

東北医科薬科大学  
審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	タカハシ コウヘイ 高橋 浩平（宮城県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博薬科第 16 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	Memantine の抗うつ作用とその作用機序解明に関する研究
論文審査委員	主査 教授 溝口 広一
	副査 教授 丹野 孝一
	副査 教授 遠藤 泰之

Memantine の抗うつ作用と  
その作用機序解明に関する研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

高橋 浩平



## 目次

1. 緒言	1
2. 実験材料および方法	5
3. 実験結果	
3.1. OBX マウスの情動行動に対する Memantine 投与の影響	16
3.2. OBX マウスのうつ様行動に対する Memantine 投与の影響	17
3.3. Memantine 慢性投与による海馬内モノアミン神経系への影響	19
3.4. Memantine 慢性投与による海馬内モノアミン並びにその代謝物、代謝回転の変化	21
3.5. Memantine 慢性投与による海馬内 p-PKA、p-DARPP-32、p-ERK1/2、p-CREB 並びに BDNF レベルの変化	23
3.6. Memantine 慢性投与による海馬歯状回における細胞増殖の変化	24
3.7. Memantine 慢性投与による海馬 DCX 並びに NeuN レベルの変化	25
3.8. Memantine 慢性投与による海馬グリア細胞への影響	26
3.9. Memantine 慢性投与による海馬における炎症性サイトカインの変化	28
3.10. Memantine 慢性投与による海馬アポトーシス関連タンパクの変化	29
4. 考察	30
謝辞	36
引用文献	37



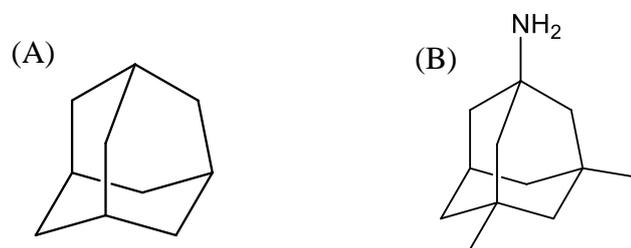
## 緒言

厚生労働省による 2016 年時点での有病率の統計調査によれば、うつ病は生涯において日本の人口の 4-7%に発症すると推定されている。現在、うつ病が原因と考えられる自殺が社会問題となっており、うつ病の予防・治療に大きな関心が寄せられている。現在のうつ病治療薬は主にモノアミン仮説に基づいた、選択的 serotonin (5-HT) 再取り込み阻害薬 (SSRI) や 5-HT・noradrenaline (NA<sub>d</sub>) 再取り込み阻害薬 (SNRI) が、その副作用の少なさゆえ認容性が高く、比較的容易に使用することが可能ということから広く普及してきている。しかしながら、強い焦燥感や希死念慮などを伴う重症のうつ病においては SSRI・SNRI はこれらの症状を逆に悪化させてしまうこと、また、治療効果の発現に数週間を要することが知られており、新しい機序の抗うつ薬の開発が期待されている (Krishnan and Nestler, 2008)。

近年、グルタミン酸神経系がうつ病の病態に関与していることが示唆されており (Sanacora et al., 2008)、非競合的 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体 antagonist である ketamine が大うつ病の患者において抗うつ作用を示すことが二重盲検試験で示されている (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006)。しかし、ketamine は幻覚、幻聴等といった統合失調様症状を引き起こすといった副作用があることから、日本においては抗うつ薬として臨床適応されるには至っていないのが現状である。

Ketamine と同じ非競合的 NMDA 受容体 antagonist であるアダマンタン骨格 (構造式 A) を持つ memantine (MEM; 構造式 B) には幻覚、幻聴等といった副作用が少なく、正常時の生理的な神経興奮により生じる一過性の高濃度のグルタミン酸に対しては NMDA 受容体から遊離し、正常な神経伝達には影響を与えない。一方で、持続的で低濃度のグルタミン酸刺激に対しては NMDA 受容体を遮断し、神経を細胞死から保護する作用によりアルツハイマー型認知症患者の認知機能低下遅延効果を有すると報告されている (McShane et al., 2006; Parsons et al., 2007)。また、NMDA 受容体遮断作用以外にも  $\alpha 7$  nicotine 受容体や 5-HT<sub>3</sub> 受容体に対しても遮断作用を有している (Berman et al., 2012; Kishi and Iwata, 2013; Parsons et

al., 2007; Rammes et al., 2001)。当教室では MEM が脳内 dopamine (DA) や 5-HT の再取り込み阻害及び monoamine oxidase (MAO) 阻害作用を有することを明らかにしてきた (Onogi et al., 2009)。従って、MEM は既存の抗うつ薬の作用機序の基盤となるモノアミン神経系へ作用するだけでなく NMDA 受容体遮断作用などの多様な作用を有することから新たなタイプの抗うつ薬となり得る可能性が考えられる。実際、12 週間の長期投与による臨床試験において MEM がうつ病患者に対して効果的であることが報告されており (Ferguson and Shingleton, 2007)、うつ病を併発している認知症患者において MEM の服用が認知機能低下遅延効果並びに抗うつ作用の 2 つの効果をもたらす可能性がある。



**Fig. 1 Structures of adamantane (A) and MEM (B).**

精神疾患モデル動物として用いられている嗅球摘出 (olfactory bulbectomy: OBX) 動物はうつ病患者の臨床症状に類似した行動学的変化 (情動障害、食欲の低下、性活動の減弱、記憶障害など) や、神経化学的变化 (脳内 NAd、DA および 5-HT の減少) が発現するのが特徴である (Kelly et al., 1997; Hozumi et al., 2003; Nakagawasai et al., 2003a; Saitoh et al., 2007; Takahashi et al., 2016 and 2017; Thakare et al., 2017)。また、病理解剖学的にも、皮質・海馬・尾状核・扁桃体の萎縮ならびに脳室の拡大 (Wrynn et al., 2000)、神経新生の低下 (Nakagawasai et al., 2016; Takahashi et al., 2017) といった、うつ病患者で認められる組織化学的異常に類似した脳構造の変化も確認されている。また、上記の異常行動や神経化学的变化は、抗うつ薬の急性ではなく臨床を反映し慢性投与で改善する (Kelly et al., 1997)。従って、本モデルは臨床的妥当性を持ったうつ病モデルであると考えられ、古くから抗うつ薬の前臨床評価に用いられている。

これまで、OBX 動物を含む様々なうつ病モデルを用いて抗うつ薬の作用機序の解明並びに検討が行われてきた。そんな中、海馬神経新生促進仮説が提唱され注目を集めている。これまでヒトやげっ歯類の成体脳では神経細胞は増えないと考えられていたが、海馬歯状回下流細胞下層 (subgranular zone; SGZ) と脳室下帯 (subventricular zone; SVZ) に神経幹細胞が存在しており、絶えず新しいニューロンが生まれていることが明らかになった (Alvarez-Buylla et al., 2002; Cayre et al., 2002)。SVZ で産生された新生ニューロンは分裂しながら、rostral migratory stream と呼ばれる経路に沿って前方の嗅球へと移動し、最終的に嗅脳の顆粒細胞及び傍系球体細胞に分化し、嗅脳細胞のリサイクリングに関与している。一方、SGZ で産生された新生ニューロンの一部は、海馬歯状回細胞層に移動する。新たに生み出されたニューロンは、実際に神経ネットワークに組み込まれて気分や記憶に影響を与える可能性が高く、これらのことから、神経細胞の新生を海馬歯状回の部位で観察することは妥当であると考えられる。動物実験において、抗うつ薬 2~4 週間の慢性投与によってげっ歯類の海馬神経幹・前駆細胞の増殖が促進され、神経新生が増加すること、この神経新生促進作用は、臨床における治療効果発現までの時間経過と類似していることが報告されている (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003)。さらに、うつ病モデル動物の海馬歯状回への脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) 微量注入によってうつ様行動が改善したという報告 (Shirayama et al., 2002) や抗うつ薬を服用していた患者の死後脳において、海馬内 BDNF 量が有意に増加していたという報告により (Chen et al., 2001)、抗うつ薬の有望なターゲットとして海馬での BDNF 量を増加させる薬物が注目されている。

また、うつ病患者の死後脳において、グリア細胞の形態並びに分布に変化が生じていることが報告されている (Rajkowska and Stockmeier, 2013; Czéh and Nagy, 2018)。グリアは脳において、神経細胞の 50 倍以上存在し、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなどから構成されている。近年になって、グリア細胞の機能として神経栄養因子・成長因子の貯蔵・産生、イオン・神経伝達物質の取り込みなど多様な機能を有することが明らかになっており、精神疾患の生物学的研究や向精神薬の作用に関して、グリアの役割の重要性

が議論されている (Pfau et al., 2018)。OBX 動物におけるうつ様行動にも海馬におけるミクログリア活性化に起因した神経炎症が関係しているという報告があり (Rinwa and Kumar, 2013)、グリア細胞の活性化はうつ病に関係している炎症性サイトカインの分泌促進、BDNF やグルコルチコイドの分泌並びにモノアミン神経系の機能の低下をもたらすことが報告されている (Färber et al., 2005; Ros-Bernal et al., 2011; Gomes et al., 2013; Yirmiya et al., 2015; Milior et al., 2016)。これらの報告から神経だけでなく、グリアを含めたネットワークがうつ病の病態・治療に重要であることが推測される。

以上示した背景を基に、うつ病モデル動物として OBX マウスを用い、本研究では、MEM の抗うつ作用について行動薬理的に検討し、さらにそのメカニズムについて神経新生並びに神経保護的な観点から神経化学的並びに分子生物学的に検討した。

尚、本論文の詳細については、

Takahashi, K., Nakagawasai, O., Nemoto, W., Kadota, S., Isono, J., Odaira, T., Sakuma, W., Arai, Y., Tadano, T., Tan-No, K., 2018. Memantine ameliorates depressive-like behaviors by regulating hippocampal cell proliferation and neuroprotection in olfactory bulbectomized mice. *Neuropharmacology*, 137, 141-155.

に掲載済みである。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1. 使用動物

実験には体重 28~32 g の ddY 系雄性マウス (日本 SLC) を使用した。実験に供するまで温度は  $22 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 5\%$ 、明暗 12 時間サイクル (明期; 8:00~20:00, 暗期; 20:00~8:00) に管理されている環境下で飼育した。飼育にはプラスチックケージ (30 × 20 × 15 cm) を使用し 1 ケージにつき 5~6 匹の割合で飼育した。飼育期間中は固形飼料 (船橋農場 F-2) 及び水道水を自由に摂取させた。全ての実験は東北医科薬科大学動物実験規定に基づき行った。

### 2.2. 使用薬物

使用した薬物は、NMDA 受容体拮抗薬である MEM (memantine hydrochloride; Sigma-Aldrich) を用いた。MEM は Parsons ら (1999) の報告に準じて Saline (扶桑薬品工業) に溶解し、用量を 10 mg/kg 又は 20 mg/kg に調整した後にマウス体重 10 g 当たり 0.1 ml を腹腔内 (i.p.) 投与した。急性投与時には行動試験 30 分前に、反復投与の際には、OBX 手術後 14 日目から 1、3 並びに 4 週間、行動試験の 24 時間前まで 1 日 1 回投与した。

### 2.3. 嗅球摘出法

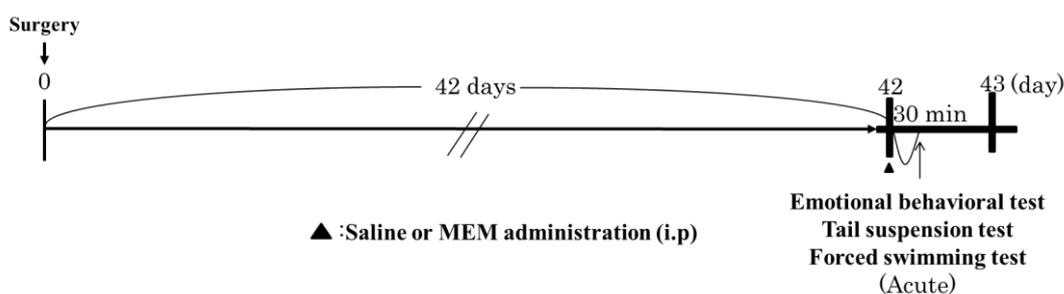
Pentobarbital Na (50 mg/kg i.p., 大日本住友製薬) の投与により麻酔後、マウスを脳定位装置に固定し、嗅球 (olfactory bulb: OB) の真上の頭蓋骨に歯科用ドリルで 2 ヶ所穴をあけ、吸引 (真空機工製, C-12 型吸引ポンプ) によって anterior olfactory nuclei を含む嗅球の 2/3 以上を摘出した。その後、止血のために摘出箇所を spongel (アステラス製薬) を埋め込み、実験に用いた。OBX 手術による影響を検討する為に、吸引による OBX は行わず、OB に傷

をつけないように頭蓋骨に穴をあけ、spongel で穴を塞いだだけのマウスを偽手術 (Sham) 群として実験に用いた。なお、OBX 処置を行ったマウスについては実験終了後に開頭し、脳を取り出して術部を確認し、前頭皮質にまで傷のあるもの又は摘出が不十分なものはデータから除外した。

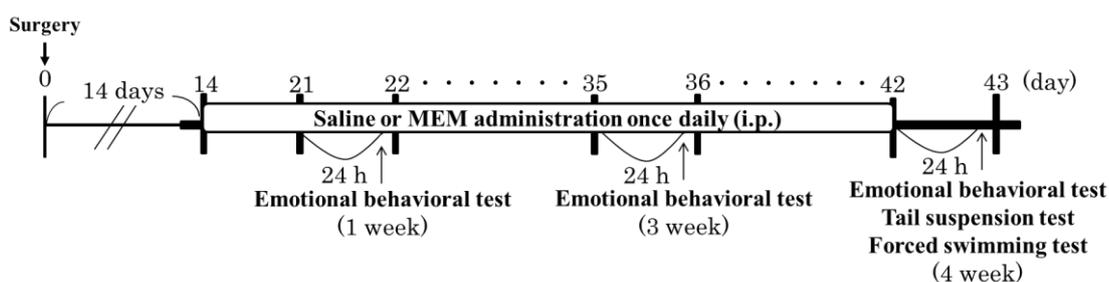
## 2.4. 行動観察方法

行動測定は下記のプロトコルに準じて実施した。

### (A) 急性投与のスケジュール



### (B) 反復投与のスケジュール



**Fig. 2 Experimental time course for behavioral tests of experimental protocol for acute treatment (A) and of experimental protocol for chronic treatment (B).**

#### 2.4.1 情動行動の評価 (Emotional behavioral test)

スコア付けは、Takahashi ら (2011) の報告に準じて行った。評価項目は以下の通りである。

評価項目	評価方法
Attack response	マウスの鼻先 4-5 cm に鉄製の棒を差し出した時の反応
Startle response	5 ml シリンジを使用して背側から空気をあてた時の反応
Struggle response	グローブをつけた手の上に置いたときの反応
Fight response	ピンセットでマウスの尾を挟んだ時の反応

鳴声	各項目において鳴声をあげるかどうかを評価
----	----------------------

各反応は以下の基準を用いてスコア付けした。

0：無反応。

1：わずかに反応を示した。

2：中程度の反応を示した。

3：顕著な反応を示した。

4：極度の反応を示した。

但し、Attack response 以外の反応は差異が判断しづらいため、0、2、4 の3段階で評価している。なお、最終的にはこれらのスコアを合算したトータルエモーションスコアを用いて評価を行った。

#### 2.4.2. テールサスペンション試験 (Tail-suspension Test; TST)

実験動物を逃避不可能の状況下で観察するとうつ状態の指標とされる無動状態（何の行動も示さずにぶら下がっているだけの状態）が発現する。抗うつ作用の評価はこの無動時間が対照群に対して減少しているかどうかで判断する。本研究では、急性投与 30 分後または慢性投与 24 時間後、マウスの尾の先端を床上約 30cm の高さに設置されたヒモにテープで固定し、無動状態の時間を 10 分間計測した。

#### 2.4.3. 強制水泳試験 (Forced swimming test; FST)

FST は、Porsolt ら (1978) の報告に準じて行った。25°C に調整した水を 14 cm の深さまで満たしたガラス製の円柱状の容器 (直径 20 cm 高さ 25 cm) の中にマウスを入れ、脱出口を探そうとして側壁をよじ登ろうとするようなもがき行動 (struggle)、容器の中を泳ぎ回る水泳行動 (swimming)、及び水面から頭だけを出しているような無動 (immobility) の各行動の累計時間を 5 分間測定した。FST は急性投与 30 分後または慢性投与 24 時間後に行った。これらの行動測定には異なるマウスを用いている。マウスにはあらかじめ測定前日に水に慣れさせるために 15 分間のプレテストを行った。

#### 2.5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 及び Western blotting

Saline 又は MEM を 4 週間慢性投与し、最終投与 24 時間後にマウスを断頭にて屠殺後、頭蓋骨を取り除き、脳を切り出した。摘出した脳から Brain Slicer を用いて背側海馬の部位を切り出し、150  $\mu$ l の CellLytic MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent (Sigma Aldrich) 中で十分にホモジナイズした。遠心分離 (15,000 $\times$ g, 15 分, 4°C) 後、上清 120  $\mu$ l を取り出し、4 $\times$ Laemmli sample buffer (300 mM Tris-HCl, 8% SDS, 40% glycerol, 12% 2-mercaptoethanol, 0.012% bromophenol blue, pH 6.8) を 1/3 量加え、95 °C で 10 分熱処理することで Western blotting 用のサンプルとした。サンプルは 10% または 15% アクリルアミドゲルを用いて

SDS-PAGE を行い、分離したタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) へセミドライ式トランスファー装置 (Bio-Rad) を用いてトランスファーした。トランスファーした PVDF 膜を 5% スキムミルク含有 TBST (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) を用いて室温で 30 分間ブロッキングした後、5% スキムミルク含有 TBST で 1,000 倍希釈した下記の 1 次抗体とそれぞれ一晩 4°C でインキュベーションした。PVDF 膜を TBST で洗浄後、TBST で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, 5,000 倍希釈) または HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, 5,000 倍希釈)、HRP 標識抗ヒツジ IgG 抗体 (Abcam limited company, 20 万倍希釈) と室温にて 2 時間インキュベーションした後、化学発光検出キット (ECL Western Blotting detection reagent, GE Healthcare) を用いて、HRP と基質により生じた化学発光を化学発光検出フィルム (Hyperfilm MP, GE Healthcare) に感光させて検出した。化学発光検出フィルムに現像したバンドは Image-J 1.43u (National Institute of Health) を用いて定量した。

1 次抗体及び希釈倍率は以下の通り

- ・ ウサギ抗 Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体 (Millipore, 100 倍希釈)
- ・ ウサギ抗リン酸化 TH<sup>ser31</sup> 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ・ ウサギ抗リン酸化 TH<sup>ser40</sup> 抗体 (Millipore, 500 倍希釈)
- ・ ウサギ抗リン酸化 protein kinase A (PKA) 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ・ ウサギ抗リン酸化 DA- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 (DARPP-32) 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ・ ウサギ抗 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ・ ウサギ抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)

- ウサギ抗 cAMP-responsive element binding protein (CREB) 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ウサギ抗リン酸化 CREB 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ウサギ抗リン酸化 BDNF 抗体 (Abcam, 100 倍希釈)
- マウス抗 doublecortin (DCX) 抗体 (Santa Cruz Biotech, 100 倍希釈)
- マウス抗 neuronal nuclear antigen (NeuN) 抗体 (Millipore, 1,000 倍希釈)
- ヒツジ抗 ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) 抗体 (Abcam, 500 倍希釈)
- マウス抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Millipore, 200 倍希釈)
- ウサギ抗 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ウサギ抗 interleukin-6 (IL-6) 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ウサギ抗リン酸化 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) p65 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ウサギ抗リン酸化 NF- $\kappa$ B inhibitor- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 抗体 (Cell signaling, 1,000 倍希釈)
- ウサギ抗 Bcl-2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 200 倍希釈)
- ウサギ抗 Bcl-2-associated protein X (Bax) 抗体 (Abcam, 1,000 倍希釈)
- ウサギ抗 cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling, 1,000 倍希釈)
- ウサギ抗  $\beta$ -actin 抗体 (Cell Signaling, 1,000 倍希釈)

## 2.6. 免疫組織化学的染色法による共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析

### 2.6.1 背側海馬における TH 並びにグリア細胞の分布並びに形態的な変化の測定

Saline 又は MEM を 4 週間慢性投与し最終投与 24 時間後に Pentobarbital Na (50 mg/kg) を i.p.投与することにより麻酔を施し、開腹後、右心室より大動脈内にカニューレを挿入し、5 ml/min の流速で phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2, 4°C) を 15 ml 灌流し脱血した。その直後に固定液 (4% paraformaldehyde in PBS, 4°C) を同じ流速で 40 ml 灌流し、組織を固定した。灌流固定後、脳を摘出し、4°C の固定液に 60 分間浸して再固定を行った。その後、PBS で 15 分 4 回の洗浄を行い、20% sucrose 溶液中にて 12~24 時間浸し、水分をできるだけ取り除いてから使用した。切片は脳を M-1 embedding matrix (Thermo Scientific) を用いて固定した後、クリオスタット (Microm International GmbH) により-12 °C で 40 µm の厚さに切り出した。その後、凍結切片をゼラチンコーティングしたスライドガラス (26 × 76 mm) に貼り付け、標本とした。作製した標本は、12 時間脱気した後に使用した。脳切片の免疫染色は以下の手順で行った。

1) PBS によりサンプルを 15 分間 3 回洗浄

2) 10% normal goat serum (NGS) (Rockland Immunochemicals) 含有 PBST で 4°C で 2 時間ブロッッキング

3) PBS によりサンプルを 15 分間 3 回洗浄

4) 1% NGS 含有 PBST で希釈した下記の 1 次抗体を 4°C で一晩反応

1 次抗体及び希釈倍率は以下の通り

- ・ ウサギ抗 TH 抗体 (100 倍希釈)
- ・ マウス抗 GFAP 抗体 (Millipore, 200 倍希釈)
- ・ ウサギ抗 Iba1 抗体 (Wako Pure Chemical Industries, 200 倍希釈)

5) PBS によりサンプルを 30 分間 3 回洗浄

6) 1% NGS 含有 PBST で希釈した下記の 2 次抗体を 4°C で一晩反応

2 次抗体及び希釈倍率は以下の通り

- Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes, 200 倍希釈)
- Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes, 200 倍希釈)
- Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes, 200 倍希釈)

7) PBS によりサンプルを 60 分間 4 回洗浄

8) Dako Fluorescence Mounting Medium を用いてカバーガラスで封入

9) 解析までは 4°C の暗室で保存

免疫蛍光は、D-Eclipse C1 confocal microscope (Nikon) により可視化させた。

#### 2.6.2. 画像解析 (活性化されたグリア細胞の評価)

各脳切片の海馬を 20 倍の拡大視野で、2 種類の対応する波長の励起光を用い蛍光を発光させて、タイリングシステムを用いて海馬全体の画像としてコンピューターに取り込み、NIS-Elements AR の解析ソフトを用いて Iba1 陽性細胞並びに GFAP 陽性細胞の細胞体の大きさ並びに突起の長さ、細胞数、密度を投与群ごとにまとめ、統計処理した。

#### 2.6.3. 背側海馬における細胞増殖の変化の測定

Saline 又は MEM を 4 週間慢性投与 2 時間後に 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich; 75 mg/kg) を 2 時間ごとに 3 回投与し、その 18 時間後に Pentobarbital Na (50 mg/kg) を i.p.投与することにより麻酔を施し、開腹後、右心室より大動脈内にカニューレを挿入し、5 ml/min の流速で PBS (pH 7.2, 4°C) を 15 ml 灌流し脱血した。その直後に固定液 (4% paraformaldehyde in PBS, 4°C) を同じ流速で 40 ml 灌流し、組織を固定した。灌流固定後、

脳を摘出し、4°C の固定液に 60 分間浸して再固定を行った。その後、PBS で 15 分 4 回の洗浄を行い、20% sucrose 溶液中にて 12~24 時間浸し、水分をできるだけ取り除いてから使用した。脳切片の作製は、上記と同様の方法により、厚さ 40  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。脳切片の免疫染色は以下の手順で行った。

1) 2N HCl にて 37 °C で 30 分間インキュベーション

2) 0.15M Sodium Borate にて室温で 10 分間隔 2 回洗浄

3) PBS によりサンプルを 15 分間 3 回洗浄

4) 1% NGS 含有 PBST で希釈した下記の 1 次抗体を 4°C で一晩反応

1 次抗体及び希釈倍率は以下の通り

- ・ ラット抗 BrdU 抗体 (Harlan SeraLab, 100 倍希釈)
- ・ マウス抗 NeuN 抗体 (Millipore, 500 倍希釈)

5) PBS によりサンプルを 30 分間 4 回洗浄

6) 1% NGS 含有 PBST で希釈した下記の 2 次抗体を 4°C で一晩反応

2 次抗体及び希釈倍率は以下の通り

- ・ Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes, 200 倍希釈)
- ・ Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Molecular Probes, 200 倍希釈)

7) PBS によりサンプルを 60 分間 4 回洗浄

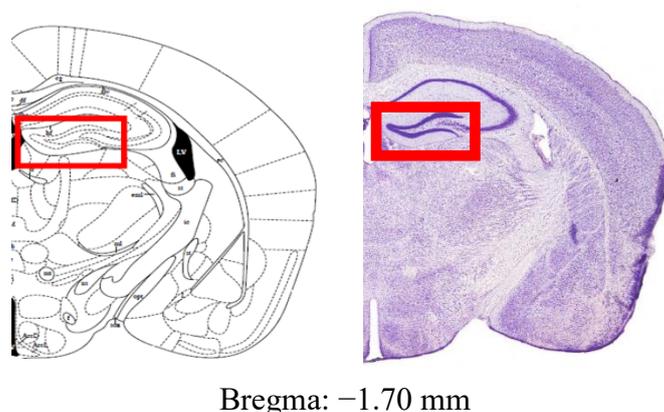
8) Dako Fluorescence Mounting Medium を用いてカバーガラスで封入

9) 解析までは 4°C の暗室で保存

免疫蛍光は、D-Eclipse C1 confocal microscope (Nikon) により可視化させた。

#### 2.6.4. 画像解析 (海馬歯状回における細胞増殖の評価)

各脳切片の海馬歯状回 (Fig. 3 の赤で囲んだ部位) を 10 倍の拡大視野で、2 種類の対応する波長の励起光を用い蛍光を発光させて、画像としてコンピューターに取り込み、まず海馬歯状回部位特定のために NeuN 陽性細胞を観察した後に、新生細胞マーカである BrdU 陽性細胞の数を投与群ごとにまとめ、統計処理した。なお細胞数は、8 つの脳切片の左右の合計値を合計した値を 2 倍することによって背側海馬歯状回全体の体積あたりの新生細胞数として算出して示した。



**Fig. 3 Diagram representing segment of the hippocampal dentate gyrus.**

#### 2.7. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

Saline 又は MEM を 4 週間慢性投与し、最終投与 24 時間後にマウスを断頭にて屠殺後、頭蓋骨を取り除き、脳を切り出した。摘出した脳から背側海馬の部位を切り出し、そのサンプルを内標準物質である 100 ng/mL の isoproterenol を含む 0.1 M 過塩素酸中においてホモジナイズした。遠心分離 (10,000 × g, 10 分, 4°C) 後、その上澄みをメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過し、そのろ液 100 μl を HPLC に注入し、流速 0.4 mL/min で移動相 (95% 50 mM sodium acetate, 10 mM citric acid, 0.15 mM EDTA, 0.45 mM SOS, 5% acetonitrile, pH 3.6) を流し、1700 mV の電位にて電位検出器 (model EC8020, Tosoh) を用いて NAd 並びに

3-methoxy-4-hydroxymandelic acid (MHA)、DA、dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA) を定量した。また、MHA/ NAd、DOPAC/DA 並びに HVA/DA の比率は NAd 及び DA の代謝回転の指標として用いた。

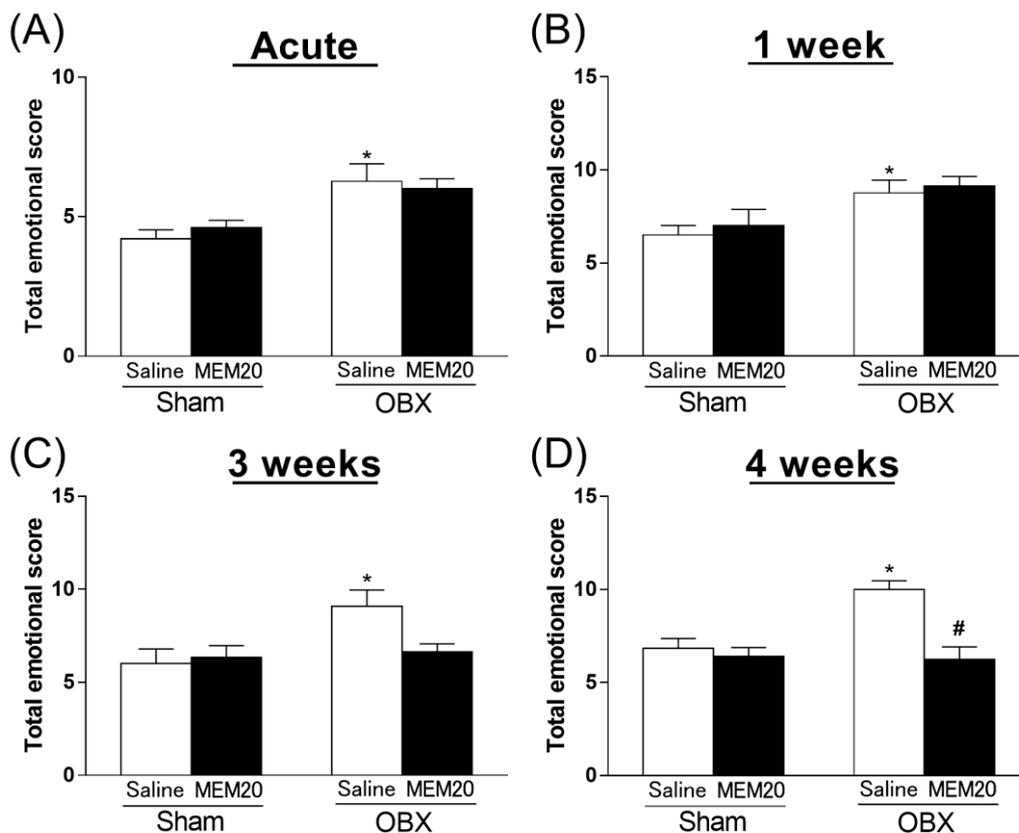
## 2.8. 統計処理

実験結果は、平均値 (means) ± 標準誤差 (SEM) で示した。パラメトリックなデータに関しては群間の有意差は 1 元配置もしくは 2 元配置の分散分析後、Fischer's PLSD 法を用いて検定した。ノンパラメトリックなデータに関しては群間の有意差は Kruskal-Wallis test での解析後、Steel-Dwass 法を用いて検定した。また、すべての検定法において危険率 5%以下を有意差ありと判定した。

### 3. 実験結果

#### 3.1. OBX マウスの情動行動に対する Memantine 投与の影響

うつ病患者は様々な情動行動障害をきたすことが報告されている (Townsend and Altshuler, 2012)。抗うつ薬の簡便なスクリーニングとして情動行動試験が知られているため、MEM の効果が認められる投与期間の検討を行ったところ、Saline 処置をした OBX マウスは Saline 処置をした Sham マウスと比較し、有意なトータルエモーションの上昇が認められた [Fig. 4 (A)-(D)]。その OBX のトータルエモーションの上昇は、MEM 20 mg/kg を急性、1 週間または、3 週間反復投与によっては有意な改善は見られず、4 週間慢性投与によって有意な改善が認められた [Fig. 4 (D)]。

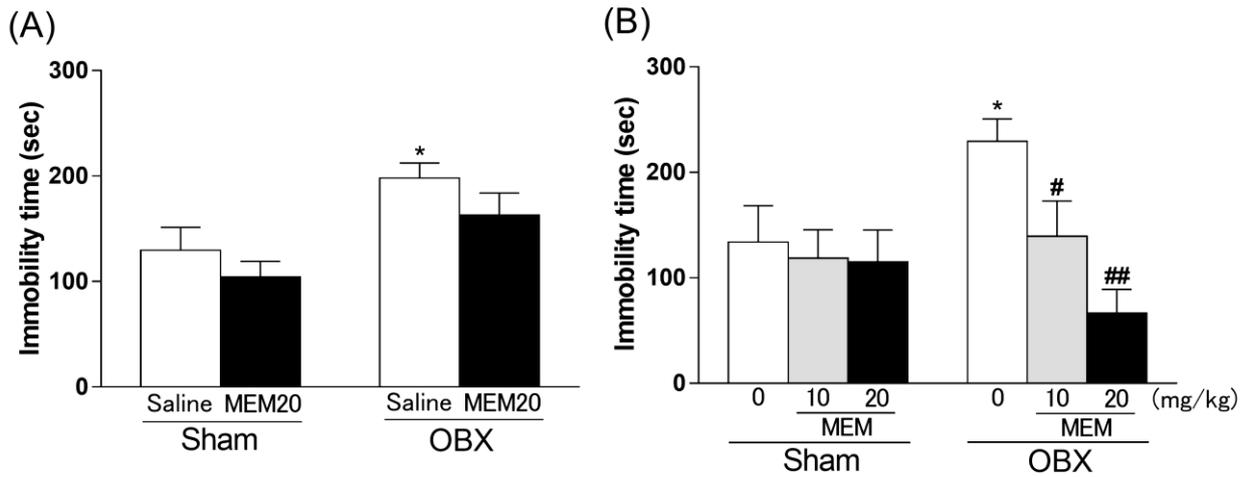


**Fig. 4 Effects of MEM administration for acute (A), 1 (B), 3 (C) or 4 (D) weeks on OBX-induced hyperemotional behavior.** Bars represent means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. saline-treated sham group and #  $p < 0.05$  vs. saline-treated OBX group (n = 7–22 per group).

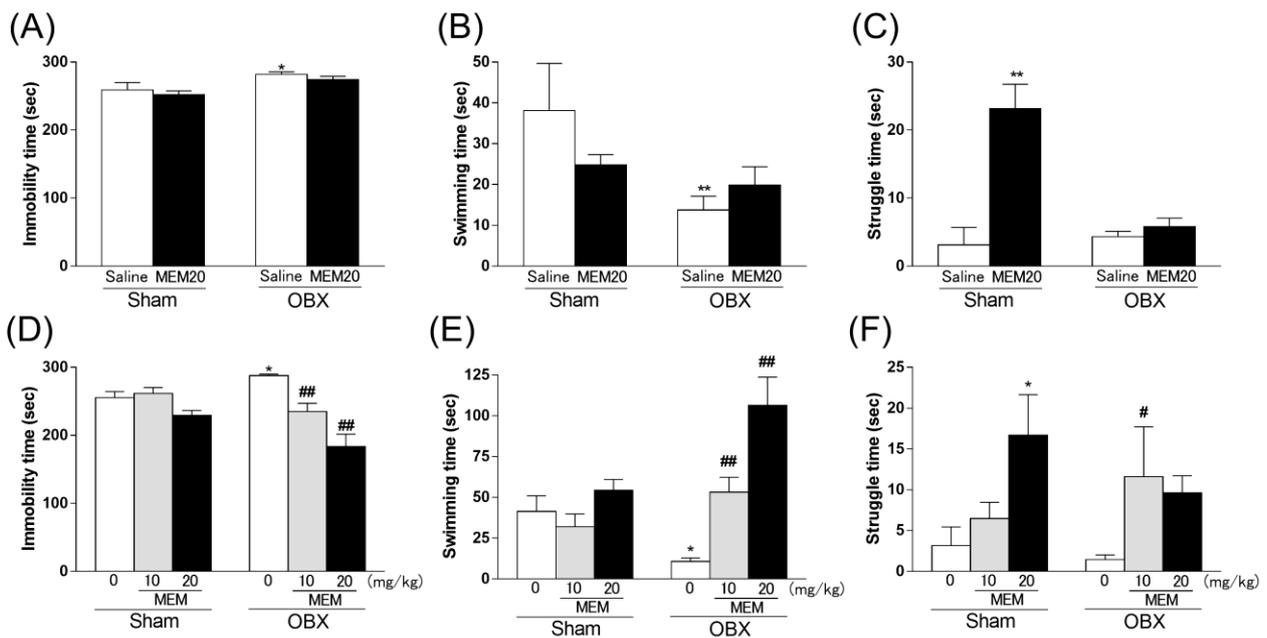
### 3.2. OBX マウスのうつ様行動に対する Memantine 投与の影響

情動行動試験において効果が認められた投与日数である MEM 4 週間慢性投与によって抗うつ作用を示すか否かに関して TST を用いて検討したところ、Saline 処置をした OBX マウスは Saline 処置をした Sham マウスと比較し、うつの指標となる無動時間の有意な延長が認められた [Fig. 5 (A) and (B)]。その OBX の無動時間の延長は、MEM 20 mg/kg の急性投与によっては有意な改善は見られず、MEM 10 又は 20 mg/kg 4 週間慢性投与によって有意に短縮された [Fig. 5 (B)]。

次に MEM の抗うつ作用の詳細なメカニズムの検討のために FST を行った。FST の行動のうち、struggle 行動は NAd 神経系と DA 神経系が、swimming 行動は DA 神経系が関係しているという報告がある (Nikulina et al., 1991; Detke et al., 1995; Maj et al., 1997)。このことからどちらの行動が増強するかによって何の神経系が関係しているか推測することが可能である。TST と同様で Saline 処置をした OBX マウスは Saline 処置をした Sham マウスと比較し、有意な無動時間の延長が認められた。その OBX の無動時間の延長は、MEM 20 mg/kg の急性投与によっては有意な改善は見られず [Fig. 6 (A)-(C)]、MEM 10 又は 20 mg/kg 4 週間慢性投与によって有意に短縮され、これは swimming 行動並びに struggle 行動が増加したことが要因であった [Fig. 6 (D)-(F)]。



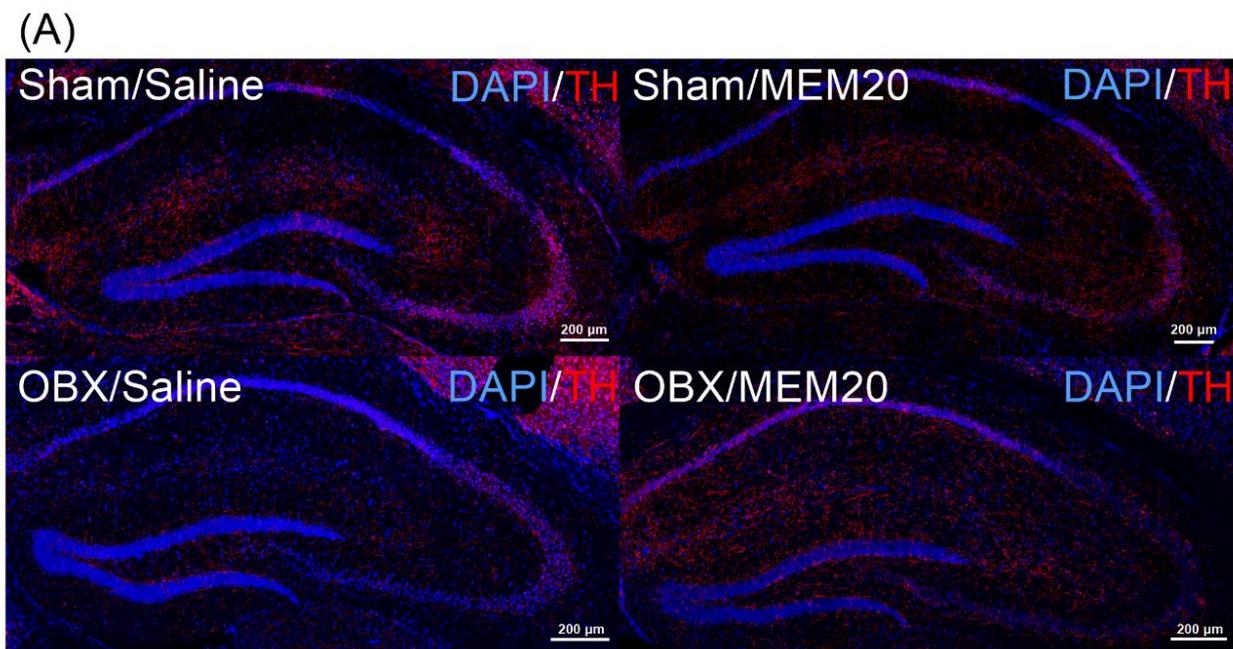
**Fig. 5** Effects of MEM for acute (A) or chronic treatments (B) on depressive-like behaviors of OBX mice, measured by the tail suspension test. Bars represent means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. saline-treated sham group, #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  vs. saline-treated OBX group ( $n = 8-11$  per group).

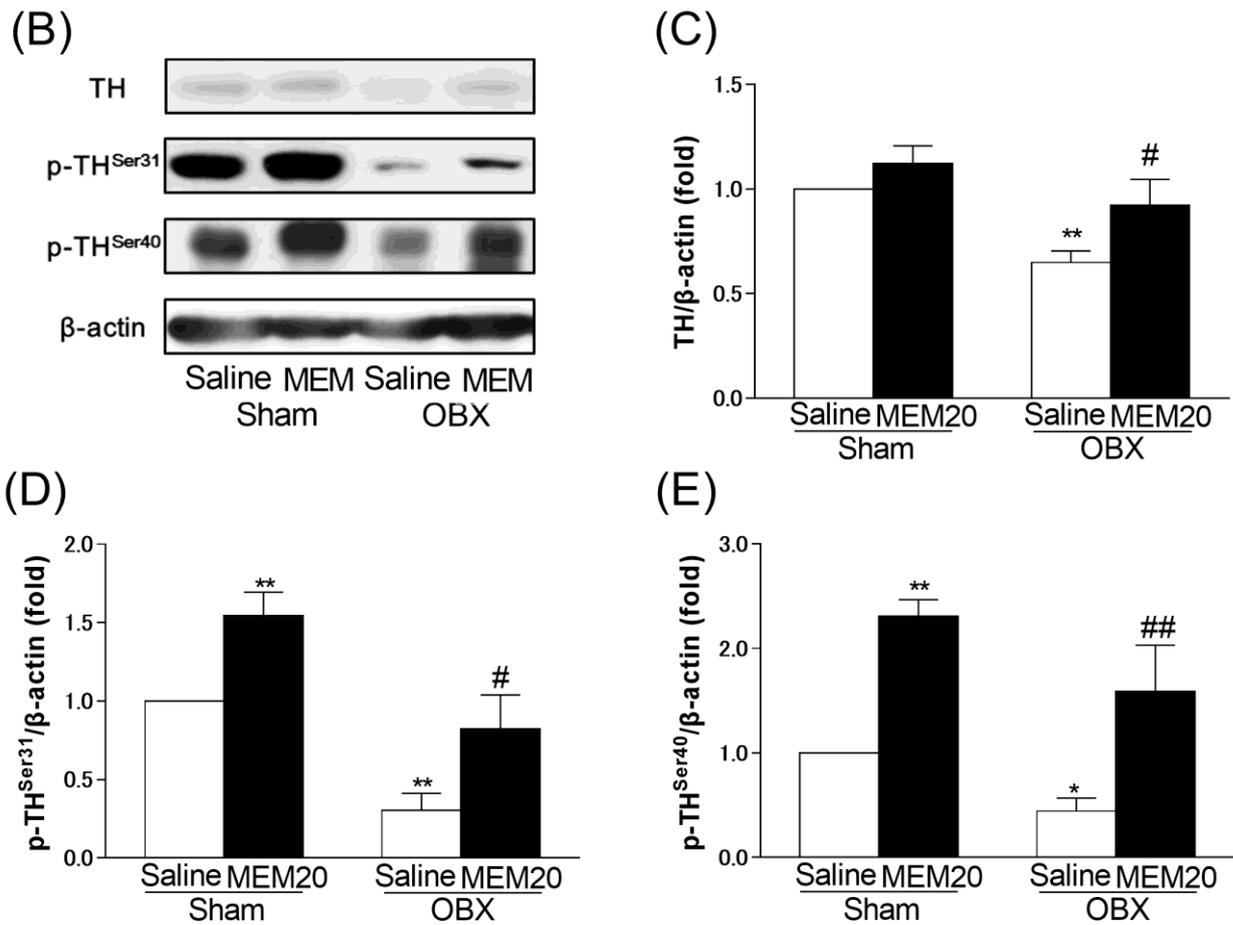


**Fig. 6** Effects of MEM for acute (A-C) or chronic treatments (D-F) on depressive-like behaviors of OBX mice, measured by the forced swimming test. The duration of immobility (A and D), swimming (B and E) and struggle (C and F) behaviors in the forced swimming test was measured 42 days after surgery. Bars represent means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. saline-treated sham group, #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  vs. saline-treated OBX group ( $n = 7-13$  per group).

### 3.3. Memantine 慢性投与による海馬内モノアミン神経系への影響

FST において NAd 神経系並びに DA 神経系が抗うつ作用に関係している可能性が示唆されたため、モノアミン生合成における律速酵素である TH の海馬における分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、さらに TH の発現レベル並びにその活性の変化に関して Western blotting 法を用いて検討を行った。共焦点レーザー顕微鏡において Saline 処置をした OBX マウスは Saline 処置をした Sham マウスと比較し、TH レベルの蛍光が低下しておりそれが MEM の投与で回復しているように見受けられた [Fig. 7 (A)]。さらに Western blotting 法を用いたところ Saline 処置をした OBX マウスは Saline 処置をした Sham マウスと比較し、TH 並びに p-TH<sup>ser31</sup>、p-TH<sup>ser40</sup> が有意に減少しておりその減少が MEM の慢性投与によって有意に回復した。一方で Sham 群間においては MEM の慢性投与によって p-TH<sup>ser31</sup> 並びに p-TH<sup>ser40</sup> のみ有意に増加し、TH レベルは変化が認められなかった [Fig. 7 (C)-(E)]。

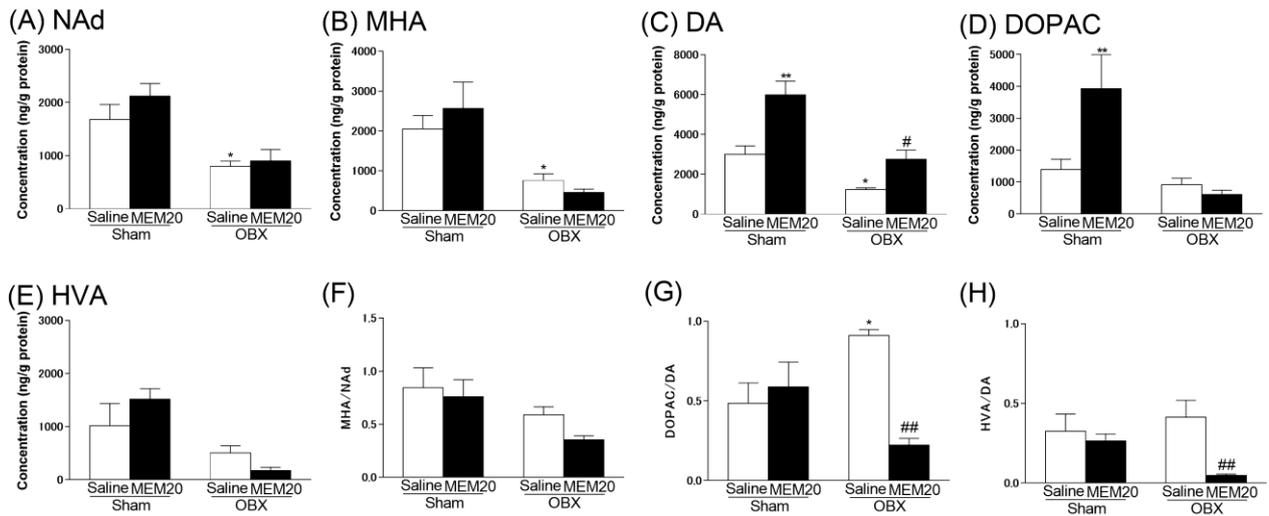




**Fig. 7 Effects of MEM on the levels of total and activated TH.** (A) Microscopy images of TH (red) and DAPI (blue) immunostaining in the hippocampus. Images show alterations in TH, p-TH<sup>Ser31</sup>, and p-TH<sup>Ser40</sup> levels in the hippocampus after MEM administration. (B) Representative immunoblots probed with antibodies against TH, p-TH<sup>Ser31</sup>, p-TH<sup>Ser40</sup>, and β-actin. (C-E) Quantification of the normalized to β-actin levels of TH, p-TH<sup>Ser31</sup>, and p-TH<sup>Ser40</sup> after saline or MEM treatment in sham-operated or OBX mice. Bars represent means ± SEM. \* p<0.05 and \*\* p<0.01 vs. saline-treated sham group, # p<0.05 and ## p<0.01 vs. saline-treated OBX group (n = 3-5 per group).

### 3.4. Memantine 慢性投与による海馬内モノアミン並びにその代謝物、代謝回転の変化

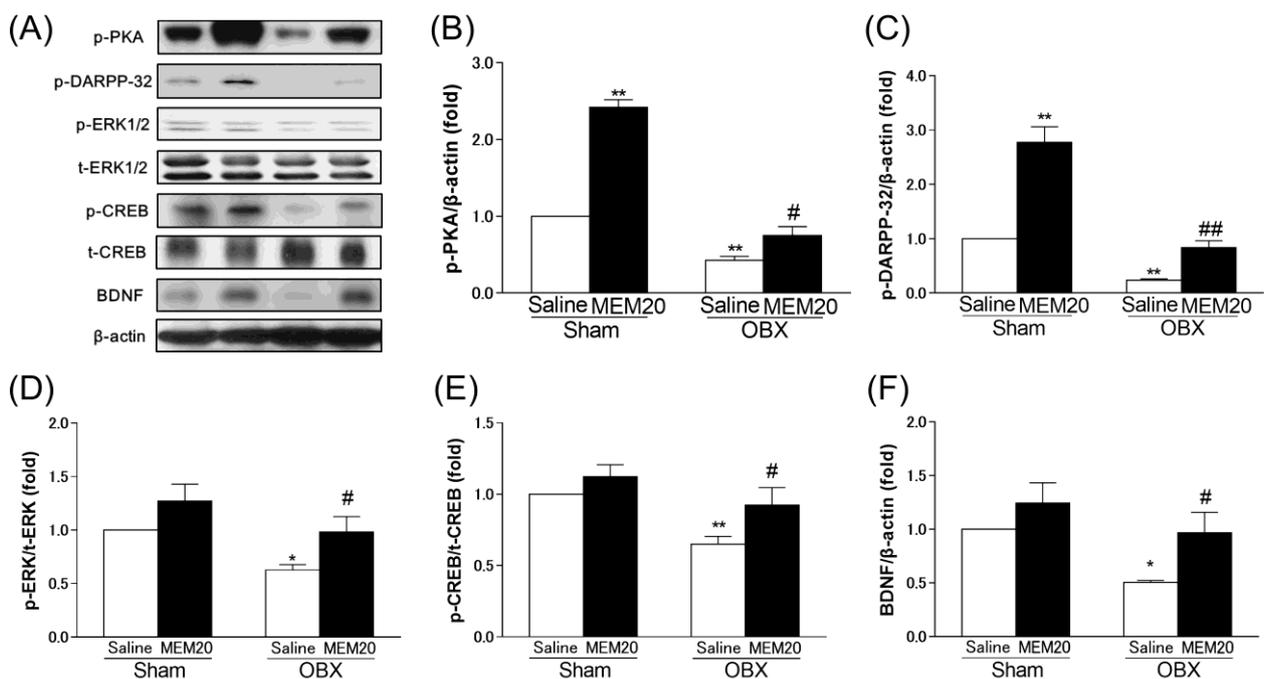
MEM の慢性投与によって海馬 TH レベル並びにその活性化が上昇することから次に海馬内のモノアミン並びにその代謝物の変化に関して HPLC 法を用いて検討を行った。Saline 処置をした OBX マウスは Saline 処置をした Sham マウスと比較し、有意な NAd、MHA、DA の減少が認められた。そのうち OBX の NAd 並びに MHA の減少は、MEM 20 mg/kg の慢性投与によっては有意な改善は見られず、DA レベルに関してのみ有意に回復した [Fig. 8 (A)-(E)]。一方で Sham 群間においては MEM の慢性投与によって DA 並びに DOPAC が有意に増加した [Fig. 8 (C) and (D)]。さらに、NAd 代謝回転に関しては MEM の投与によって有意な影響は与えなかったが DA 代謝回転に関しては Saline 処置をした OBX マウスは Saline 処置をした Sham マウスと比較し、DOPAC/DA が有意に増加しており、さらに MEM 慢性投与によって Saline 処置をした OBX マウスと比較し、DOPAC/DA 並びに HVA/DA が有意に抑制された [Fig. 8 (F)-(H)]。



**Fig. 8 Altered NAd, MHA, DA, DOPAC, and HVA concentrations and turnover in the hippocampus of OBX mice.** (A-E) Graphs showing the quantification of the concentrations of NAd (A), MHA (B), DA (C), DOPAC (D), and HVA (E) and the ratios of MHA/ NAd (F), DOPAC/DA (G) and HVA/DA (H) as monoamine turnover in the hippocampus of sham or OBX mice treated with saline or MEM. Concentrations are expressed as ng per g weight of fresh brain tissue. Bars represent means  $\pm$  SEM. \*  $p<0.05$  and \*\*  $p<0.01$  vs. saline-treated sham group, #  $p<0.05$  and ##  $p<0.01$  vs. saline-treated OBX group (n = 4 per group).

### 3.5. Memantine 慢性投与による海馬内 p-PKA、p-DARPP-32、p-ERK1/2、p-CREB 並びに BDNF レベルの変化

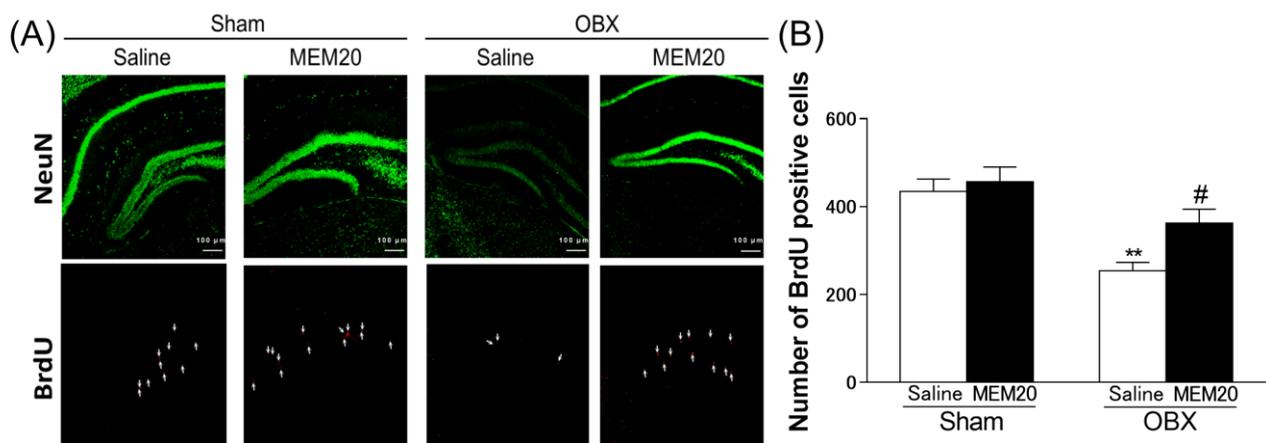
海馬内において MEM の投与によって DA レベルが上昇していたことから次にその上昇が生理学的に影響を及ぼすレベルの上昇なのかを検討するために DA 受容体シグナル経路である海馬内の p-PKA、p-DARPP-32、p-ERK1/2、p-CREB 並びに BDNF レベルの変化を Western blotting 法を用いて検討を行った。Saline 処置をした OBX マウスは Saline 処置をした Sham マウスと比較し、有意な p-PKA、p-DARPP-32、p-ERK1/2、p-CREB 並びに BDNF レベルの減少が認められ、これらの減少は MEM 慢性投与によって有意に回復した [Fig. 9 (B)-(F)]。一方で Sham 群間においては MEM の慢性投与によって p-PKA 並びに p-DARPP-32 のみ有意に増加した [Fig. 9 (B) and (C)]。



**Fig. 9 Altered levels of the phosphorylated (p) forms of PKA, DARPP-32, ERK, and CREB, and of BDNF in the hippocampus after MEM administration.** (A) Representative immunoblots probed with antibodies against p-PKA, p-DARPP-32, p-ERK, t-ERK, p-CREB, t-CREB, BDNF, and β-actin, as indicated. (B-F) Quantification of the normalized values of p-PKA (B), p-DARPP-32 (C), and BDNF (F) levels with β-actin and of p-ERK (D) and p-CREB (E) with t-ERK and t-CREB, respectively. Bars represent means ± SEM. \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01 vs. saline-treated sham group, # p < 0.05 and ## p < 0.01 vs. saline-treated OBX group (n = 3-5 per group).

### 3.6. Memantine 慢性投与による海馬歯状回における細胞増殖の変化

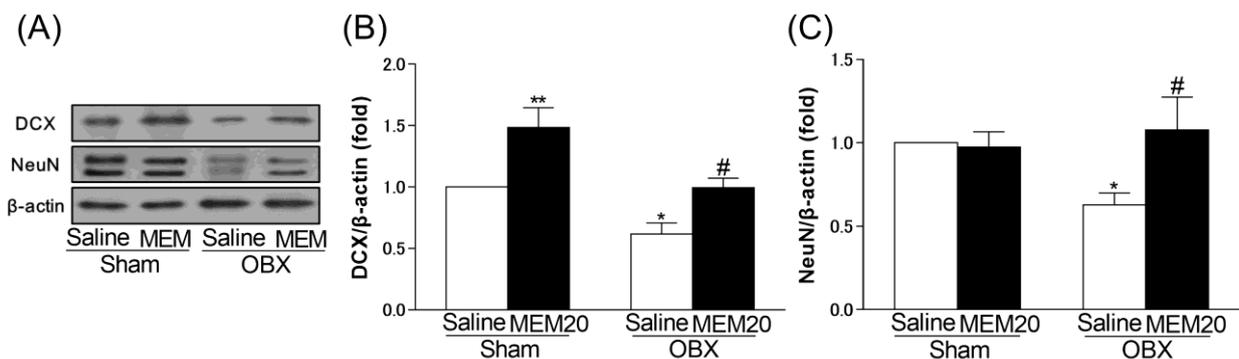
抗うつ薬の作用機序として海馬の神経新生の促進が関与していると報告されている (Santarelli et al., 2003)。本研究において、神経新生を促す海馬内 BDNF の減少を MEM が回復させることから、MEM の慢性投与が海馬歯状回での細胞増殖に影響を与えるか否か共焦点レーザー顕微鏡を用いて背側海馬の歯状回における新生細胞数を測定した (新生細胞マーカーである BrdU は赤で示しており画像では矢印で示している。成熟神経細胞マーカーである NeuN は緑で示しており、海馬歯状回部位特定の為に用いた)。歯状回における Saline 処理した OBX マウス新生細胞数は Sham マウスと比較し有意に減少し、MEM 20 mg/kg の慢性投与により有意に回復した [Fig. 10 (A) and (B)]。



**Fig. 10 Influence of MEM on hippocampal neurogenesis in OBX mice.** (A) Microscopy images showing BrdU (red) and NeuN (green) immunostaining in the dentate gyrus region of the hippocampus. Arrows indicate BrdU-labeled cells. (B) Quantitative analysis of the number of BrdU positive cells in sham and OBX mice treated with saline or MEM. Bars represent means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  vs. saline-treated sham group, #  $p < 0.05$  vs. saline-treated OBX group ( $n = 5$  per group).

### 3.7. Memantine 慢性投与による海馬 DCX 並びに NeuN レベルの変化

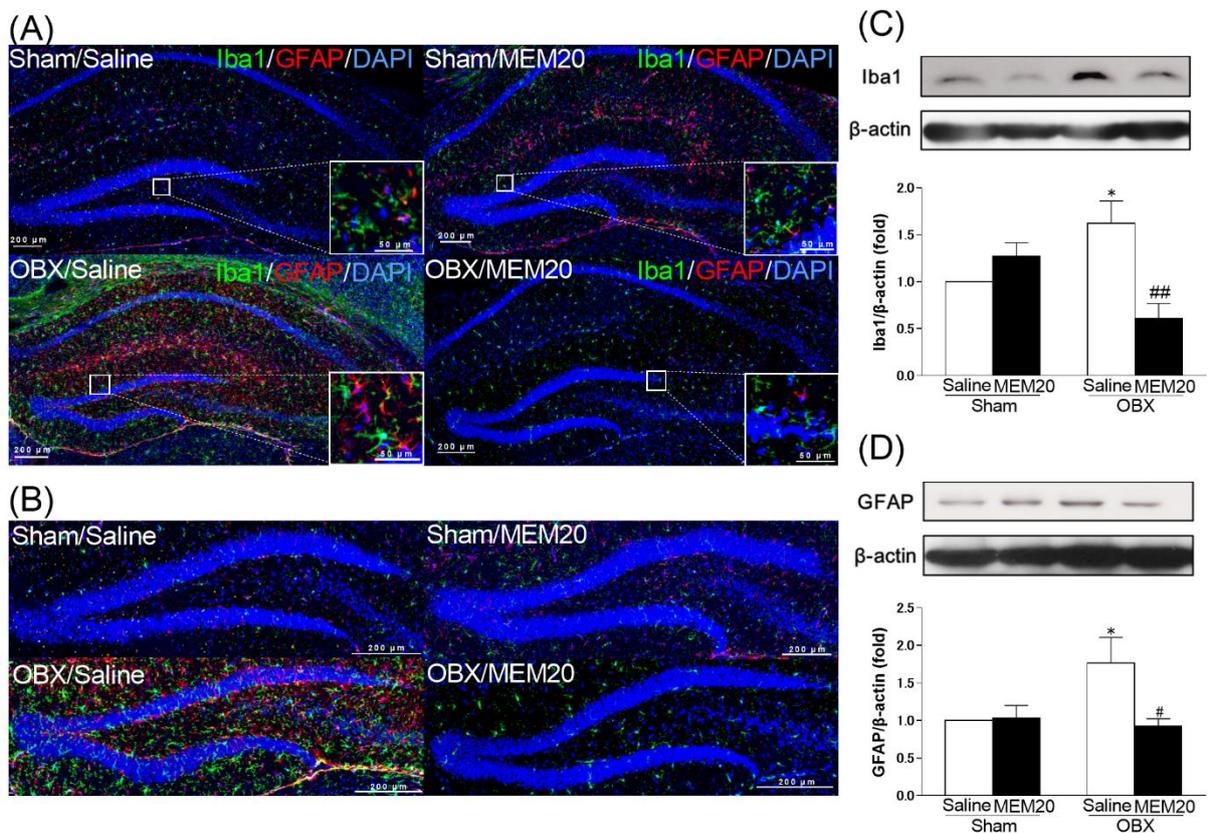
MEM の慢性投与によって OBX マウスでの海馬歯状回における新生細胞数の減少が改善されていたので、その新生細胞が神経細胞に分化し成熟されているか否か、未成熟神経細胞マーカーである DCX 並びに成熟神経細胞マーカーである NeuN の発現レベルの変化に関して Western blotting 法を用いて定量を行った。その結果、Saline 処理した OBX マウスの海馬 DCX 並びに NeuN の発現レベルは Sham マウスと比較し有意に減少し、MEM 20 mg/kg の慢性投与により有意に回復した [Fig. 11 (B) and (C)]。一方で Sham 群間においては MEM の慢性投与によって DCX の発現レベルのみ有意に増加し NeuN に関して変化は見られなかった [Fig. 11 (B) and (C)]。

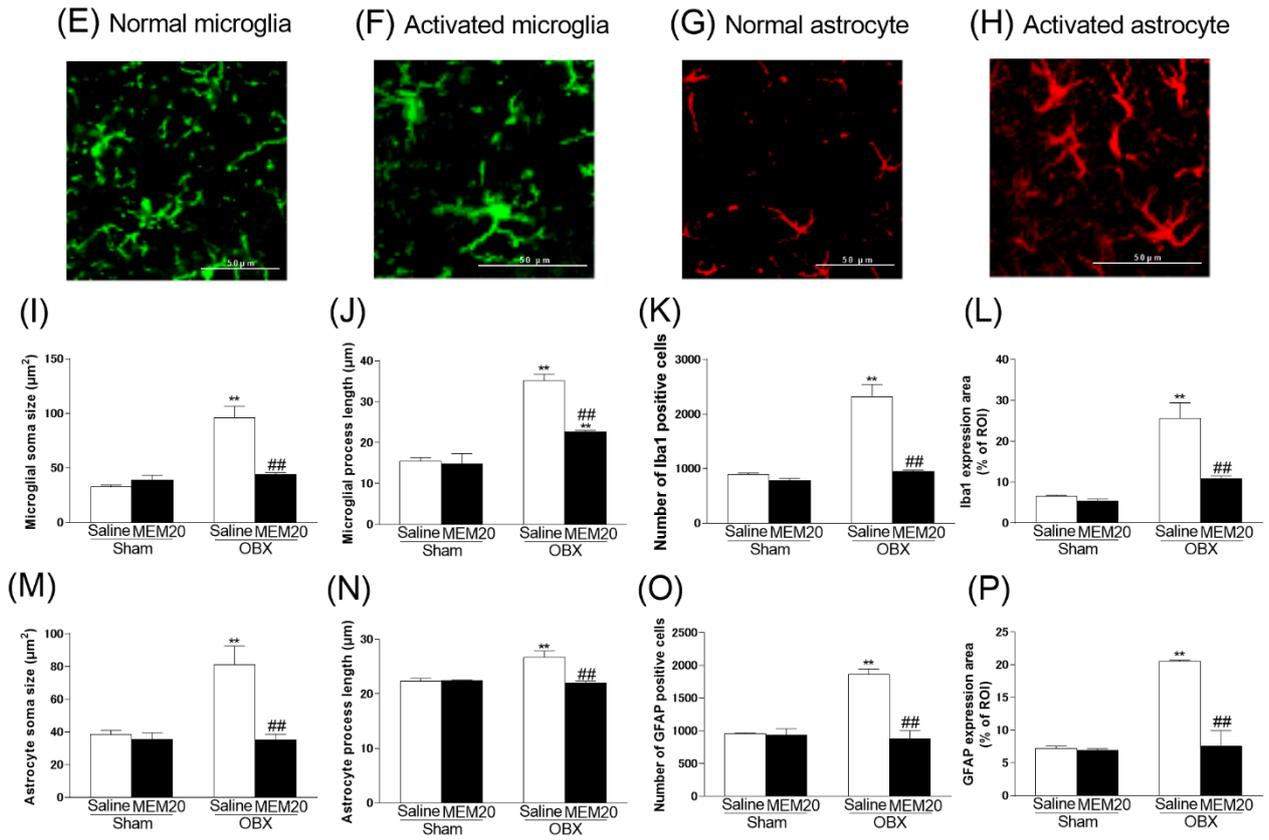


**Fig. 11 Altered DCX and NeuN levels in the hippocampus were observed after MEM administration.** (A) Representative immunoblots probed with antibodies against DCX, NeuN, and  $\beta$ -actin, as indicated. (B and C) Quantification of normalized values of DCX and NeuN levels with  $\beta$ -actin. Bars represent means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  vs. saline-treated sham group, #  $p < 0.05$  vs. saline-treated OBX group (n = 5-6 per group).

### 3.8. Memantine 慢性投与による海馬グリア細胞への影響

OBX 動物におけるうつ様行動には海馬におけるミクログリア活性化に起因した神経炎症が関係しているという報告がある (Rinwa and Kumar, 2013)。グリア細胞はうつ病に関係している BDNF やグルココルチコイド、モノアミン神経系に影響を与えている (Färber et al., 2005; Ros-Bernal et al., 2011; Gomes et al., 2013; Yirmiya et al., 2015; Milior et al., 2016) ことから、次にグリア細胞であるミクログリア並びにアストロサイトの海馬における分布及び形態的な変化に関して共焦点レーザー顕微鏡を用い、発現量の変化に関しては Western blotting 法を用いて検討を行った。Saline 処理した OBX マウスの海馬 Iba1 並びに GFAP 陽性細胞数、細胞体の大きさ、突起の長さ及び細胞密度は Sham マウスと比較し有意に上昇し、MEM 20 mg/kg の慢性投与により有意にそれらは抑制された [Fig. 12 (A)-(B) and (E)-(P)]。また Saline 処理した OBX マウスの海馬 Iba1 並びに GFAP の発現レベルは Sham マウスと比較し有意に上昇し、MEM 20 mg/kg の慢性投与により有意に抑制された [Fig. 12 (C) and (D)]。

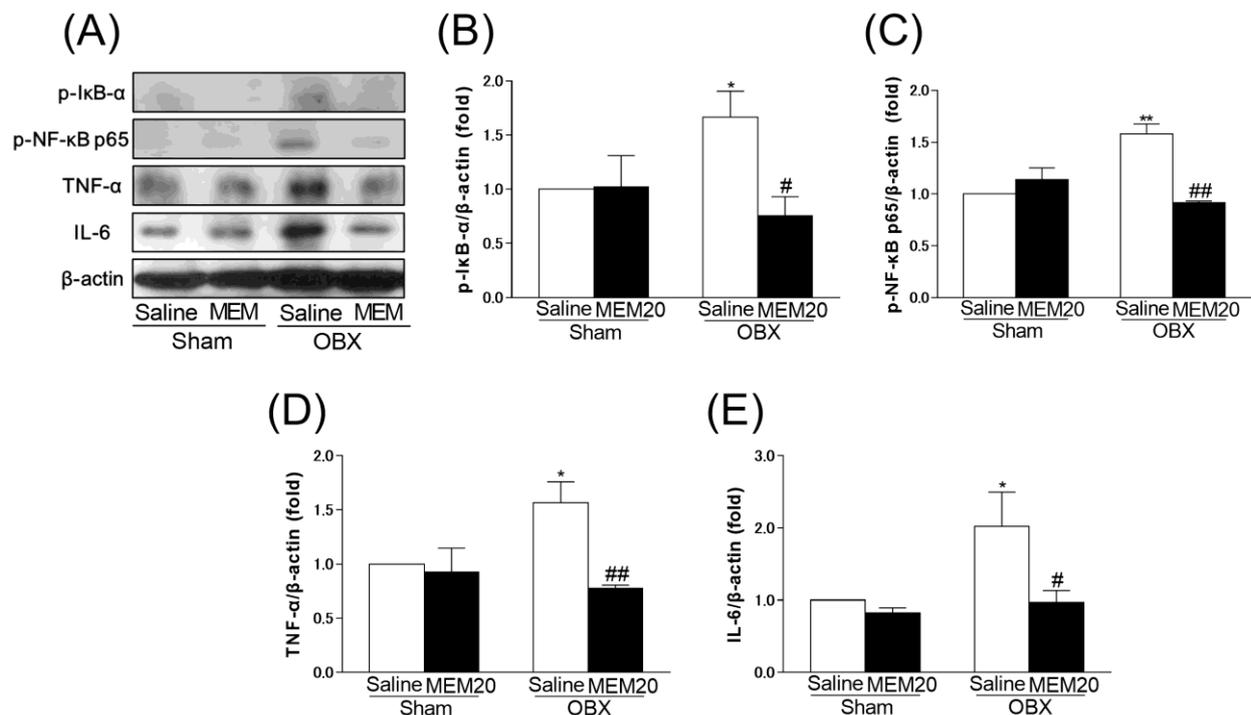




**Fig. 12 Effects of MEM on microglia and astrocyte activation in the hippocampus of OBX mice.** (A and B) Microscopy images of Iba1 (green), GFAP (red), and DAPI (blue) immunostaining in the hippocampus (A) and dentate gyrus (B). Altered Iba1 and GFAP levels in the hippocampus were observed after MEM administration. (C and D) Representative immunoblots probed with antibodies against Iba1 (C), GFAP (D), and  $\beta$ -actin are shown. Graphs in panels C and D indicate the quantification of the normalized values of Iba1 and GFAP levels with  $\beta$ -actin. Bars represent means  $\pm$  SEM. (E-H) Microscopy images showing normal and activated microglia (E and F) and astrocytes (G and H), as indicated. I-P: Quantification of soma size (I and M), process length (J and N), Iba1 positive cells (K), GFAP positive cells (O), and cell density in the region of interest (ROI), using representative tissue sections stained with Iba1 and GFAP antibodies. Bars represent means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  vs. saline-treated sham group, #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  vs. saline-treated OBX group (n = 3-5 per group).

### 3.9. Memantine 慢性投与による海馬における炎症性サイトカインの変化

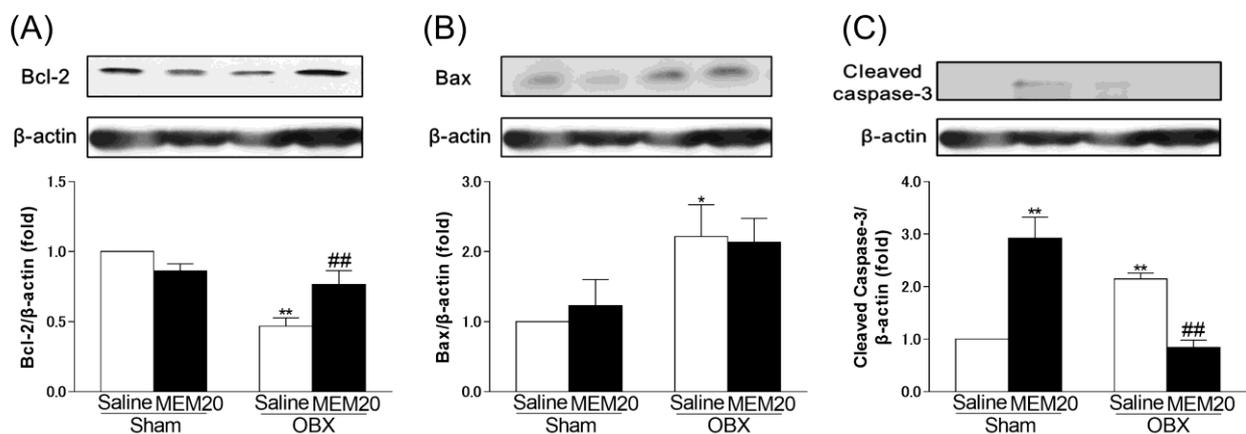
MEM の慢性投与によって海馬におけるグリア細胞の活性化が抑制されたので生理学的に意味のある形態的な変化かどうかを評価するためにグリア細胞の活性化時に発現量が増える p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-NF- $\kappa$ B p65 並びにそれに付随して分泌が促される炎症性サイトカインの IL-6 及び TNF- $\alpha$  の海馬における発現量に関して Western blotting 法を用いて評価を行った。その結果、Saline 処理した OBX マウスの海馬 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-NF- $\kappa$ B p65、IL-6 並びに TNF- $\alpha$  の発現レベルは Sham マウスと比較し有意に上昇し、MEM 20 mg/kg の慢性投与によりそれらは有意に抑制された [Fig. 13 (B)-(E)]。



**Fig. 13 Altered levels of p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in the hippocampus after MEM administration.** (A) Representative immunoblots probed with antibodies against p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$ , IL-6, and  $\beta$ -actin, as indicated. (B-E) Quantification of normalized values of p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$ , and IL-6 levels with  $\beta$ -actin. Bars represent means  $\pm$  SEM. \* p<0.05 and \*\* p<0.01 vs. saline-treated sham group, # p<0.05 and ## p<0.01 vs. saline-treated OBX group (n = 3-5 per group).

### 3.10. Memantine 慢性投与による海馬アポトーシス関連タンパクの変化

海馬における炎症性サイトカインの分泌促進が MEM 慢性投与によって抑制されたので、アポトーシス関連タンパクの変化に関して Western blotting 法を用いて検討を行った。その結果、アポトーシスを抑制する抗アポトーシス性タンパクの Bcl-2 に関しては Saline 処理した OBX マウスの海馬 Bcl-2 の発現レベルは Sham マウスと比較し有意に減少し、MEM 20 mg/kg の慢性投与によりその減少は有意に回復した [Fig. 14 (A)]。アポトーシスを促進するタンパクのうち、Bax に関しては Saline 処理した OBX マウスの海馬 Bcl-2 の発現レベルは Sham マウスと比較し有意に上昇し、MEM 20 mg/kg の慢性投与により有意な変化は見られなかった [Fig. 14 (B)]。一方で、アポトーシス誘起の最終経路に寄与している Cleaved caspase-3 の発現レベルは Saline 処理した OBX マウスにおいて Saline 処置をした Sham マウスと比較し有意に増加し、MEM 20 mg/kg の慢性投与により有意に抑制された [Fig. 14 (C)]。また、Sham マウスに MEM 20 mg/kg 慢性投与することによって Saline 処置をした Sham マウスと比較して Cleaved caspase-3 の発現レベルが有意に増加していた [Fig. 14 (C)]。



**Fig. 14 Altered Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 levels in the hippocampus after MEM administration.** (A-C) Representative immunoblots probed with antibodies against Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, and  $\beta$ -actin, as indicated. Graphs indicate the quantification of the normalized values of Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 levels with  $\beta$ -actin. Bars represent means  $\pm$  SEM. \* p<0.05 and \*\* p<0.01 vs. saline-treated sham group, ## p<0.01 vs. saline-treated OBX group (n = 4-6 per group).

## 考察

本研究では、OBX マウスのうつ様行動及び神経化学的な変化に対する MEM の効果を行動薬理的並びに免疫組織化学的な手法を用いて検討を行った。術後 6 週目における OBX マウスは、情動行動の指標となるトータルエモーションスコアの上昇並びに TST、FST での無動時間の有意な延長を示した (Figs. 4-6)。これらの結果は以前に報告されている結果と一致する (Saitoh et al., 2007; Han et al., 2009; Moriguchi et al., 2013)。情動行動試験におけるスコアの上昇並びに TST、FST での無動時間の延長は MEM の急性ではなく 4 週間慢性投与によって有意に改善されたことから、MEM の慢性投与により抗うつ作用を有する可能性を示唆した。一方で、Borre ら (2012) が以前、OBX ラットを用いて今回と同じ投与期間で MEM (20 mg/kg) 反復経口投与において検討したところ、OBX 手術前からの投与によるみ抗うつ作用が得られ、手術後から投与を開始した場合には抗うつ作用が得られなかったことを報告している。今回の実験結果と Borre らの結果の違いは投与方法や種差、測定している行動の違いが影響していると考えられる。例えば、今回行った腹腔内投与は Borre らの経口投与よりも脳への薬物の移行性が高く、投与用量は同じではあるが Borre らよりも筆者の研究の方が脳内においてより高濃度の用量で検討をしていると考えられる。また、OBX によって生じる現象にはラットとマウスでは種差が生じることが報告されている (Hendriksen et al., 2015)。うつ病患者において無快感や意欲などに関係している DA 神経系支配領域である線条体において、OBX マウスは TH レベルが有意に減少並びに DA 受容体の upregulation していることを筆者は報告しており (Takahashi et al., 2016)、その一方で OBX ラットの線条体では DA レベルが有意に増加している (Masini et al., 2004)。また、OBX マウスは FST において無動時間がより延長するといった OBX ラットにおいて認められないうつ様行動を示すことが報告されている (Han et al., 2009; Kelly and Leonard 1999)。Borre らの行動解析は精神運動遅延または攻撃性を反映している OBX 誘発性 hyperactivity に対する MEM の効果を評価しているが (Abelaira et al., 2013)、今回の実験においては気分や意欲、無気力を反映し

ている情動障害や TST 及び FST での無動時間の延長に対する MEM の効果を評価している。従って、これらの要因によって以前の報告とは異なる結果が認められたと考えられる。

行動試験のうち、FST に関しては、struggle 行動は NAd 神経系と DA 神経系が、swimming 行動は DA 神経系が関係しているという報告がある (Nikulina et al., 1991; Detke et al., 1995; Maj et al., 1997)。OBX マウスで認められる struggle 及び swimming 行動の低下が、MEM の慢性投与によって有意に改善されたことから NAd 並びに DA 神経系の寄与が考えられたので、モノアミンの律速酵素である TH レベル並びにその活性化を検討した。TH レベル並びにその活性化は OBX マウスにおいて有意に減少しており、MEM の慢性投与によってそれらの変化は有意に回復した (Fig. 7)。MEM の処置によって *in vitro* の実験系において LPS 誘発性の細胞障害による TH レベルの低下を抑制し、モノアミンの低下を抑えることが報告されている (Wu et al., 2009)。このことから、MEM が DA 並びに NAd 神経系を活性化している可能性が考えられたため、次に HPLC 法によって DA 並びに NAd とそれらの代謝物に関して定量を行った。NAd 並びに MHA、DA に関しては OBX マウスにおいて Sham マウスと比較し有意に減少していたが DA の減少のみが MEM 慢性投与によって有意に回復した (Fig. 8)。さらに、Sham マウスにおいて MEM 慢性投与により DA 並びに代謝物の DOPAC が有意に増加していた。これは MEM の慢性投与によって Sham マウスにおいて TH が活性化された影響によるものと考えられる (Fig. 8)。DA の代謝回転の指標である DOPAC/DA 並びに HVA/DA に関して算出したところ、DOPAC/DA に関しては OBX マウスで有意に増加した。これは OBX マウスにおいて脳内 MAO<sub>B</sub> 活性が上昇するという報告があることから (Nakagawasai et al., 2003b)、それが起因となって数値が上昇していると考えられる。一方で、MEM の慢性投与によって OBX マウスにおける DOPAC/DA 並びに HVA/DA が有意に抑制された。以前、我々の教室において MEM には MAO<sub>B</sub> 阻害作用並びに DA 再取り込み阻害作用を有することを報告している (Onogi et al., 2009)。従って、MEM のこれらの作用によって海馬 DA の代謝回転が阻害されて DA が増加している可能性が示唆される。

DA は神経新生において重要な役割を担っており、うつ病の治療においても注目されている (Takamura et al., 2014)。また、DA の増加は、PKA 並びに ERK1/2 両経路を活性化し (Bozzi et al., 2011)、BDNF (Finkbeiner et al., 1997) や TH (Gueorguiev et al., 2006) の遺伝子転写だけでなく神経可塑性においても重要である CREB のリン酸化を促す (Bozzi et al., 2011)。さらに、ERK1/2 経路は TH<sup>ser31</sup> のリン酸化を促し (Haycock et al., 1992)、PKA 経路は TH<sup>ser40</sup> のリン酸化を促す (Funakoshi et al., 1991) ことによって TH を活性化させることが報告されている。本実験において、OBX マウスの海馬における TH、p-TH<sup>ser31</sup>、p-TH<sup>ser40</sup>、p-PKA、p-DARPP-32、p-ERK1/2、p-CREB 並びに BDNF レベルの低下が MEM の慢性投与によって回復し、Sham マウスでは MEM の慢性投与によって p-TH<sup>ser31</sup>、p-TH<sup>ser40</sup>、p-PKA、p-DARPP-32 が有意に増加し、p-ERK1/2 に関しては増加傾向を示した ( $p = 0.08$ ) (Figs. 7 and 9)。DARPP-32 のリン酸化は DA 神経伝達の調節において重要な役割を担っており、さらに DA 神経系におけるこのタンパクのリン酸化の状態は DA 並びに cAMP によって制御されている (Walaas et al., 1983)。従って、MEM の慢性投与は OBX マウスにおいて DA の増加を促し、それに起因して PKA 並びに ERK1/2 経路のリン酸化の減少が改善され、神経新生を促す因子である BDNF の分泌を促していること並びに TH の活性化を介して 2 次的に DA が増加することが示唆される。また、Sham マウスにおいても MEM の慢性投与によって DA の増加が認められ、DA 受容体シグナル経路を介して p-ERK1/2 並びに p-PKA が増加し、p-TH<sup>ser31</sup> 並びに p-TH<sup>ser40</sup> が増加したと考えられる。

海馬歯状回の神経新生の抑制によってうつ様行動が起きること (DeCarolis and Eisch 2010) やうつ病患者の海馬が萎縮していること (Sheline et al., 1996) が報告されており、さらに抗うつ薬の慢性投与によって海馬歯状回での神経新生の促進を介して抗うつ作用を発現することが報告されている (Santarelli et al., 2003)。本実験において、神経新生や神経可塑性に関与している海馬 BDNF レベルが低下していたことから海馬歯状回での細胞増殖並びに神経細胞への分化の変化を神経化学的並びに分子生物学的手法で検討した。その結果、OBX マウスの海馬歯状回での新生細胞数は有意な減少を示し (Fig. 10)、それに付随して未

成熟神経細胞のマーカーである DCX 並びに成熟神経細胞マーカーである NeuN の発現レベルも有意に減少していた (Fig. 11)。嗅球は海馬や皮質、線条体、縫線核といった様々な脳領域から神経が投射されており、OBX によってこれらの脳領域において逆行性の神経障害が生じてその投射先の様々な機能変化が生じることによりうつ様症状を示すと考えられている (Jancsár and Leonard, 1983; Song and Leonard, 2005)。OBX 手術によって海馬歯状回において神経新生が抑制されることが報告 (Nakagawasai et al., 2016; Takahashi et al., 2017) されており、本実験においても嗅球へ投射している海馬の神経新生の抑制が確認された。OBX による海馬の神経新生の抑制は、MEM の慢性投与によって有意に回復した (Figs. 10 and 11)。前述しているが、本研究において OBX マウスにおいて海馬の神経新生を促す因子である BDNF 並びにその遺伝子発現にかかわる CREB のリン酸化の減少が MEM の投与によって改善したことから BDNF 産生促進が起因して神経新生の抑制を改善したと考えられる。これらの結果より MEM の抗うつ作用には、BDNF を介した海馬歯状回での細胞増殖促進並びに成熟神経細胞への分化が関与している可能性が示唆された。

神経炎症は哺乳類成人脳での神経新生における細胞増殖や、分化、新生神経の生存といった様々な段階に影響を与え、うつ病発症の要因の一つとして考えられている (Hashimoto, 2015; Miller et al., 2009)。うつ病患者は IL-1 $\beta$  や IL-6、TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの血中濃度の増加を示し (Howren et al., 2009; Kim et al., 2007)、抗うつ薬の服用でこの増加を弱めることが報告されていること (Maes et al., 2009) から、うつ病において、炎症とグリア細胞は密接に関係していると考えられている (Yirmiya et al., 2015)。実際、うつ病患者や自殺者の死後脳において前頭辺縁系領域におけるミクログリア細胞の形態的な変化がみられることが報告されている (Steiner et al., 2008; Schnieder et al., 2014; Torres-Platas et al., 2014; Setiawan et al., 2015)。故に、うつ病においてミクログリアの形態的な変化は重要な現象である。本実験において、OBX マウスは p-I $\kappa$ B- $\alpha$  並びに p-NF- $\kappa$ B p65 の活性化を介して海馬 TNF- $\alpha$  と IL-6 レベルが有意に増加しており、ミクログリアのマーカーである Iba1 並びにアストロサイトのマーカーである GFAP の免疫蛍光強度が強くなっていることを共焦点レー

ザ一顕微鏡並びに Western blotting 法によって確認した。Dominguez-Meijide ら (2017) は DA は活性化されたミクログリアを抑制することを *in vitro* の実験で証明している。さらに、神経とグリア細胞を含む脳初代培養細胞を用いた実験において MEM が神経保護効果を有することが報告されている (Wu et al., 2009)。これらのことから OBX マウスの海馬におけるミクログリア誘発性炎症が MEM によって抑制され (Figs.12 and 13)、MEM が抗炎症作用を介して神経保護効果を有することが示唆された。

NF- $\kappa$ B の活性化は自発的なアポトーシスと抗アポトーシス因子を制御している。抗アポトーシスタンパクの Bcl-2 とアポトーシスタンパクの Bax の発現バランスは細胞死制御の一因を担っており、Cleaved caspase-3 はアポトーシスの最終段階に寄与していることからアポトーシスの過程において重要な役割を持っている (Fiandalo and Kyprianou, 2012)。本実験において、MEM は OBX マウスでの海馬における Bcl-2 レベルの減少を回復させ、Bax には影響を与えなかった。一方で、OBX マウスでの海馬における Cleaved caspase-3 レベルの上昇は MEM の投与によって有意に抑制された (Fig. 14)。興味深いことに、本実験において MEM を投与された Sham 群で海馬における Cleaved caspase-3 レベルが上昇していた。これらの逆説的な結果はおそらく MEM を投与した Sham 群において海馬 DCX の発現レベルが上昇している一方で NeuN の発現レベルが変化していなかったことが関係している可能性がある。神経細胞の増殖とアポトーシスの不均衡は精神障害の発症に関連していることが報告されている (Genius et al., 2012)。従って、Sham マウスでの海馬における MEM 誘発性の過剰な未成熟な神経細胞は成熟した神経細胞には分化はせず、アポトーシスを引き起こすと考えられる。これらの結果から MEM は海馬内の Caspase-3 活性化並びに Bcl-2/Bax のバランスを整えることによってアポトーシスを制御している可能性が示唆された。

以上、本研究で得られた結果を総括すると、MEM の慢性投与は①海馬における MAO 阻害、DA 取り込み阻害及び TH の活性化に起因して DA レベルを増加させ、DA 受容体下流シグナル経路の活性化による BDNF 発現量増加を介した神経新生促進効果及び②活性化ミ

クログリアの抑制による炎症性サイトカイン分泌抑制と Bcl-2 発現量増加を介した神経保護効果により抗うつ作用を示す可能性を明らかにした (Fig. 15)。従って、MEM は認知障害の進行抑制のみならず情動障害や意欲の低下等の精神症状を改善する可能性がある。

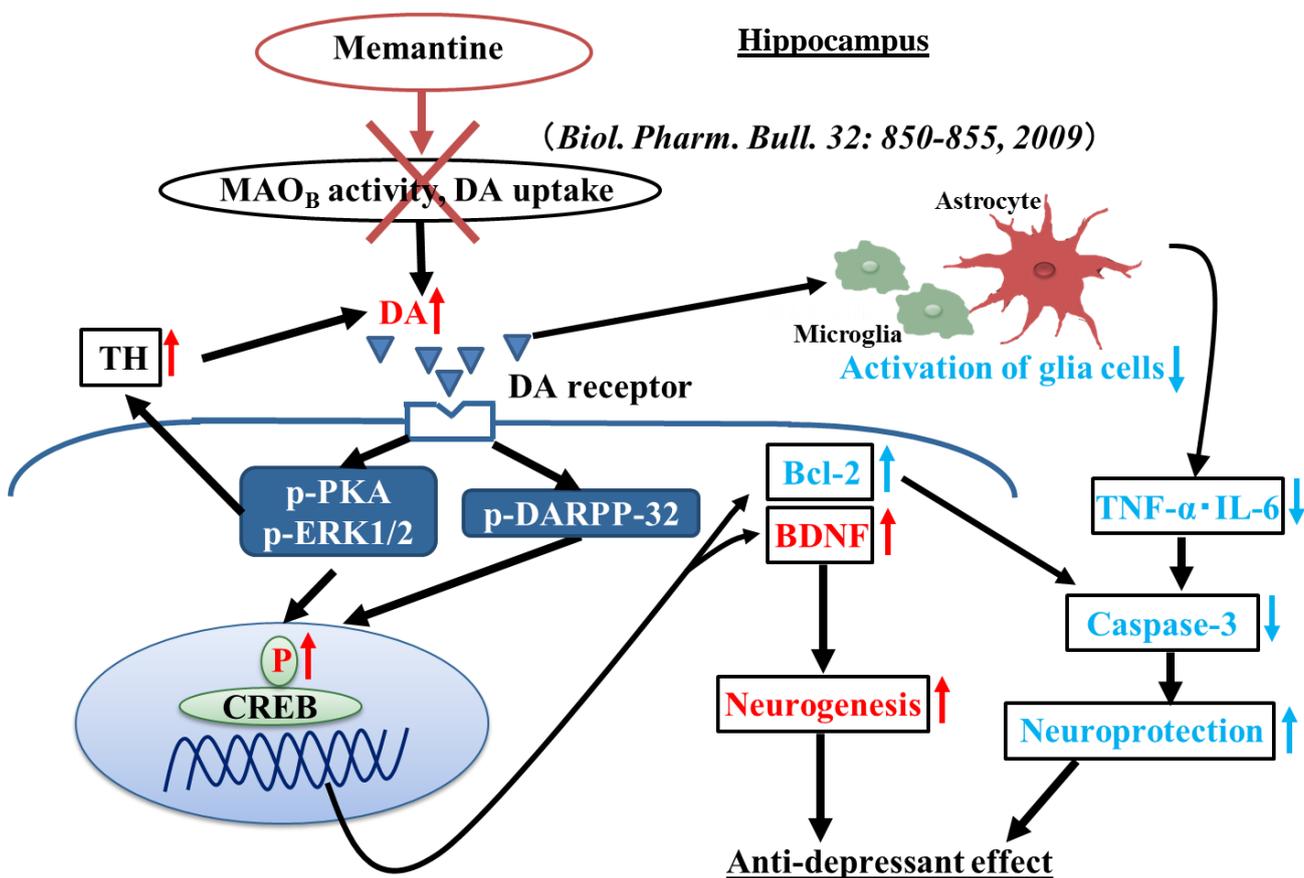


Fig. 15 Hypothesis of MEM antidepressant mechanism.

## 謝辞

本研究にあたり、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました、恩師、本学薬学部薬理学教室 丹野 孝一教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究を遂行する機会を下さった本学薬学部創薬化学教室 遠藤 泰之教授に心より御礼申し上げます。

本論文を御校閲ならびに御助言を賜りました本学機能形態学教室 溝口 広一教授に心より御礼申し上げます。

また、研究中、有益な御助言、御協力を頂きました本学薬理学教室 中川西 修准教授、八百板 富紀枝講師、根本 互助教、小平 貴代学士、佐久間 若菜学士をはじめとする薬理学教室の諸氏並びに元東京有明医療大学荒井 裕一郎先生、昭和大学久光 正先生、中澤 孝浩博士に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究の遂行にあたり御支援ならびに御協力頂きました本学薬学部薬理学教室只野 武名誉教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究中、終始御支援を賜りました本学理事長・学長、高柳 元明博士に感謝の意を表します。

## 引用文献

- Abelaira, H.M., Réus, G.Z., Quevedo, J., 2013. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr.* 35 Suppl 2, S112-20.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 22, 629–34.
- Berman, K., Brodaty, H., Withall, A., Seeher, K., 2012. Pharmacologic treatment of apathy in dementia. *Am J Geriatr Psychiatry* 20, 104-22.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., Krystal, J.H., 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry.* 47, 351-4.
- Borre, Y., Bosman, E., Lemstra, S., Westphal, K.G., Olivier, B., Oosting, R.S., 2012. Memantine partly rescues behavioral and cognitive deficits in an animal model of neurodegeneration. *Neuropharmacology.* 62, 2010-7.
- Bozzi, Y., Dunleavy, M., Henshall, D.C., 2011. Cell signaling underlying epileptic behavior. *Front Behav Neurosci.* 5, 45.
- Cayre, M., Malaterre, J., Scotto-Lomassese, S., Strambi, C., Strambi, A., 2002. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 132, 1–15.
- Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T., 2001. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry.* 50, 260-5.
- Czéh, B., Nagy, S.A., 2018. Clinical Findings Documenting Cellular and Molecular Abnormalities of Glia in Depressive Disorders. *Front Mol Neurosci.* 11, 56.

- DeCarolis, N.A., Eisch, A.J., 2010. Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation. *Neuropharmacology*. 58, 884–93.
- Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 121, 66-72.
- Dominguez-Meijide, A., Rodriguez-Perez, A.I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M.J., Labandeira-Garcia, J.L., 2017. Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain Behav Immun*. 62, 277–90.
- Ferguson, J.M., Shingleton, R.N., 2007. An open-label, flexible-dose study of memantine in major depressive disorder. *Clin Neuropharmacol*. 30, 136-44.
- Fiandalo, M.V., Kyprianou, N., 2012. Caspase control: Protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol*. 34, 165–75.
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Harris, K.M., Greenberg, M.E., 1997. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. 19, 1031–47.
- Funakoshi, H., Okuno, S., Fujisawa, H., 1991. Different effects on activity caused by phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40 by three multifunctional protein kinases. *J Biol Chem*. 266, 15614-20.
- Färber, K., Pannasch, U., Kettenmann, H., 2005. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci*. 29, 128–38.
- Genius, J., Benninghoff, J., Reuter, N., Braun, I., Giegling, I., Hartmann, A., Möller, H.J., Rujescu, D., 2012. Dysequilibrium of neuronal proliferation and apoptosis in a pharmacological animal model of psychosis. *Methods*. 56, 519-27.

- Gomes, C., Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D.I., Gonçalves, N., Cunha, R.A., 2013. Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *J Neuroinflammation*. 10, 16.
- Gueorguiev, V.D., Cheng, S.Y., Sabban, E.L., 2006. Prolonged activation of cAMP-response element-binding protein and ATF-2 needed for nicotine-triggered elevation of tyrosine hydroxylase gene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem*. 281, 10188-95.
- Han, F., Nakano, T., Yamamoto, Y., Shioda, N., Lu, Y.M., Fukunaga, K., 2009. Improvement of depressive behaviors by nefiracetam is associated with activation of CaM kinases in olfactory bulbectomized mice. *Brain Res*. 1265, 205-14.
- Hashimoto, K., 2015. Inflammatory biomarkers as differential predictors of antidepressant response. *Int J Mol Sci*. 16, 7796–801.
- Haycock, J.W., Ahn, N.G., Cobb, M.H., Krebs, E.G., 1992. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 2365-9.
- Hendriksen, H., Korte, S.M., Olivier, B., Oosting, R.S., 2015. The olfactory bulbectomy model in mice and rat: one story or two tails? *Eur J Pharmacol*. 753, 105-13.
- Howren, M.B., Lamkin, D.M., Suls, J., 2009. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*. 71, 171–86.
- Hozumi, S., Nakagawasai, O., Tan-No, K., Nijijima, F., Yamadera, F., Murata, A., Arai, Y., Yasuhara, H., Tadano, T., 2003. Characteristics of changes in cholinergic function and impairment of learning and memory-related behavior induced by olfactory bulbectomy. *Behav Brain Res*. 138, 9–15.

- Jancsár, S.M., Leonard, B.E., 1983. Behavioural and neurochemical interactions between chronic reserpine and chronic antidepressants. A possible model for the detection of atypical antidepressants. *Biochem Pharmacol* 32, 1569–71
- Kelly, J.P., Leonard, B.E., 1999. An investigation of the antidepressant properties of lofepramine and its desmethylated metabolites in the forced swim and olfactory bulbectomized rat models of depression. *Eur Neuropsychopharmacol*. 9, 101-5.
- Kelly, J.P., Wynn, A.S., Leonard, B.E., 1997. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther* 74, 299–316.
- Kim, Y.K., Na, K.S., Shin, K.H., Jung, H.Y., Choi, S.H., Kim, J.B., 2007. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31, 1044–53.
- Kishi, T., Iwata, N., 2013. NMDA receptor antagonists interventions in schizophrenia: Meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *J Psychiatr Res* 47, 1143-49.
- Krishnan, V., Nestler, E.J., 2008. The molecular neurobiology of depression, *Nature*. 455, 894–902.
- Maes, M., Yirmiya, R., Norberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B., Maj, M., 2009. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis*. 24, 27–53.
- Maj, J., Rogóż, Z., Skuza, G., Kołodziejczyk, K., 1997. Antidepressant effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *J Neural Transm (Vienna)*. 104, 525-33.
- Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 20, 9104-10.

- Masini, C.V., Holmes, P.V., Freeman, K.G., Maki, A.C., Edwards, G.L., 2004. Dopamine overflow is increased in olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. *Physiol Behav.* 81, 111-9.
- McShane, R., Areosa, Sastre, A., Minakaran, N., 2006. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* CD003154.
- Milior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., Pagani, F., Deflorio, C., Lauro, C., Alboni, S., Limatola, C., Branchi, I., Tremblay, M.E., Maggi, L., 2016. Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain Behav Immun.* 55, 114–25.
- Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L., 2009. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry.* 65, 732–41.
- Moriguchi, S., Shinoda, Y., Yamamoto, Y., Sasaki, Y., Miyajima, K., Tagashira, H., Fukunaga, K., 2013. Stimulation of the sigma-1 receptor by DHEA enhances synaptic efficacy and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of olfactory bulbectomized mice. *PLoS One.* 8, e60863.
- Nakagawasai, O., Hozumi, S., Tan-No, K., Niijima, F., Arai, Y., Yasuhara, H., Tadano, T., 2003a. Immunohistochemical fluorescence intensity reduction of brain somatostatin in the impairment of learning and memory-related behaviour induced by olfactory bulbectomy. *Behav Brain Res.* 142, 63–7.
- Nakagawasai, O., Nemoto, W., Onogi, H., Moriya, T., Lin, J.R., Odaira, T., Yaoita, F., Ogawa, T., Ohta, K., Endo, Y., Tan-No, K., 2016. BE360, a new selective estrogen receptor modulator, produces antidepressant and antidementia effects through the enhancement of hippocampal cell proliferation in olfactory bulbectomized mice. *Behav Brain Res.* 297, 315–22.

- Nakagawasai, O., Tadano, T., Arai, Y., Hozumi, S., Oba, A., Tan-No, K., Yasuhara, H., Kisara, K., Oreland, L., 2003b. Enhancement of 5-hydroxytryptamine-induced head-twitch response after olfactory bulbectomy. *Neuroscience*. 117, 1017–23.
- Nikulina, E.M., Skrinskaya, J.A., Popova, N.K., 1991. Role of genotype and dopamine receptors in behaviour of inbred mice in a forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 105, 525-9.
- Onogi, H., Ishigaki, S., Nakagawasai, O., Arai-Kato, Y., Arai, Y., Watanabe, H., Miyamoto, A., Tan-no, K., Tadano, T., 2009. Influence of memantine on brain monoaminergic neurotransmission parameters in mice: neurochemical and behavioral study. *Biol Pharm Bull*. 32, 850–5.
- Parsons, C.G., Danysz, W., Quack, G., 1999. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 38, 735-67.
- Parsons, C.G., Stoffler, A., Danysz, W., 2007. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system-too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53, 699-723.
- Pfau, M.L., Ménard, C., Russo, S.J., 2018. Inflammatory Mediators in Mood Disorders: Therapeutic Opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 58, 411-428.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 47, 379–91.
- Rajkowska, G., Stockmeier, C.A., 2013. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets*. 14, 1225-36.
- Rammes, G., Rupprecht, R., Ferrari, U., Zieglgansberger, W., Parsons, C.G., 2001. The N-methyl-D aspartate receptor channel blockers memantine, MRZ 2/579 and other amino-alkyl-cyclohexanes

antagonize 5-HT<sub>3</sub> receptor currents in cultured HEK-293 and N1E-115 cell systems in a non competitive manner. *Neurosci Lett* 306, 81–4.

Rinwa, P, Kumar, A., 2013. Quercetin suppress microglial neuroinflammatory response and induce antidepressant-like effect in olfactory bulbectomized rats. *Neuroscience*. 255, 86–98.

Ros-Bernal, F., Hunot, S., Herrero, M.T., Parnadeau, S., Corvol, J.C., Lu, L., Alvarez-Fischer, D., Carrillo-de, Sauvage, M.A., Saurini, F., Coussieu, C., Kinugawa, K., Prigent. A., Höglinger, G., Hamon, M., Tronche, F., Hirsch, E.C., Vyas, S., 2011. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 6632–7.

Saitoh, A., Yamaguchi, K., Tatsumi, Y., Murasawa, H., Nakatani, A., Hirose, N., Yamada, M., Yamada, M., Kamei, J., 2007. Effects of milnacipran and fluvoxamine on hyperemotional behaviors and the loss of tryptophan hydroxylase-positive cells in olfactory bulbectomized rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 191, 857-65.

Sanacora, G., Zarate, C.A., Krystal, J.H., Manji, H.K., 2008. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 7, 426-37.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 301, 805-9.

Schnieder, T.P., Trenevskaja, I., Rosoklija, G., Stankov, A., Mann, J.J., Smiley, J., Dwork, A.J., 2014. Microglia of prefrontal white matter in suicide. *J Neuropathol Exp Neurol*. 73, 880–90.

Setiawan, E., Wilson, A.A., Mizrahi, R., Rusjan, P.M., Miler, L., Rajkowska, G., Suridjan, I., Kennedy, J.L., Rekkas, P.V., Houle. S., Meyer. J.H., 2015. Role of translocator protein density, a

marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. *JAMA Psychiatry*. 72, 268–75.

Sheline, Y.I., Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G., Vannier, M.W., 1996. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 3908-13.

Shirayama, Y., Chen, A.C., Nakagawa, S., Russell, D.S., Duman, R.S., 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. 22, 3251-61.

Song, C., Leonard, B.E., 2005. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 627–47.

Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., Bernstein, H.G., Bogerts, B., 2008. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res*. 42, 151–7.

Takahashi, K., Murasawa, H., Yamaguchi, K., Yamada, M., Nakatani, A., Yoshida, M., Iwai, T., Inagaki, M., Yamada, M., Saitoh, A., 2011. Riluzole rapidly attenuates hyperemotional responses in olfactory bulbectomized rats, an animal model of depression. *Behav Brain Res*. 216, 46–52.

Takahashi, K., Nakagawasai, O., Nemoto, W., Nakajima, T., Arai, Y., Hisamitsu, T., Tan-No, K., 2016. Alterations in behavioral responses to dopamine agonists in olfactory bulbectomized mice: relationship to changes in the striatal dopaminergic system. *Psychopharmacology (Berl)*. 233, 1311–22.

Takahashi, K., Nakagawasai, O., Nemoto, W., Odaira, T., Arai, Y., Hisamitsu, T., Tan-No, K., 2017. Time-dependent role of prefrontal cortex and hippocampus on cognitive improvement by aripiprazole in olfactory bulbectomized mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 27, 1000–10.

- Takamura, N., Nakagawa, S., Masuda, T., Boku, S., Kato, A., Song, N., An, Y., Kitaichi, Y., Inoue, T., Koyama, T., Kusumi, I., 2014. The effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 50, 116–24.
- Thakare, V.N., Aswar, M.K., Kulkarni, Y.P., Patil, R.R., Patel, B.M., 2017. Silymarin ameliorates experimentally induced depressive like behavior in rats: Involvement of hippocampal BDNF signaling, inflammatory cytokines and oxidative stress response. *Physiol Behav*. 179, 401–10.
- Torres-Platas, S.G., Cruceanu, C., Chen, G.G., Turecki, G., Mechawar, N., 2014. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav Immun*. 42, 50–9.
- Townsend, J., Altshuler, L.L., 2012. Emotion processing and regulation in bipolar disorder: a review. *Bipolar Disord*. 14, 326-39.
- Walaas, S.I., Aswad, D.W., Greengard, P., 1983. A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature*. 301, 69–71.
- Wrynn, A.S., Mac, Sweeney, C.P., Franconi, F., Lemaire, L., Pouliquen, D., Herlidou, S., Leonard, B.E., Gandon, J., de, Certaines, J.D., 2000. An in-vivo magnetic resonance imaging study of the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Brain Res*. 879, 193-9.
- Wu, H.M., Tzeng, N.S., Qian, L., Wei, S.J., Hu, X., Chen, S.H., Rawls, S.M., Flood, P., Hong, J.S., Lu, R.B., 2009. Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial activation. *Neuropsychopharmacology*. 34, 2344–57.
- Yirmiya, R., Rimmerman, N., Reshef, R., 2015. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci*. 38, 637–58.

Zarate, C.A., Jr., Singh, J.B., Carlson, P.J., Brutsche, N.E., Ameli, R., Luckenbaugh, D.A., Charney, D.S., Manji, H.K., 2006. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry.* 63, 856-64.