

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究戦略推進プログラム  
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences

研究開発課題名： (日本語) うつ症状の神経基盤に基づく診断・治療法の開発  
－皮質・側坐核・中脳系への着目  
(英語) Development of diagnostic and therapeutic methods for depressive symptoms based on mesocorticolimbic system

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人千葉大学社会精神保健教育研究センター 教授 橋本 謙二  
所属 役職 氏名： (英語) Chiba University Center for Forensic Mental Health,  
Professor Kenji Hashimoto

実施期間： 平成 28 年 05 月 20 日 ～ 平成 29 年 03 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

うつ症状は、様々な精神疾患患者に認められるが、現在のところこれらの疾患を層別化するバイオマーカーは無い。今回、うつ症状を呈する精神疾患患者の MRI 画像、血液などの生体試料、臨床データをもとに、うつ症状の層別化のためのバイオマーカーの開発を目的とする。NMDA 受容体拮抗薬ケタミンの即効性抗うつ作用と長期持続作用は、うつ病患者だけでなく実験動物でも確認されているが、その作用機序は未だ不明である。橋本謙二教授 (千葉大学社会精神保健教育研究センター) らは、ケタミンの抗うつ作用には NMDA 受容体以外の機構も関わり、むしろケタミンの副作用に NMDA 受容体が関わることを報告してきた。平成 28 年 5 月に Nature 誌に報告された(R)-ケタミンの最終代謝物(2R,6R)-hydroxynorketamine (HNK)は、(R)-ケタミンより抗うつ作用が弱い事を報告した。さらに、(R)-ケタミンの抗うつ作用には、mTOR 系は関係していないことを見出した。現在、(R)-ケタミンの企業導出活動を実施している。

小池進介准教授 (東京大学大学院総合文化研究科) らは、うつ症状を呈する被験者について、MRI 計測に加え、採血、神経心理検査、近赤外線スペクトロスコピィを計測し、1.5 年後、3 年後まで追跡フォローするプロトコルを確立し、新規に 76 名の MRI 計測を行った。既存の大うつ病性障害 (MDD) 患者

29名、統合失調症（SCZ）患者17名、および健常対照（HC）者61名の安静時MRIデータについて、予備解析を行った。河西春朗教授（東京大学大学院医学系研究科）らは、頭部固定下のマウスにおいて条件づけ学習課題中の側坐核に投射するドパミン神経活動を記録する実験系の構築に成功し、薬理実験の併用のための準備も進んだ。

福田正人教授（群馬大学大学院医学系研究科）らは、うつ症状の診断に有用なバイオマーカーを開発するために、脳磁図MEGの測定プロトコール、アーチファクト除去のアルゴリズム、global connectivity解析のアルゴリズムを検討し確立した。うつ症状治療の新規技術の有用性を評価する指標を開発するために、うつ病マウスモデルにおける白血球と内側前頭前皮質の遺伝子発現パターンを比較し、卵巣摘除では類似した遺伝子発現パターンの変化をもたらすことを明らかにした。

橋本均教授（大阪大学大学院薬学研究科）らは、全脳活動イメージングに用いるArc-dVenusマウスに、コルチコステロンの慢性投与あるいは社会的隔離飼育を行い、うつ様モデルマウスを作製した。両モデル動物において、(R)-ケタミンは(S)-ケタミンに比べ、強力かつ持続的な抗うつ作用を示し、これまでの知見を支持する結果が得られた。全脳活動イメージング解析から、強制水泳ストレスにより複数の皮質領域、扁桃核基底外側核などにおいて神経細胞の活性化が認められ、このマウスでの解析の準備が整った。岩本和也教授（熊本大学大学院生命科学研究科）らは、うつ病動物モデルである社会敗北ストレスモデルにSまたはRケタミンを投与したマウス個体から、前頭葉、側坐核、海馬の各脳領域の提供を受けゲノムDNAの抽出を行った。また、候補遺伝子DNAメチル化解析のターゲットであるBDNF遺伝子について微量DNAを用いたDNAメチル化解析実験系の確立を行った。また、マウスゲノムDNAにおけるglobal DNAメチル化測定系の確立を行った。また、既に入手済みの気分障害患者前頭葉神経細胞におけるDNAメチル化解析データの再解析により、神経細胞においてモーター蛋白関連遺伝子やグルタミン酸受容体結合蛋白群のメチル化異常が集積していると共に低メチル化状態にあることを見出した。

## 英文

Depressive symptoms are shown in patients with a number of psychiatric disorders. However, there are no diagnostic biomarkers for these psychiatric disorders. The purpose of this project is to develop the diagnostic biomarkers using MRI data, biological samples, and clinical data in the patients with depressive symptoms. Furthermore, although the rapid-acting and sustained antidepressant actions of the NMDAR antagonist ketamine are detected in the depressed patients and rodents with depression-like phenotype, precise molecular mechanisms underlying its action are known. Professor Kenji Hashimoto (Chiba University) pointed that other mechanism except the NMDAR inhibition may play a role in the antidepressant action of ketamine. In the Nature May 2016, it was reported that (2R,6R)-hydroxynorketamine (HNK), a metabolite of (R)-ketamine, was essential for the antidepressant actions of ketamine. However, we reported that (R)-ketamine has greater and longer-lasting antidepressant effects than (2R,6R)-HNK. In addition, we reported that mTOR does not play a role in the antidepressant actions of (R)-ketamine. Finally, we have been negotiating with some companies for license-out of (R)-ketamine project.

Associate Professor Shinsuke Koike (University of Tokyo) developed the measurement protocol of the measurement using MRI, blood sampling, cognitive tests, and near-infrared spectroscopy with clinical follow-ups of depressed patients at 1.5 and 3 years in the University of Tokyo. In the 2016 fiscal year, we measured for 76 patients. We also conducted a preliminary analysis using the existing MRI data for 29 patients with major depressive disorder, 17 patients with schizophrenia, and 61 healthy control participants. Professor Haruo Kasai's team has developed a fiber

photometry system to measure dopaminergic activity in the nucleus accumbens of a head-fixed mouse performing Pavlovian conditioning. The system is also applicable to pharmacological experiments.

As the first step to establish clinically available biomarker for depressive symptoms, Professor Masato Fukuda (Gunma University) developed the measurement protocol, artifact rejection algorithm, and global connectivity analysis algorithm of magnetoencephalography for the purpose of diagnoses. Furthermore, they examined the similarities and differences of gene expressions in blood cells and medial prefrontal cortex in ovary-excised mouse model for the purpose of treatment monitoring.

Professor Hitoshi Hashimoto (Osaka University) found that either chronic administration of corticosterone or social isolation-rearing increased the immobility time of Arc-dVenus reporter mice in the forced swim test, providing reliable mouse models of depression. In these models, (R)-ketamine showed a greater potency and longer-lasting antidepressant effect than (S)-ketamine, supporting our previous results. Whole-brain imaging analysis revealed that forced swim stress induced neuronal activation in several brain regions, including various cortical areas and the basolateral amygdala, in mice. Thus, the system is applicable to further investigate the mechanisms underlying the effects of ketamine.

Professor Kazuya Iwamoto (Kumamoto University) extracted genomic DNA from the frontal cortex, nucleus accumbens, and hippocampus derived from depressive mice that received either (S)- or (R)-ketamine. Experimental conditions for DNA methylation analysis of BDNF gene in a small amount of genomic DNA and for global DNA methylation assays using mice genomic DNA were established. Reanalysis of methylome data of neurons of frontal cortex of patients with bipolar disorder revealed that altered DNA methylations in motor- and glutamate receptor-related genes and global hypomethylation in neurons of patients.

### Ⅲ. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 31 件）

1. Yao W, Zhang JC, Ishima T, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, Han M, Wu J, Sukanuma H, Ushida Y, Yamamoto M, Hashimoto K. Role of Keap1-Nrf2 in depression and dietary intake of glucoraphanin confers stress resilience in mice. *Sci. Rep.* 2016, 6, 30659
2. Hashimoto K. Soluble epoxide hydrolase: a new therapeutic target for depression. *Expert Opin. Ther. Targets* 2016, 20, 1149-1151.
3. Yang B, Zhang JC, Han M., Yao W, Yang C, Ren Q, Ma M, Chen QX, Hashimoto K. Comparison of R-ketamine and rapastinel antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology* 2016, 233, 3647-3657.
4. Hashimoto K. Detrimental side effects of repeated ketamine infusions in the brain. *Am. J. Psychiatry* 2016, 173, 1044-1045.
5. Zhang JC, Yao W, Ren Q, Yang C, Dong C, Ma M, Wu J, Hashimoto K. Depression-like phenotype by deletion of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor: Role of BDNF-TrkB signaling in nucleus accumbens. *Sci. Rep.* 2016, 6, 36705

6. Hashimoto K. Ketamine's antidepressant action: beyond NMDA receptor inhibition. *Expert Opin. Ther. Targets* 2016, 20, 1389-1392.
7. Han M, Zhang JC, Yao W, Yang C, Ishima T, Re Q, Ma M, Dong C, Huang XF, Hashimoto K. Intake of 7,8-dihydroxyflavone during juvenile and adolescent stages prevents onset of psychosis at adult offspring after maternal immune activation. *Sci. Rep.* 2016, 6, 36087.
8. Yang B, Ren Q, Ma M, Chen QX, Hashimoto K. Antidepressant effects of (+)-MK-801 and (-)-MK-801 in the social defeat stress model. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2016, 19, pyw080.
9. Zhu W, Ding Z, Zhang Y, Shi J, Hashimoto K., Lu L. Risks associated with the misuse of ketamine as a rapid-acting antidepressant. *Neurosci. Bull.* 2016, 32, 557-564.
10. Yang B, Yang C, Ren Q, Zhang JC, Chen QX, Shirayama Y, Hashimoto K. Regional differences in the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) pro-peptide, its precursors preproBDNF and proBDNF in the brain confer stress resilience. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2016, 266, 765-769.
11. Hashimoto K. Chapter 4: Rapid antidepressant activity of ketamine beyond NMDA receptor. In: *The NMDA Receptors*. Edited by Hashimoto K. Springer Publishers, 2017, pp. 69-81.
12. Han M, Zhang JC, Hashimoto K. Increased levels of C1q in the prefrontal cortex of adult offspring after maternal immune activation: Prevention by 7,8-dihydroxyflavone. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 2017, 15, 64-67.
13. Ma M, Ren Q, Yang C, Zhang JC, Yao, W, Dong C, Ohgi Y, Futamura T, Hashimoto K. Antidepressant effects of combination of brexpiprazole and fluoxetine on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Psychopharmacology* 2017, 234, 525-533.
14. Shirayama Y, Hashimoto K. Effects of a single bilateral infusion of R-ketamine in the rat brain regions of a learned helplessness model of depression. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2017, 267, 177-182.
15. Yang C, Fujita Y, Ren Q, Ma M, Dong C, Hashimoto K. *Bifidobacterium* in the gut microbiota confer resilience to chronic social defeat stress in mice. *Sci. Rep.* 2017, 7, 45942.
16. Yang B, Ren Q, Zhang JC, Chen QX, Hashimoto K. Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide, and their precursor proBDNF in the brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain-liver axis. *Transl. Psychiatry* 2017, 7, e1128.
17. Dong C, Zhang JC, Yao W, Ren Q, Ma M, Yang C, Chaki S, Hashimoto K: Rapid and sustained antidepressant actions of mGlu2/3 receptor antagonist MGS0039 in social defeat stress model: Comparison with ketamine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2017, 20, 228-236.
18. Zhang JC, Yao W, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, Hashimoto K. Blockade of interleukin-6 receptor in the periphery promotes rapid and sustained antidepressant actions: a possible role of gut-microbiota-brain axis. *Transl. Psychiatry* 2017, 7, e1138.
19. Yang C, Qu Y, Abe M, Nozawa D, Chaki S, Hashimoto K: (R)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than its metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine. *Biol. Psychiatry* 2017, in press.
20. Hashimoto K., Ishima T, Sato Y, Bruno D, Nierenberg J, Marmar CR, Zetterberg H, Blonnow K, Pomara N. Increased levels of ascorbic acid in the cerebrospinal fluid of cognitively intact elderly patients with major depression: a preliminary study. *Sci. Rep.* 2017, in press.

21. Qu Y, Yang C, Ren Q, Ma M, Dong C, Hashimoto K. Regional differences in dendritic spine density confer resilience to chronic social defeat stress. *Acta. Neuropsychiatr.* 2017, in press.
22. Xie ZM, Wang XM, Xu N, Wang J, Pan W, Tang ZQ, Hashimoto K, Yang JJ. Alterations in the inflammatory cytokines and brain-derived neurotrophic factor contribute to depression-like phenotype after spared nerve injury: improvement by ketamine. *Sci. Rep.* 2017, in press.
23. Yang C, Ren Q, Qu Y, Zhang JC, Ma M, Dong C, Hashimoto K. mTOR-independent antidepressant effects of (R)-ketamine in a social defeat stress. *Biol. Psychiatry* 2017, in press.
24. 橋本謙二. 即効性抗うつ薬ケタミンの最新トピックス. *日本神経精神薬理学雑誌* in press.
25. Miyata S, Kurachi M, Sakurai N, Yanagawa Y, Ishizaki Y, Mikuni M, Fukuda M. Gene expression alterations in the medial prefrontal cortex and blood cells in a mouse model of depression during menopause. *Heliyon* 2016, 2, e00222.
26. Seiriki K, Kasai A, Kuwaki T, Nakazawa T, Yamaguchi S, Hashimoto H. Critical involvement of the orbitofrontal cortex in hyperlocomotion induced by NMDA receptor blockade in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2016, 480, 558-63.
27. Kasai A, Kakahara S, Miura H, Okada R, Hayata-Takano A, Hazama K, Niu M, Shintani N, Nakazawa T, Hashimoto H. Double *in situ* hybridization for microRNAs and mRNAs in brain tissues. *Front. Mol. Neurosci.* 2016, 9, 126.
28. Nakata M, Zhang B, Yang Y, Okada T, Shintani N, Hashimoto H, Yada T. High-fat diet augments VPAC1 receptor-mediated PACAP action on the liver, inducing LAR expression and insulin resistance. *J. Diabetes Res.* 2016, 2016, 9321395.
29. Tanaka T, Ago Y, Umehara C, Imoto E, Hasebe S, Hashimoto H, Takuma K, Matsuda T. Role of prefrontal serotonergic and dopaminergic systems in encounter-induced hyperactivity in methamphetamine-sensitized mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2017, 20, 410-421.
30. Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophr. Res.* 2017, 181, 75-82.
31. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Watanabe S, Umehara H, Shimodera S, Nakazawa T, Kikuchi M, Nakaya A, Hashimoto H, Imoto I, Hashimoto R, Ohmori T. Effect of clozapine on DNA methylation in peripheral leukocytes from patients with treatment-resistant schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 632.
32. Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue K, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H. High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates. *Neuron* 2017, in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Metabolomic analysis of CSF from patients with bipolar disorder. 口頭、Hashimoto K, In Symposium “CSF biological markers in psychiatric disorders”. 16<sup>th</sup> Conference of the International Society for Monitoring Molecules in Neuroscience, Gothenberg, Sweden. May 29 - June 2, 2016. 国外
2. R-Ketamine: A rapid-onset and sustained antidepressant without risk of brain toxicity. 口頭、Hashimoto K, The CIBRIS Annual Meeting 2016, Gothenberg, Sweden. June 2 - June 3, 2016. 国外
3. Key role of soluble epoxide hydrolase in depression and the novel rapid-onset antidepressant R-ketamine. 口頭、Hashimoto K, Peking University School of Life Sciences, Beijing, China. June 16, 2016. 国外
4. Key role of soluble epoxide hydrolase in depression and the novel rapid-onset antidepressant R-ketamine. 口頭、Hashimoto K, Hubei University School of Medicine, Hubei, Chiba. June 17, 2016. 国外
5. 脳内線条体のドパミンD2/3受容体に対するエスケタミンおよびR-ケタミンの効果：無麻酔サルを用いたPET研究. ポスター発表. 橋本謙二、垣内岳春、大庭弘之、西山新吾、塚田秀夫.第46回日本神経精神薬理学会. 平成28年7月2日. 韓国ソウル市. 国外.
6. Reduction of dopamine D<sub>2/3</sub> receptor binding in the striatum after a single administration of esketamine, but not R-ketamine: A PET study in conscious monkeys. ポスター発表. Hashimoto K, Kakiuchi T, Ohba H, Nishiyama S, Tsukada H. The 30<sup>th</sup> CINP World Congress of Neuropsychopharmacology. July 3-5, 2016. Seoul, South Korea. 国外
7. R-ketamine as a rapid-onset antidepressant. 口頭、Hashimoto K, 第39回日本神経科学大会. 平成28年7月21日. 国内.
8. Additional evidence for sustained antidepressant effects of R-ketamine in rodent models: Comparison with S-ketamine. ポスター発表. Chaki S, Fukumoto K, Toki H, Yamaguchi J, Hashimoto K, Iijima M. The 55th Annual Meeting of the ACNP, Hollywood, FL, USA. December 4 - 8, 2016. 国外
9. Effects of a single bilateral infusion of R-ketamine in the rat brain regions of a learned helplessness model of depression. ポスター発表. Shirayama Y, Hashimoto K. The 55th Annual Meeting of the ACNP, Hollywood, FL, USA. December 4 - 8, 2016. 国外
10. Sulforaphane: A prophylactic natural antioxidant for psychosis. 口頭、Hashimoto K, In the Panel “Oxidative stress: Linking Cellular and System Pathophysiology Towards Clinical Trials in Schizophrenia”. The 55th Annual Meeting of the ACNP, Hollywood, FL, USA. December 4 - 8, 2016. 国外
11. (R)-Ketamine as a rapid onset and long-lasting antidepressant: Comparison with (S)-ketamine and ketamine metabolites. 口頭、Hashimoto K, In the Panel “Antidepressant Ketamine: Racemic, Enantiometric and Active Metabolites”. The 55th Annual Meeting of the ACNP, Hollywood, FL, USA. December 4 - 8, 2016. 国外
12. ドラッグリポジショニング 古い麻酔薬を新規抗うつ薬に！口頭、橋本謙二. 第90回日本薬理学会年会ランチョンセミナー. 長崎市. 2017年3月16日. 国内
13. Multimodal imaging focused on meso-cortico-limbic system and its specificity for psychiatric diseases. ポスター発表、Koike S, Morita K, Sakakibara E, Okada N, Kasai K. IEPA 10 Early Intervention in Mental Health Conference. 2016年10月21日, Milano, Italy. 国外.

14. 中脳辺縁系・中脳皮質系に着目したマルチモダリティ脳画像解析と疾患特異性. ポスター発表, 小池進介, 森田健太郎, 榊原英輔, 岡田直大, 笠井清登. 第 38 回日本生物学的精神医学会. 2016 年 9 月 11 日, 福岡. 国内.
15. 1,000 計測以上の縦断脳画像データの解析技法開発と臨床応用. 口頭, 小池進介. 第 38 回日本生物学的精神医学会. 2016 年 9 月 10 日, 福岡. 国内.
16. 縦断計測・大規模計測による NIRS 鑑別診断補助法の改良. 口頭, 小池進介. シンポジウム, 日本光脳機能イメージング学会 第 19 回学術集会. 2016 年 7 月 23 日, 東京. 国内.
17. モノアミン作用の機能的理解を起点とした基礎から臨床研究への発展の道筋, 口頭, 柳下 祥, 第 38 回日本生物学的精神医学会. 2016 年 9 月 11 日, 福岡. 国内.
18. Rapid regulations of spine plasticity by dopamine in the D1 and D2 projection neurons in the nucleus accumbens. 口頭, Haruo Kasai, Sho Yagishita, Yusuke Iino, Yosuke Nakazato, Yoshitomo Maeda. Cold Spring Harbor Asia Conference, 2016 年 5 月 19 日, Suzhou, China. 国外
19. Plasticity and fluctuations of dendritic spines in mice models of autism and schizophrenia. 口頭, Haruo Kasai. Symposium in JNS meeting 2016, 2016 年 7 月 20 日, 横浜. 国内
20. Dendritic spines shaping memory and behaviors, 口頭, Haruo Kasai. Special Lecture, Society for Neuroscience, 2016 年 11 月 13 日, San Diego, USA, 国外.
21. Spine synapses shaping memory and behavior, Lecture, 口頭, Haruo Kasai. Nanyang Technical University, 2016 年 12 月 8 日, Singapore. 国外
22. 白血球の遺伝子発現情報を利用した新規うつ様状態評価系の開発, 口頭, 宮田茂雄, 三國雅彦, 柳川右千夫, 福田正人, 第 134 回日本薬理学会関東部会, 2016/7/9, 国内.
23. Resting state large scale network analysis of MEG data using self-organizing map, ポスター発表, Takei Y, Kosuda A, Tagawa M, Kasagi M, Fukuda M, Seki Y, GUMI & AMDE 2016, Gunma, 2016/12/9, 国内.
24. The relationship between neurotransmitters and task-induced oscillatory modulations during working memory task, ポスター発表, Takei Y, Fujihara K, Tagawa M, Kasagi M, Takahashi Y, Katou Y, Motegi T, Suzuki Y, Sakurai N, Yamaguchi M, Hironaga N, Tobimatsu S, Narita K, Fukuda M, The 20th International Conference on Biomagnetism, Seoul, 2016/10/4, 国外.
25. (口頭) 岩本和也, エピゲノム解析による精神疾患の新規病因・病態解明、第 35 回日本認知症学会学術集会シンポジウム「エピゲノミクスと神経・精神疾患」(2016 年 12 月 1-3 日、東京国際フォーラム、東京、国内)
26. 気分安定薬・抗精神病薬がエピゲノム状態に与える影響について、口頭, 岩本和也, 第 26 回日本臨床精神神経薬理学会シンポジウム「精神疾患薬物治療に関する Epigenetic Surrogate Marker の探索」、2016 年 11 月 17-18 日、ホルトホール大分、大分、国内
27. 精神疾患患者神経細胞におけるゲノム・エピゲノム変異の探索、口頭, 岩本和也, 第 46 回日本神経精神薬理学会、2016 年 7 月 2 日、ソウル、韓国、国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし