

こころの健康科学研究事業

分担研究報告書

動物モデルを用いた躁うつ病の再発脆弱性に関する研究

分担研究者 加藤忠史 理化学研究所脳科学総合研究センター

精神疾患動態研究チーム チームリーダー

研究要旨: 本研究の目的は、遺伝子改変モデルマウスを用いて、躁うつ病の動物モデルを作成し、その病態を解析することである。本研究により躁うつ病のモデル動物が確立できれば、これまでの対症療法的な治療薬でなく、より本質的な病態を改善する予防薬の開発が可能となると考えられる。本年度は、昨年度作成した、ミトコンドリア遺伝子変異が蓄積するトランスジェニックマウスについて、解析を行った。

A. 研究目的

躁うつ病（双極性障害）においては、再発の繰り返しによる社会生活障害を予防することが重要であり、そのために気分安定薬が用いられるが、気分安定薬、特にリチウムは副作用が強いため、治療を中断する患者も少なくない。また、複数の気分安定薬を服用しても、病相をコントロールできない患者も多く存在する。こうしたことから、新規気分安定薬の開発が望まれるが、躁うつ病には動物モデルが存在しないため、新たな気分安定薬開発の試みはほとんど行われていないのが現状である。

本研究の目的は、遺伝子改変モデルマウスを用いて、躁うつ病の動物モデルを作成すると共に、このモデル動物の病態を解析することである。

B. 研究方法

ミトコンドリア遺伝子変異を加速させるため、マウスのミトコンドリア遺伝子複製酵素（ポリメラーゼ γ 、pol γ ）全長cDNAのMg²⁺結合部位に、D181Aという一塩基変異を導入し、その校正活性を失わせた変異体を作成した。これに、calmodulin kinase II α (CAMKII α)のプロモーターを連結したジーンコンストラクトを作成し、C57B6/Jマウスの受精卵にインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作成した。

マウス脳より、RNAおよびDNAを抽出し、変異型ポリメラーゼ γ の発現量を、ABI 7900HTを用いて、リアルタイムPCR法により定量した。mtDNA欠失は、PCR-サザンプロット法により定量した。

行動解析は、理化学研究所脳科学総合

研究センター動物実験施設において行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては、理化学研究所脳科学総合研究センター動物実験施設の倫理規程に従った。

C. 研究結果

CAMKII α -pol γ マウスは、4 系統作成できた。うち、2 系統のみで、脳内に変異型ポリメラーゼ γ の発現が確認できた。

これらのマウスにおいて、ミトコンドリア DNA の欠失を調べたところ、少なくとも 1 系統で、海馬および大脳皮質において、欠失型ミトコンドリア DNA の存在が確認された。これらの動物において、オープンフィールド試験、高架型十字迷路、長期の行動リズムなどの行動解析を施行中である。

D. 考察

校正機能を失わせたマウスポリメラーゼ γ を過剰に発現させるトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスでは実際に mtDNA 欠失が増加しており、今後躁うつ病モデルとして検討する価値があると考えられた。

E. 結論

躁うつ病モデルマウスの確立に向けて、基礎的な検討を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 加藤忠史 (2002) 躁うつ病とミトコンドリアの Ca²⁺シグナル制御機構. 医学のあゆみ 202: 1059-1061

2. 学会発表

1. 笠原和起、加藤忠史 (2002) ミトコンドリア DNA 異常が神経特異的に高頻度で蓄積する変異マウスの作製 第 24 回日本生物学的精神医学会 埼玉 2002 年 4 月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

こころの健康科学研究事業
分担研究報告書

抗うつ療法の奏功機転候補分子の機能的評価と神経可塑的变化の可視化に関する研究

分担研究者 山田 光彦 昭和大学医学部精神医学教室 講師

研究要旨： 我々はうつ病の病態と治癒機転を理解するために神経回路網の機能的および形態学的変化に注目をしている。そこで、分担研究者は抗うつ療法の奏功機転候補分子の機能的評価と神経可塑的变化の可視化に関する研究をおこなった。まずはじめに、differential cloning 法を用いてラット脳から同定した抗うつ薬関連遺伝子・EST を数百個同定し、これらをスポットした独自の cDNA microarray を作成することに成功した。次に、これらの候補遺伝子群の一部が軸索の伸展・退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターに分類されることがホモロジー解析と定量的遺伝子発現解析により明らかとすることができた。さらに、これらの候補遺伝子群が神経回路網の再編といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしていることを培養神経細胞をモデルに標的蛋白質分子およびFアクチンフィラメントの可視化による画像解析法を用いて証明した。分担研究者が行った一連の研究は、神経回路網の再編成といった神経可塑的变化における機能の検討を通して、主任研究者が行う「感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究」に寄与するものと考えられた。

A. 研究目的

我々は、differential cloning 法を用いて抗うつ薬の奏効機転に関連する遺伝子・EST を探索するプロジェクトを開始している。現在までに、約 300 個の候補遺伝子をラット前頭葉皮質から同定し、antidepressant related genes (ADRGs) と名付けて検討を進めている。これら候補遺伝子の機能別クラスタリングを試みた結果、既知遺伝子と高相同性を示した ADRG 遺伝子群の一部は、神経細胞にお

いて軸索の伸展、退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターに分類されることが明らかとなった。そのため、これらの候補遺伝子群が神経回路網の再編といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、抗うつ薬の奏効機転において神経回路網の再編が重要であるという仮説について検証を行うべく、抗うつ療法の奏功機転候補分子の機能的評価と神経可塑的变化の可

視化に関する研究を進めることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 抗うつ薬の奏効機転に関わる新規標的分子の探索

新規遺伝子を含めた探索には、蛍光試薬を用いた独自の differential cloning 法を用い mRNA レベルで調査した。候補遺伝子・EST の 2 次スクリーニングには、我々が独自に開発した ADRG microarray プロトタイプに改良を加えながら随時検討した。スライドガラス上へのスポットティングは、GMS417 Arrayer 用い、各処置群から抽出した mRNA サンプルをもとに GMS418 Scanner を用いてシグナルを検出し画像解析した。得られた cDNA 断片はジデオキシ法により塩基配列を決定し、GeneBank/ENBL のデータベースに登録されている塩基配列と FASTA 法を用いて相同性解析を行い発現プロフィールおよび機能別に分類した。

(2) 神経突起・軸索の伸展や退縮機構における ADRG の役割についての可視化技術を用いた検討

神経回路網再編成といった神経可塑的变化の関与を検討するため、神経突起・軸索の伸展・退縮調節機構に注目し可視化によるアッセイ系の構築を試みた。実際には、培養神経系細胞および神経成長因子により神経細胞用に分化させた PC12 細胞に候補 ADRG 遺伝子と GFP 遺伝子を共発現させたモデル（機能強化モデル）を用いて蛍光顕微鏡画像解析を行い、突起長及び神経突起数生じる影響を検討し

た。さらに、抗 ADRG 抗体をトランスフェクションしたモデル（機能抑制モデル）を用いて同様の検討を行った。

本年度は、まずはじめに ADRG#14 をモデルとして研究を行った。ADRG#14 抗 ADRG#14 抗体 (1:500) を導入し、Nerve Growth Factor (NGF) を 50ng/mL となるように添加した。3 日後、FITC ラベル抗ウサギ Ig G 抗体、Alexa Fluor 568 phalloidin を処置し、共焦点レーザー顕微鏡 MRC 500 で観察し、励起波長 488nm と 568nm の画像を取得した。神経突起長及び数は、NIH image 1.62 を用いて計測した。

(3) 神経伝達物質の開口放出機構における ADRG の役割についての検討

神経回路網再編成といった神経可塑的变化の関与を検討するため、シナプスにおける神経伝達物質の開口放出機構に注目したアッセイ系の確立を試みた。リアルタイム多光子レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて開口放出機構の可視化を検討するための予備的実験として、神経成長因子により神経細胞様に分化させた PC12 細胞に [3H] Noradrenaline を取り込ませ、高濃度カリウム刺激による [3H] Noradrenaline の開口放出レベルの検討を行った。実際の検討は、培養細胞に抗 ADRG 抗体をトランスフェクションしたモデル（機能抑制モデル）を用いて解析を行った。

本年度は、まずはじめに ADRG#14 をモデルとして研究を行った。抗 ADRG#14 抗体及び NGF を添加 3 日後、[3H] Noradrenaline を取り込ませた後、コント

ロールまたは High K バッファーに置換し、各時間経過後バッファーを回収した。さらに、細胞に lysis buffer を添加し細胞を破碎し、回収した。シンチレーションカウンターにより細胞より放出された、または残存する [3H] Noradrenaline 量を測定した。

C. 研究結果

(1) 抗うつ薬の奏効機転に関わる新規標的分子の探索

differential cloning 法を用いて種々の抗うつ薬を慢性投与した実験動物の脳から各薬物に共通した反応を示す新規遺伝子・EST を約 300 同定した。我々が同定した cDNA 断片には、神経情報伝達、細胞内情報伝達系に関する分子群、タンパク質折り畳み、細胞内輸送に関する分子群、細胞障害、酸化還元系に関する分子群などの既知遺伝子群とともに、熱ショック蛋白である HSC70 の新規スプライシングバリエーションや、既知の分子と相同性の低い未知の機能的分子群が多数含まれていた。さらに、これらの候補分子群の中には神経突起・軸索の伸展や退縮、神経伝達物質の開口放出機構といった神経可塑的变化に機能的に関わるものが複数存在していた。

また、ADRG microarray を用いて ECT を模した処置を負荷したラットのサンプルを解析した結果、抗うつ薬および ECT という異なる 2 種の治療法施行後に共通して発現変化する遺伝子を多数発見することに成功した。これら ADRG 遺伝子群はうつ病治療過程に共通する分子メカニズムに関与する可能性が考えられ、今後

の詳細な検討が待たる。

(2) 神経突起・軸索の伸展や退縮機構における ADRG の役割についての検討

我々がこれまでに明らかとしてきた抗うつ薬関連遺伝子 (ADRG) の一部が神経可塑性の変化 (神経突起・軸索の伸展・退縮調節等) に関与する遺伝子群に属することが明らかとなった。そこで、候補遺伝子と GFP を培養神経系細胞にトランスフェクションし強制発現させ、神経可塑的变化の可視化により、神経突起長、神経突起数を計測した。

ADRG#14 をモデルとした実験では、PC12 細胞へのタンパク導入試薬による抗 ADRG#14 抗体のトランスフェクション効率、導入 3 日後で 70~80%であった。共焦点レーザー顕微鏡下で比較観察したところ、トランスフェクタントでは、神経突起の長さは退縮し、神経突起数も減少していることが確認された。続いてこれを数値化するために、各群、120~150 の細胞について神経突起長および数を計測した。その結果、1 個の細胞における神経突起の合計の長さの平均は、対照群で $95.7 \pm 5.0 \mu\text{m}$ 、強制発現群では $56.1 \pm 3.7 \mu\text{m}$ であり、神経突起数は、対照群で 3.3 ± 0.3 、強制発現群では 2.4 ± 0.5 であり有意に減少していた。

(3) 神経伝達物質の開口放出機構における ADRG の役割についての検討

神経回路網再編成といった神経可塑的变化の関与を検討するため、シナプスにおける神経伝達物質の開口放出機構に注目したアッセイ系の確立を試みた。神経

成長因子により神経細胞様に分化させた PC12 細胞に抗 ADRG14 抗体をトランスフェクションした条件下（機能抑制モデル）において、抗 ADRG#14 抗体導入 3 日後、[3H] Noradrenaline を取り込ませ、High K 刺激により放出された [3H] Noradrenaline 量を測定した。最初に対照群における High K 刺激による経時変化を検討した結果、刺激後 10 秒で無刺激の約 1.5 倍となり、30 秒で 2 倍、その後 10 分まで一定であった。一方、抗 ADRG#14 抗体を導入した PC12 細胞では、10 秒では無刺激と有意な変化は認められず、30 秒で 1.5 倍、3 分で 2 倍となり、max に到達するまでの時間に遅れが認められた。ADRG14 は SNARE-complex に関与する可能性が高く興味を持たれる。

D. 考察

本研究において、我々は種々の抗うつ薬を慢性投与した実験動物の脳から各薬物に共通した反応を示す新規遺伝子・EST を約 300 同定した。これらの候補分子群の中には神経突起・軸索の伸展や退縮、神経伝達物質の開口放出機構といった神経可塑的变化に機能的に関わるものが複数存在していた。神経伝達物質開口放出や他の神経可塑的变化に関わる基礎研究は盛んに行われているが、ストレスやうつ病などの高次精神機能障害との関連についての報告は未だ少ない。我々の ADRG#14 をモデルとした研究の結果においては、PC12 細胞にタンパク導入試薬を用いて抗 ADRG#14 抗体を導入し、内在性の ADRG#14 の機能を抑制したところ、神経突起長及び神経突起数の減少、

神経伝達物質の開口放出の抑制が認められた。これらのことより、ADRG#14 は神経回路網の編成や神経伝達物質開口放出といった機能を有することが考えられた。今後は、Differential Cloning 法により同定した ADRG#1-204 について本研究により確立したアッセイ系を用いて、うつ病治療に関わる真のターゲット分子となり得るかを選別していく計画である。また、抗うつ薬、電気刺激療法、rTMS（経頭蓋磁気刺激療法）などの各種うつ病治療法の負荷後に候補分子の機能や発現がどのように変化するかを検討することにより、うつ病の奏効機転に関与する候補分子をより絞り込んで探索することが可能であると思われる。今回我々は、抗うつ薬関連遺伝子をスポットした独自の cDNA microarray を作成することに成功した。我々が開発した cDNA microarray は、抗うつ薬、他のうつ病治療法、種々の情動障害モデル、ストレスモデルにおける遺伝子発現変化を効率良くスクリーニングするためのできる強力なツールになると考えられた。また、本研究によって得られた機能分子を創薬ターゲットとしその機能を阻害したり修飾する化合物を新規抗うつ薬候補として開発することが可能となると考えられた。そのためには、特に興味深い候補遺伝子についてヒトホモログの塩基配列を決定することを試み、実験動物から得られた知見をヒトへと外挿していく必要があると考えられた。

E. 結論

分担研究者が行った一連の研究は、神経回路網の再編成といった神経可塑的変

化における機能の検討を通して、主任研究者が行う「感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究」に寄与するものと考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishioka G, Yamada M, Kudo K, Takahashi K, Kiuchi K, Higuchi T, Momose K, Kamijima K and Yamada M, Induction of kf-1 after repeated electroconvulsive treatment and chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex and hippocampus. *Journal of Neural Transmission*, 2003 (in press)
2. Yamada M, Higuchi T, Functional genomics and antidepressant research. *European Journal of Neuropsychopharmacol*, 12, 235-244, 2002
3. Yamada M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kudo K, Ohata H, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Yamada M, Differential expression of VAMP2/synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. *The Pharmacogenomics Journal*, 2, 377-382, 2002
4. 山田美佐, 山田光彦: 抗うつ薬作用機序における神経可塑的变化, *分子精神医学*, 3, 7-12, 2003
5. 山田光彦: 治癒機序の理解を手がかりとした抗うつ薬ゲノム創薬アプローチ, *日本精神神経学雑誌*, 2003 (in press)
6. 西岡玄太郎, 山田光彦: 気分障害の分子遺伝学的アプローチ, *精神科*, 1, 449-453, 2002

2. 学会発表

1. Takahashi K, Yamada M, Yamada M, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Expression of ndr2 after antidepressant treatment and ECT in rat brain. *Neuroscience Meeting, Orlando*, 2002
2. Kudo K, Yamada M, Hirano M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kamijima K, Momose K, Higuchi T, Yamada M, Induction of cysteine string protein after chronic antidepressant and lithium treatment in rat frontal cortex. *CINP, Montreal*, 2001
3. Yamada M, Pharmacogenomics and novel therapeutic targets for depression, *WPA, Yokohama*, 2002
4. 山田光彦, 治癒機序解明による創薬ターゲットの探索, 第106回日本薬理学会関東部会, 東京, 2002
5. 山田光彦, 治癒機序の解明による抗うつ薬の新規ターゲット分子探索, 日本神経精神薬理学会, 前橋, 2002
6. 山田光彦, 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 平野美保, 岩淵知子, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 大幡久之, 上島国利, 百瀬和享, 樋口輝彦, 抗うつ薬奏効機序関連分子としての VAMP2/synapto-brevin-2 の同定と SNARE complex について, 日本神経精神薬理

学会、前橋、2002

なし

7. 山田光彦、山田美佐、高橋弘、西岡玄太郎、工藤謙太郎、櫻井恵里子、上島国利、百瀬和享、樋口輝彦、抗うつ薬長期投与による cysteine string protein の発現変化、日本生物学的精神医学会、東京、2002
8. 工藤謙太郎、開発めぐみ、高橋弘、西岡玄太郎、平野美保、角田美果、山田美佐、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦、山田光彦、ヒト ADRG34 遺伝子をモデルとした治療抵抗性うつ病責任遺伝子多型の探索、日本精神行動遺伝学会、横浜、2002
9. 山田光彦、開発めぐみ、高橋弘、平野美保、角田美果、西岡玄太郎、工藤謙太郎、山田美佐、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦、ADRG34/kf-1 をモデルとしたうつ病治療反応性に関わる遺伝子多型の探索、日本臨床薬理学会、大阪、2002
10. 山田光彦、山田美佐、岩渕知子、高橋弘、角田美果、平野美保、西岡玄太郎、工藤謙太郎、大幡久之、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦抗うつ薬奏効機転関連分子としての frizzled-3 protein の同定と Frz/Wnt シグナリングの役割について

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案

なし

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
加藤忠史	躁うつ病とミトコンドリアのCa ²⁺ シグナル制御機構	医学のあゆみ	202	1059-1061	2002
Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, Hattori TA, Yasumatsu N, Kawato S	Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca ²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons.	J Neurochem	83	1441-1451	2002
Takata N, Shibuya K, Okabe M, Nagano T, Kojima H, Kawato S	Pregnenolone sulfate acutely enhances NO production in the rat hippocampus: digital fluorescence study using NO reactive dye.	Bioimages	10	1-8	2002
Kawato S, Hojo Y, Kimoto T	Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain.	Methods Enzymol	357	241-249	2002
川戸佳、木本哲也、高橋泰城	記憶学習機能の動的解析手法と求められる技術：脳ニューロステロイドを中心に	バイオサイエンスとインダストリー	60	404-407	2002
川戸佳、向井秀夫	ニューロステロイドによる海馬神経伝達のモジュレーション	医学のあゆみ	202	1049-1052	2002
Mi Jin, S Tanaka, Y Sekino, Y Ren, H Yamazaki, R Kawai-Hirai, N Kojima, and T Shirao	A Novel Brain-Specific Mouse Drebrin: cDNA Cloning, Chromosomal Mapping, Genomic Structure, Expression, and Functional Characterization	Genomic	79	686-692	2002
Tsuchita K, Nakayama H, Iritani S, Arai T, Niizato K, Haga C, Matsushita M, Ikeda K	Distribution of basal ganglia lesions in diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a clinicopathological study of five autopsy cases.	Acta Neuropathol	103	555-564	2002
Dickson DW, Bergeron C, Chin SS, Duyckaerts C, Horoupian D, Ikeda K	Office of rare neuropathologic criteria for corticobasal degeneration.	J Neuropathol Exp Neurol	61	935-946	2002
池田研二	痴呆性疾患の病理.	クリニカ	29	177-182	2002
Tsuchiya K, Ikeda K, Niizato K, Watabiki S, Anno M, Taki K, Haga C, Iritani S, Matsushita M	Parkinson's disease mimicking senile dementia of the Alzheimer type: a clinicopathological study of four autopsy cases.	Neuropathology	22	77-84	2002

Yokota O, Terada S, Ishizu H, Tsuchiya K, Kitamura Y, Ikeda K, Ueda K, Kuroda S	NACP/a-sunuclein immunoreactivity in diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNFC).	Acta Neuropathol	104	333-341	2002
Ikeda K	Clinical aspects of "senile dementia of tangle -type: a subset of dementia in senium separable	Review Series Dementia	2	22-24	2002
Yamada M, Higuchi T	Functional genomics and antidepressant research	European J. Neuropsychopharmacol	12	235-244	2002
Mikuni M, Kitera K, Muneoka K, Saitoh K, Yamazaki C, Majima T, Ida I and Watanabe Y,	Relationship between Vulnerability of Major Depressive Disorder and Prenatal Stress or Glucocorticoid Treatment.	Recent Advances in the Research of Affective Disorder in Japan Editors: Okuma T, Kanba S, Inoue Y		43-49	2002
Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, Suzuki K, Tanabe N, Ishii H, Mukai H, Takahashi T, Hattori T, Kawato S	Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction.	Biochim Biophys Acta	1619	301-316	2003
Terada S, Ishizu H, Yokota O, Tsuchiya K, Nakashima H, Ishihara T, Fujita D, Ueda K, Ikeda K, Kuroda S	Glial involvement in diffuse Lewy body disease.	Acta Neuropathol	105	163-169	2003
L Ferhat, M Esclapez, A Represa, A Fattoum, T Shirao and Y Ben-Ari	Upregulation of acidic calponin during dendritic spine plasticity following pilocarpine-induced seizures	Hippocampus	in press		
Nishioka G, Yamada M, Kudo K, Takahashi K, Kikuni K, Higuchi T, Momose K, Kamijima K and Yamada M	Induction of kf-1 after repeated electroconvulsive treatment and chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex and hippocampus.	J. Neural Transmission	in press		

20020847

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.47- P.48の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。