療法の可能性を検討することを目的とした。 当研究室では、これまでに、アルコールによる脳神経ネットワークの異常に関わる、細胞・分子変異について検索・解明を続けてきた。アルコールによって神経幹細胞の分化が特異的に変化し、神経細胞への分化が抑制されることも示してきた。そして、母体のアルコール摂取によって、胎児脳内の神経幹細胞の機能に異常が生じ、その後の子供の脳神経ネットワーク形成が重大な影響を受けている可能性を指摘してきた。さらに、胎仔脳由来神経幹細胞の経静脈的投与が、種々の精神疾患モデル動物の行動学的異常を改善させる可能性を示唆、報告してきた。 本研究では、胎生期でのアルコール曝露と、思春期でのコルチコステロン（慢性）投与を組み合わせ、難治性うつ病モデルの作製を試みた。胎仔期のアルコール曝露は、成長後の Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) の病態モデルであり、ストレスホルモンとして知られている。また、海馬の萎縮とも関係しているコルチコステロンの慢性投与は、うつ病の病態モデルの 1 つである。我々は、本モデル動物が薬剤の効かない難治性のうつ病モデルになる可能性、また、薬剤に加え、神経幹細胞を併用処置することが、こうしたうつ病の難治例に対する新たな治療オプションとなりうることについて検討、解析を実施した。			

研究方法

(1) FASD モデルの作製：

母体ラットとして Wistar 系妊娠ラットを購入(Clea Japan, Inc)した。胎生 10 から 13 日にかけて、対して 1 日総量 6g/kg エタノールを 12 時間毎 2 回に分け、ゾンデを用いて強制的に経口投与した。また、コントロール群には、同様の方法で生理食塩水の投与を行なった。処置後、妊娠ラットはそれぞれ個別のケージで出産まで管理した。出生仔は生後 4 週齢で離乳させ、雌雄に分離した上で、1 群 4～6 匹/ケージで管理を行い、実験に供した。

(2) 投与用神経幹細胞の調整：

神経幹細胞 (Neural Stem Cell: NSCs) は、当教室の既法に従い、単層培養法を改良した方法で得た。Wistar 系ラットを別途購入(Clea Japan, Inc)し、妊娠 13.5 日目に胎仔より顕微鏡下で終脳を摘出した。ハンクス平衡塩基溶液(HBSS)中でピペッティングにより分散し、塩基性線維芽成長因子(FGF-2)、グルタミン、および添加物 B27(Invitrogen 社)を加えた Neurobasal Medium(NBM)に細胞を混濁、オルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングした培養ディッシュに播種した。37°C、5%CO₂の条件下で 5～7 日間培養し、神経幹細胞を選択的に増殖させた後、蛍光色素 (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester: CFSE) にて細胞を標識した上で、ディッシュから剥離して回収し、生理食塩水を用いて細胞濃度 1.0×10^7 個/0.5ml の細胞浮遊液に調整した。さらに、等量の 0.02%のアテロコラーゲンを混合し、投与に用いる最終の細胞浮遊液とした (最終細胞濃度 5.0×10^6 個/0.5ml)。FGF-2 含有培地中で増殖させた細胞は、5～7 日後には 90%以上が神経幹細胞の特異的マーカーであるネスチンに陽性であることを確認した。また、0.02%以下のアテロコラーゲン添加によっては、神経幹細胞の増殖、分化、遊走、および生存機能に影響を及ぼさないことを確認している。

(3) 神経幹細胞投与：

胎生期アルコール曝露群とコントロール群に対して、生後 42 日齢で、1 匹当たり 0.5 ml の容量で、アテロコラーゲン含有神経幹細胞浮遊液、あるいは生理食塩水を尾静脈より投与した。

(4) corticosterone (CORT) 慢性投与：

CORT 投与群については、生後 70 日齢～90 日齢に、CORT 懸濁液 (20 mg/kg, 1 %DMSO および 1 %Tween 80 を含有する生理食塩液に懸濁) を 1 日 1 回、21 日間、明期に皮下投与した。コントロール群には溶媒を同様に投与した。

(5) sertraline (Ser) 慢性投与：

既存の抗うつ剤である Ser を投与した。生後 70 日齢～90 日齢に、Ser 溶液 (10 mg/kg, 生理食塩液に溶解) を 1 日 1 回、21 日間、腹腔内投与した。コントロール群には溶媒を同様に投与した。

(6) 行動学的評価：強制水泳試験 (Forced Swim Test ; FST)

まず、CORT および Ser 最終投与日 (90 日齢) に 15 分間の FST を実施した。翌日 (CORT 最終投与から 24 時間以内) に 5 分間の FST を実施し、本試験とした。実験中、水温は 25 ± 1 °C に保持し、水深は 30cm とした。実験の様子をビデオ撮影し、無動反応時間 (秒) をもって、うつ病様状態の行動学的指標とした。

(7) Western-blotting 法 :

行動評価終了後、ラットを乾燥したタオルで拭き、保温することによって、ラットに更なるストレスをかけないように配慮した上で、ラットより脳サンプルを摘出した。前部帯状回、扁桃核、および海馬の各脳組織をパンチングにて採取し、市販の Lysis buffer に溶解して回収し、タンパク濃度を一定にするるとともに、sample buffer を加えてボイルした。一定量のサンプルをローディングした SDS-PAGE を実施した後、PVDF 膜 (Millipre 社) に転写した。ブロッキング後、ウサギ由来の抗 PSD95 抗体 (1:1000) を一次抗体として反応後、1000 倍希釈した二次抗体 (抗ウサギ IgG 抗体; HRP-Linked F(ab')₂ Fragment, Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いてインキュベートした。免疫反応性の検出には ECL システム (Amersham 社) を用いた。

(8) 免疫組織化学的検索 :

行動評価の後、脳を摘出し、顕微鏡、及び蛍光顕微鏡で鏡検するためのスライスを作成した。抑制性 GABA ニューロンのマーカー蛋白質 GAD67 に対する抗体を用いた細胞免疫染色と、CSFE のダブルイメージングを行なった。GABAergic intraneuron 数の変化を評価するため、抗 Parvalbumin (PV) 抗体を用いた免疫染色 (DAB 標識) 後に、標準化された視野領域中の抗体陽性細胞数をカウントした。また、脳組織の一部は、社会的行動との関連が深いとされる、前部帯状回、扁桃核、海馬に分離し、Western-blotting 法を用いて、シナプス発現量に関わる PSD95 蛋白レベル変化を解析した。

研究成績及び考察

(1) 行動評価 : FST

CORT 誘発うつ病モデル群では抗うつ剤である Ser 投与により FST での無動化時間が有意に短縮されたが、胎生期にエタノールに曝露され、更に成長後のストレス (CORT への慢性的曝露) を受けた難治性うつ病モデルでは、Ser 単独投与では無動化時間短縮効果は全く認められなかった。また、難治性うつ病モデルでは、CORT 誘発うつ病モデルよりも有意に無動化時間が延長していることから、本モデルでは、うつ状態がより重度になっている可能性が伺えた。しかしながら、本難治性うつ病モデルのうつ状態が、神経幹細胞の投与で有意に減弱し、特に、神経幹細胞投与と抗うつ薬 Ser 投与を併用した動物群においては、顕著に改善したことから、神経幹細胞投与、あるいは神経幹細胞投与+薬物投与が、より難治化したうつ病に対する新規でかつ有用な治療手段となる可能性が考えられた。

(2) 脳組織中 PSD95 発現量

次に、このような行動学上の変化を起こす、脳の生物学的機序について解析を行った。始めに、前部帯状回および扁桃体領域における PSD95 発現量について、Western Blotting 法により測定した。神経シナプス後膜には、受容体やチャネル、細胞内シグナル伝達分子が集積した電子密度の高い postsynaptic density (PSD) 構造が形成されており、PSD95 はこの PSD を構成するタンパクの 1 種である。PSD95 発現量は神経シナプス発現量を反映するとされている。さらに、CORT 慢性投与モデルの脳内において PSD95 発現量が減少することが報告されている。

今回の結果では、難治うつ病モデルラット群において、コントロール群と比較し、前部帯状回および扁桃体領域で PSD95 の発現量の有意な減少を認めた。しかし、この難治うつモデルラットに神経幹細胞投与、あるいは神経幹細胞投与に加えて Ser 投与を行うことによって障害が有意に抑制された。また、前部帯状回については、Ser 単独投与によっても PSD95 発現量の増加は認められたが、その変化は細胞投与、あるいは細胞+薬剤投与群に比べて小さいものであった。

(3) 免疫組織化学的検索

次に、投与後の神経幹細胞の動態について、神経幹細胞をあらかじめ蛍光色素 (CFSE) 標識する方法で解析した。難治性うつ病モデル動物に対して神経幹細胞を投与し、生後 91 日齢で脳組織スライスを作製した。脳組織スライスでは、広い範囲に CFSE 標識細胞の移行・生存が観察された。また、脳内に移行した細胞の一部は、軸索形成と考えられる形態変化を示し、一部は GABAergic neuron のマーカーである GAD67 抗体陽性の細胞であった。さらに、GABA 系神経回路変化の特異的な変化の可能性を検討する目的で、GABAergic interneuron の 1 つである Parvalbumin (PV) 陽性細胞数の変化の検討を実施した。その結果、前部帯状回領域では、コントロール群に比べ、難治うつ病モデル群で、PV 陽性細胞数の有意な減少を認め、その減少は、細胞+薬物の併用処置群でのみ有意に回復していた。扁桃体領域については、モデル群における PV 陽性細胞の減少が他の領域に比べ、最も大きく、その変化は、Ser、細胞、細胞+Ser の各投与処置で、それぞれ有意に抑制された。海馬については、モデル群での PV 陽性細胞数の減少率は他の群よりも小さく、各投与群での影響は、扁桃体での変化と同様であった。

(4) 総合考察

今回、我々は、各モデル動物のうつ状態を評価する為に、FST を用いて行動解析を実施した。うつ病動物モデルとして、従来より知られている CORT 慢性投与モデルにおいては、我々の研究においても、うつ病様行動を示し、FST における無動時間は正常コントロールの無動時間よりも有意な延長を示し、抗うつ薬である Ser 投与によって、CORT 慢性投与モデルの無動時間は有意に短縮した。すなわち、CORT 慢性投与モデルでは、我々の実験系でも抗うつ薬による Ser によって有意な改善効果が示されたと考えられた。一方、今回我々が新規に確立した難治うつ病モデル、すなわち、胎生期アルコール曝露+CORT 慢性投与モデルにおいては、FST における無動時間が更に延長され、抗うつ薬投与のみでは長

くなった無動時間の変化は全く認められなかった。従って、胎生期アルコール曝露+CORT慢性投与モデルは、より重度な、難治性のうつ病のモデルになっているものと考えられた。さらに、胎生期アルコール曝露+CORT慢性投与モデルに対して、神経幹細胞投与、および神経幹細胞+Ser投与を実施したところ、FSTにおける無動時間が有意に短縮したが、このことは、神経幹細胞の経静脈的投与が、胎児期のストレスと思春期のストレスを組み合わせた難治性うつ病モデルに対して改善効果を有することを裏付けるものである。更に、神経幹細胞投与に加えてSer投与を併せて実施することにより、より高い改善効果を得ていることから、Serが何らかの作用機序により神経幹細胞投与による効果を高めていると考えられる。

結論

胎児期のストレス関連障害モデルに、生後の成長期に更にストレスを加えることによって難治性うつ病モデルを作製した。胎児期のストレスモデルとしては胎児期アルコール曝露モデルを選択し、生後成長期のストレスモデルとしては慢性CORT投与モデルを選択した。さらに難治性うつ病モデルに対して、神経幹細胞療法の効果を評価した。比較対象としては、抗うつ剤として広く使用されているSerを用いた。今回作製した難治性うつ病モデルに対して、薬物と神経幹細胞の併用療法は高い治療効果を示した。モデル動物の脳組織について検討したところ、GABA系ニューロンの1つであるPV陽性細胞の数は難治性うつ病モデルで有意に減少していたが、神経幹細胞、および薬物、細胞併用投与によりPV陽性細胞数は有意に回復した。ヒト死後脳の研究結果から、うつ病患者でGABA系ニューロンが障害されていることが知られているが、今回の我々の結果はこれを裏付けるものであるとともに、神経幹細胞投与が、GABA系ニューロンの回復を介して、抗うつ作用の一端を発揮している可能性が考えられた。加えて、神経幹細胞投与によりPSD-95量が回復していることから、神経シナプスの回復効果も併せて抗うつ作用に関与している可能性が考えられた。今回の研究結果は、難治性うつ病の新たな動物モデルを提案するものであり、かつ、薬物に加えて、神経幹細胞の投与を併用することが、難治性うつ病の新たな治療手段となりうることを示唆するものと考えられた。

論文審査の要旨及び担当者

平成 26 年 2 月 27 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2784 号	氏名	木川 昌康
論文審査 担当者	主査 齋藤 利和	副査	本望 修
	委員 藤宮 峯子	委員	堀尾 嘉幸

論文題名	Stem cell therapy as a candidate option for pharmacological treatment of refractory depression (幹細胞療法は、難治性うつ病の薬理的治療におけるオプションの候補となりうる)
------	--

結果の要旨

本研究は難治性うつ病モデル動物の作製と、難治性うつ病に対する経静脈的神経幹細胞投与の有効性を検討したものである。胎仔期アルコール曝露と生後の Corticosterone 慢性投与により、難治性うつ病モデル動物を作製しうることを示した。さらに、経静脈的に神経幹細胞を投与することにより、この難治性うつ病モデルで抑うつ状態の改善が見られるとともに、抗うつ薬 Sertraline 投与と神経幹細胞投与を併用することにより、改善効果がより高まることが示された。神経幹細胞投与、神経幹細胞と抗うつ剤の併用療法は、難治性うつ病モデルの脳諸領域における Parvalbumin 陽性細胞の減少を回復させた。また、脳内に移行した神経幹細胞の一部は GABA 作動性ニューロンに分化していることを示した。難治性うつ病モデルの扁桃核、帯状回では、後シナプスタンパクである PSD-95 の発現量が有意に減少した。また神経幹細胞投与、神経幹細胞と抗うつ剤の併用療法によりこの減少が改善していることを示した。これらの神経回路網変化が、本病態モデルに対する神経幹細胞療法の治療効果と関わる可能性が示された。難治性うつ病に対する神経幹細胞療法の有効性とその機序を論じた本論文は、学位授与に値するとの審査委員全員の評価を得た。