カルシトニン遺伝子関連ペプチドは 新たな抗うつ薬の治療ターゲットになり得るか？

橋川 成美, 小川 琢未, 坂本 祐介, 橋川 直也

要約：カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、様々な生理機能を有するペプチドである。強力な血管弛緩作用がその機能として第一にあげられる。CGRPは神経細胞で産生されて遊離されることから、神経系との関わりが考えられる。今回は行動異常とCGRPとの関連性について紹介を行う。我々はマウスに15日間ストレスを負荷することによって、海馬における *Cgrp* mRNA 量の減少が起こっていることを明らかにした。そこで、CGRP がうつ様行動に影響を及ぼすのではないかと仮説を立て、ストレスを負荷するマウスに CGRP (0.5 nmol) を脳室内投与した結果、うつ様行動の抑制が見られた。同様に海馬新生細胞数の減少の抑制、神経成長因子 (NGF) mRNA 量の増加が見られた。In vitro においても、マウス海馬 E14 培養細胞株に CGRP (100 nM) を添加すると、*Ngf* mRNA レベルの増加が見られた。そこで、ストレス負荷マウスに NGF 受容体阻害薬である K252a を投与し、行動を観察した結果、CGRP による抗うつ作用の減少が観察された。これらの結果は CGRP が NGF の増加を介して抗うつ作用を引き起こしている可能性を示唆している。

1. はじめに

眠れない、食欲がない、一日中気分が落ち込む、何をしても楽しむことができないなどの状態が続くとうつ病と診断される。原因として、脳の機能障害が起きている可能性があげられる。そのため、脳の働きに問題が生じ、普段なら乗り越えることができるストレスであっても、辛く感じ、乗り越えることができなくなり、物の見方が否定的になるなど悪循環が起こる。厚生労働省が3年ごとに全国の医療施設に対して行う「患者調査」によると、平成8年には約20万人だった

うつ患者総数は、平成20年には70万人を示し、約3.5倍に増加している(1)。「患者調査」は、医療機関に受診している患者数の統計データである。うつ病は発症しても、なかなか病院を訪れにくい疾病であることから、実際の患者数はさらに多いことが予想される。世界においては人口の3~5%の人がうつ病患者と言われている。しかしながら、実際に治療を受けている人はそのうちの25%程度とされており、うつ病患者の4人に3人は適切な治療を受けていないことが実情となっている。また、治療においても、抗うつ薬に反応しない治療抵抗性うつ病が存在し、薬物を投与して反応が見られるのはおよそ47%であり、寛解は33%という報告もある(2)。これらのことから、うつ病は患者数の増加に治療法が追いついていない疾患であり、新しい作用機序をもつ創薬の開発が期待される分野である。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP) はカルシトニンの遺伝子からスプライシングの違いによって作られる37個のアミノ酸からなるペプチドで、三叉神経節より放出され、強力な血管拡張作用があり(3)、脳内にも広く分布している。CGRP受容体は中枢の様々な場所、大脳皮質、尾状核、被殻、扁桃核、海馬、小脳と幅広く存在することが明らかとなっている(4)。以上のことからCGRPは神経異常による行動の変容にも関与している可能性が考えられる。そこで本総説では、現在までに得られたCGRPの行動に対する効果についてまとめ、特にCGRPによるうつ様行動への影響とその機構について最新の知見を含め概説する。

キーワード: CGRP, うつ様症状, マウス, BDNF, NGF

岡山理科大学大学院 理学研究科 (〒700-0005 岡山市北区理大町 1-1)

E-mail: hobara@dls.ous.ac.jp 原稿受領日: 2016年5月17日, 依頼原稿

Title: The relationship between calcitonin gene-related peptide and depression-like behavior

Author: Narumi Hashikawa-Hobara, Takumi Ogawa, Yusuke Sakamoto, Naoya Hashikawa

2. CGRP の様々な生理活性作用

CGRP はカプサイシン感受性の知覚神経より放出される神経ペプチドであり, 強い血管平滑筋弛緩作用や痛覚伝達作用を有する。血管においては, CGRP が $f\text{mol}$ の濃度で血管拡張作用を示すことから, 非常に強い血管拡張物質であることが知られている (5)。また, 心臓においては心房で陽性変力作用を示し, 正常ラットに CGRP を投与すると心拍数が著しく増加することが報告されている (6)。CGRP は神経系に多く存在し, 知覚神経の細胞体である脊髄後根神経節で生合成され, 中枢及び末端の両側性に作用する (7)。体組織が侵害刺激を受けることで, 知覚神経の軸索末端から CGRP がサブスタンス P と共に遊離される。その結果, 末梢血管を拡張し, 血管透過性亢進が増加する。脊髄後根神経節より中枢側へ運搬される CGRP は脊髄後角で多く発現が見られ, 侵害受容伝達に関与していると考えられている。

脳室内に CGRP を投与することによって, 動物の行動に影響を及ぼすことが報告されている。ラット側脳室に CGRP を投与すると, 恐怖様行動を起こすことから, 記憶に関与する中枢シナプスの神経伝達物質として CGRP が関与している可能性が考えられる (8)。さらに, 嫌悪, 不安, 恐怖などの深い情動形成に関与している分界条床核に CGRP を投与すると不安様行動が起こることも報告されている (9)。また, CGRP をラット側脳室に投与すると受動回避学習試験において, 用量依存的に記憶力の増加が見られている (10)。これらのことから, CGRP は学習過程や記憶形成に影響を及ぼす可能性も考えられる。さらに, マウスに CGRP を脳室内投与することにより, 強制水泳試験において不動時間の短縮を示し, CGRP 受容体拮抗薬を前投与することで, 不動時間の短縮が抑制されたという報告がある (11)。しかし, うつ様症状モデルマウスに CGRP を投与し, 行動を観察した報告はまだ数が少ない。

3. うつ病モデル動物

うつ様症状を示すモデルマウスとして, よく使用されるモデルの一つに, 予測不可能な様々な軽微ストレスを長期間与える慢性緩和ストレスモデル (chronic mild stress) がある (12)。運動量の低下, 強制水泳試験における不動時間の増加, スクロース摂取量の減少といった, うつ病症状に関連した行動が観察される。さらに, ストレス負荷後一ヵ月程度うつ様行動の持続が観察されること, 抗うつ薬を長期間投与することによって寛解するなど, ヒトの臨床症状に近い状態が

再現される。しかしながらこの方法は, うつ様症状を呈するまでに一ヵ月以上かかり, 様々なストレスを用意する必要があるため, 実験者への負担が大きい。実験計画を立てる上では, なるべく短期間でうつ様症状を示すようなモデルが望ましいのではないかと考えられる。

比較的短期間でうつ様症状を示すモデルとして, 攻撃的な動物と同じケージで飼育する社会的敗北ストレスモデル (social defeat stress model) がより臨床に近いストレスモデルとして知られている。特に心的外傷後ストレス障害のうつ様状態に相当すると考えられている (13)。これは, 臨床現場でよく使用されているフルオキセチン (日本では未認可) やイミプラミンの急性投与ではなく, 慢性投与をしなければ行動が改善しないためである。

さらに短期間で簡便な方法として, 拘束ストレス方法があげられる。8時間の拘束ストレスを14日間続けると, 不安とうつ様症状がでるが, 2時間の拘束ストレスを14日間続けただけでは, わずかにしかうつ様症状が見られないという報告がある (14)。しかしながら一方では, 2時間の拘束ストレスを10日続けると不安とうつ様症状を示す報告もある (15, 16)。これらの報告から, 拘束ストレス法は実験者によって得られるデータにばらつきが見られることが予測される。また, ストレス負荷後の行動異常の持続性についてはまだ解明されていない。

そこで我々は拘束ストレスと水ストレスを同時に与える15日間ストレス負荷方法を行った (図1A)。このモデルにおいては, ICRマウス, C57BL6/Jマウスいずれにおいてもうつ様行動を示した (17, 18)。15日間のストレス負荷後に強制水泳試験における不動時間の延長, スクロース負荷試験による嗜好性の低下, 血清コルチコステロン濃度の減少, 脳海馬における歯状回の神経細胞増殖能の低下, さらに神経成長因子の減少が確認された (17, 18)。マウスの体重はストレス負荷期間中においてコントロール群と比べて有意な減少を示したが, ストレスが終了するとコントロールと同程度まで体重の回復が見られた (図1B)。強制水泳試験による不動時間はストレス負荷途中の7日目より有意な延長を示し, 15日間のストレス負荷終了後もさらに2週間後においても, うつ様行動を示した (図1C)。これは, 脳海馬における歯状回の神経細胞増殖能の変化と負の相関を示している。ストレス負荷途中の7日目から海馬神経細胞増殖能は軽度ではあるものの, 有意な低下が見られ, 15日間のストレス負荷後に最も細胞増殖が減弱し, 2週間後に徐々にコントロールレ

図1 15日間のストレス負荷による経時的変化

A: ストレス負荷方法を図で表したもの。50 mL チューブにマウスをつめ、胸の辺りまで 28°C の水が浸かるようにして、3~5 時間毎日ストレスを 15 日間かけた。B: 体重の変化。C: 強制水泳試験による不動時間の変化。D: 海馬新生細胞数の変化。E: 海馬 *Bdnf* mRNA 量の変化。F: 海馬 *Ngf* mRNA 量の変化。(文献 18 より改変)

ベルにまで回復が見られた (図 1D)。また、海馬における脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor: BDNF) はストレス負荷途中の 7 日目においてはコントロール群と比べて有意に減弱し、ストレス負荷終了後、さらに 2 週間目までは逆に *Bdnf* mRNA の増加がみられた (図 1E)。一方、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) *Ngf* mRNA はストレス負荷途中の 7 日目においては変化が見られなかったが、負荷終了後に有意に減少し、その 1 週間後は有意な増加を 2 週間示した後、コントロールレベルにまで戻った (図 1F)。

BDNF はうつ病との関係性が多く報告されている。ラットの海馬に BDNF を投与すると、強制水泳試験において抗うつ作用を示す (19)。慢性的な抗うつ薬の投与は cAMP と神経栄養因子のシグナル伝達系を促進させる。さらに BDNF とその受容体である *trkB* の活性化が海馬において CREB のリン酸化を増加させる (20)。臨床研究の報告においては、うつ病患者の BDNF の血清値は健常者と比べると有意に抑制が見られた (21)。また、血漿 BDNF レベルは、うつ病気質を示す損害回避 (harm avoidance) や自発的スコア (self-directedness score) と関係があることが報告されている (22)。一方で、ストレスは海馬での *Bdnf* mRNA レベルを減少させるが、視床下部と脳下垂体においては増加させるという報告もあり (23, 24)、神経栄養因子の発現調節

はうつ病の病態と治療によって変化する可能性も考えられる。

4. CGRP とうつ様行動の関係性

前述したように、マウスに CGRP の脳室内投与を行うと、強制水泳試験における不動時間の減少が AKR マウス, C57BL/6 マウスで観察された (11)。うつ様モデルマウスにおける検討では、Balb/cJ マウスと C57BL/6J マウスとの異系交雑マウスにおいて、CGRP の脳室内投与が強制水泳試験の不動時間を延長させ、CGRP 受容体拮抗薬である CGRP8-37 のみの投与では不動時間が減少するという報告がある (25)。一方、拘束ストレスと水ストレスを毎日 15 日間同時に与えるモデルにおいては、ストレス負荷終了後に、CGRP を脳室内投与しても変化が見られなかったが、CGRP をストレス負荷開始前に投与することで強制水泳試験の不動時間が有意に抑制された (図 2A, B)。この作用は CGRP と CGRP8-37 を同時に投与することで阻害されたことから、CGRP 受容体を介しているものと考えられる (図 2B)。何故 CGRP をストレス負荷前に投与することがうつ様行動の改善につながったのか、詳細な作用は未だ明らかではない。CGRP をストレス負荷前に投与し、15 日間ストレス負荷を行ったマウスの海馬において、*Bdnf* mRNA 量は変化が見られなかった

図2 ストレス負荷後、ストレス負荷前における CGRP 投与による不動時間の変化

A: 15 日間のストレス負荷後に CGRP (0.5 nmol) を脳室内投与し、24 時間後の強制水泳試験による不動時間。B: CGRP あるいは CGRP + CGRP8-37 (0.5 nmol ずつを混ぜて同時に投与) を脳室内投与し、15 日間のストレス負荷後における強制水泳試験の不動時間。(文献 26 より改変)

が、*Ngf* mRNA 量の増加が見られた(26)。さらに、マウス海馬 E14 培養細胞株においても CGRP 100 nM を添加することで *Bdnf* mRNA 量は変化が見られなかったが *Ngf* mRNA 量の増加が見られた(26)。一方、NGF の阻害薬である K252a をマウスに腹腔内投与することにより、CGRP 脳室内投与による抗うつ作用が抑制されたことから、CGRP が NGF を増加させることで、行動の改善と海馬神経細胞の増殖を引き起こしたと示唆される(26)。しかしながら、なぜ一回投与の CGRP が 15 日後もその効果を示しているのかは不明である。一つの可能性として、CGRP は摘出ラットの心臓標本やマウス脳において保護作用を示すことが報告されている(27,28) ことから、CGRP の前投与は ischemic preconditioning (短時間の虚血と再灌流を数回繰り返すことにより、心筋細胞の保護作用を示す現象) のような働きをして、脳細胞を保護しているのではないかと考えられる。また、CGRP が直接的に細胞保護効果を示すことで知られている heat shock protein 70 を増加させ、これが細胞保護作用を示している可能性も考えられる(29)。

5. CGRP の抗うつ薬としての可能性

CGRP を全身投与した場合、血圧が低下し、それを補おうとして心拍数が増加する。さらに脳には血液脳関門が存在し、分子量 37 のアミノ酸である CGRP は脳に到達する前に大部分が分解されてしまう可能性も考えられる。いずれにせよ、血圧の低下は医薬品としての可能性を大きく制限している。しかしながら、昨

今では新たなドラッグデリバリングシステムが開発されている。東京理科大学の岡らは経鼻投与をすることで脳室内投与と同様にペプチドを脳へ移行させる新たな方法を現在開発中である。この系が確立し、広く普及するようになれば、脳へ低分子ペプチドを局所投与することができるようになる。さらなる検討課題が残されているものの、臨床においても CGRP の抗うつ薬としての応用が実現できるのではないかとと思われる。

6. おわりに

CGRP が 1982 年に Amara によりクローニングされ(30)、三十数年経ち、多くの研究がなされ、情報も蓄積された。その生理作用は循環器系から免疫系、精神疾患系まで幅広く多彩であり、研究者の興味を魅了してやまない。この神経ペプチドがどのような反応を起こし、制御されているのかという包括的な解析を今後とも筆者等は続けて行く予定である。

謝辞：本研究の一部は内藤記念科学振興財団の助成を受けて行われたものである。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 患者調査(厚生労働省)。
- 2) Trivedi MH, et al. Am J Psychiatry. 2006;163:28-40.
- 3) McCulloch J, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83:5731-5735.
- 4) Skofitsch G, et al. Peptides. 1985;6:721-745.
- 5) Brain SD, et al. Nature. 1985;313:54-56.
- 6) Lappe RW, et al. Regul Pept. 1987;19:307-312.

- 7) Gibson SJ, et al. *J Neurosci*. 1984;4:3101-3111.
- 8) Poore LH, et al. *Neurobiol Learn Mem*. 1996;66:241-245.
- 9) Sink KS, et al. *J Neurosci*. 2011;31:1802-1810.
- 10) Kovács A, et al. *Neuropeptide*. 1992;23:51-54.
- 11) Schorscher-Petcu A, et al. *J Mol Neurosci*. 2009;39:125-136.
- 12) Willner P, et al. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992;16:525-534.
- 13) Berton O, et al. *Science*. 2006;311:864-868.
- 14) Kim KS, et al. *J Neurosci Res*. 2006;83:497-507.
- 15) Holmes A, et al. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33:773-783.
- 16) Ihne JL, et al. *Neuropharmacology*. 2012;6:464-473.
- 17) Sakamoto Y, et al. *Yakugaku Zasshi*. 2015;135:151-158.
- 18) Hashikawa N, et al. *Cell Mol Neurobiol*. 2015;35:807-817.
- 19) Shirayama Y, et al. *J Neurosci*. 2002;22:3251-3261.
- 20) D'Sa C, et al. *Bipolar Disord*. 2002;4:183-194.
- 21) Hashimoto K, et al. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004;45:104-114.
- 22) Yasui-Furukori N, et al. *Psychiatry Res*. 2013;210:220-223.
- 23) Smith MA, et al. *Endocrinology*. 1995;136:3743-3750.
- 24) Smith MA, et al. *J Neurosci*. 1995;15:1768-1777.
- 25) Jiao J, et al. *Mol Psychiatry*. 2013;18:1273-1280.
- 26) Hashikawa-Hobara N, et al. *Sci Rep*. 2015;5:12559.
- 27) Källner G, et al. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32:500-504.
- 28) Zhang JY, et al. *Eur J Pharmacol*. 2011;671:61-69.
- 29) Wang W, et al. *J Biol Chem*. 2005;280:20325-20330.
- 30) Amara SG, et al. *Nature*. 1982;298:240-244.