

慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬

所属 国立長寿医療センター研究所

研究者 田平 武

研究要旨 慢性ストレス負荷ラットに引き起こされるうつ病様病態の分子機構を解明する為に、前頭前野のDNAチップ解析を行い、5,000個以上の遺伝子から絞込みを行った。また、蛋白質解析の為に二次元電気泳動、TOF-MS解析及びナノLC-MS/MS解析を開始した。

分担研究者

- (1) 株式会社ツムラ中央研究所 溝口和臣
- (2) 信州大学医学部保健学科 高 昌星

A. 研究目的

本研究は、慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発生機構を分子レベルで解明し、創薬につなげるとともに、柴胡加竜骨牡蛎湯(TJ-12)の作用機序を明らかにすること、また、ストレスによる自己免疫増悪機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 実験にはWistar系雄性ラットを使用し、水浸拘束ストレスを4週間負荷した。別の動物にADXを施し、その一部の副腎摘除(ADX)動物には、コルチコステロン(CORT)ペレット(100 mg)を埋め込んだ。TJ-12は1000 mg/kgの用量で1日1回経口投与した。全ての処置終了後、前頭前野と海馬よりtotal RNAを抽出し、DNAチップ解析に用いた。DNAチップには、CodeLink UniSet Rat1(アマシャムバイオサイエンス)とAgilent rat cDNA microarray(Agilent)を用いた。

2. 上記の方法に従い、慢性ストレスを負荷し、うつ病様状態を起こしたラット脳の蛋白質発現を解析し、対照に比し増減する蛋白質の中から、柴胡加竜骨牡蛎湯による治療で正常化する蛋白質を絞り込む。

本年度は方法を確立する為に蛋白質含有量が少なく、かつ数も限られている髄液を用いて解析手法を検討した。

1) 前処理法の検討 各種カラムを用いて前処理を行い、

大量に存在する蛋白質の除去法を検討した。

2) 二次元電気泳動-銀染色法によるTOF-MS解析法の検討 資料をSDS-PAGEにより二次元展開し、銀染色を行った。銀染色の条件を設定し、TOF-MS解析可能な条件を検討した。

3) ナノLC-MS/MSによる解析法の検討 さらに、資料をナノLC-MS/MS解析する方法を検討した。

3. 6-8週齢の雌SJL/Jマウス脳内にBeAN8386株のタイラー脳脊髄炎ウイルス(TTMEV)を接種し、炎症性脱髄疾患(TMEV-IDD)を作成した。タイラーウイルス接種後30日~40日まで換気環境が良好な内径2.7cm、長さ14cmのプラスチックチューブに毎日12時間(午後9時~翌朝午前9時)安置した。タイラーウイルス接種41日後に血液を採取し、サイトカインをELISA法で測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は各研究施設の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。髄液は痴呆疾患や高齢者うつ病のバイオマーカーの検索の為にインフォームドコンセントを得て収集された検体を用いた。

C. D. 研究結果および考察

1. これまでの研究成果を踏まえ、①慢性ストレス負荷により発現が増減少する、②ADXにより内因性グルココルチコイドを除去し、GR以降の反応を遮断しても、慢性ストレス負荷の場合と同様の挙動を示す、③ADXによる発現の増減は、CORT投与によりノーマライズされる、④慢性ストレス負荷による発現の増減はTJ-12によりノーマライズされる、これらの条件を満たす遺伝子を関連遺伝子とした。

最終的に絞り込まれた遺伝子は、前頭前野に関しては、増加遺伝子では、機能既知が27個、機能未知が68個、減少遺伝子では、機能既知が66個、機能未知が177個であった。海馬に関しては、増加遺伝子では、機能既知が55個、機能未知が156個、減少遺伝子では、機能既知が89個、機能未知が268個であった。

興味深いことに、絞り込まれた遺伝子の中で、前頭前野において発現が増加していた遺伝子の中に、セロトニン type-2 受容体が含まれていた。このことは、うつ病患者の脳においてもセロトニン type-2 受容体が増加しているとの臨床報告、あるいは、本慢性ストレス負荷ラットの抑うつ状態が、セロトニン type-2 受容体アンタゴニスト作用を持つ抗うつ薬 (trazodone) により改善されるという以前の研究結果とよく一致する。また、前頭前野において発現が減少していた遺伝子の中に、glucose transporter が含まれていた。Glucose transporter は glucose を細胞内に輸送するための分子であり、細胞内にエネルギー源を供給するという重要な役割を果たす。特に脳は、glucose 要求性が他臓器と比べて格段に高く、神経細胞における glucose 利用率の低下は、様々な神経機能の低下ばかりでなく、器質障害の原因にもなる可能性が指摘されている。事実、うつ病患者の前頭前野において、glucose の利用率が低下していることが報告されており、器質障害が発生していることが疑われている。

さらに今回見出された遺伝子群は、視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA axis) の脱抑制と関連している可能性が考えられ、うつ病の本質的原因に迫れる可能性を秘めている。なぜならば、HPA axis の脱抑制がうつ病の本質的原因を表現している可能性が指摘されているからである。今後、機能未知の遺伝子を含めさらに解析を進めることで、うつ病関連遺伝子の単離、あるいは創薬ターゲットとして、大きな可能性を秘めているかもしれない。

2. 1) 各種前処理法を検討し、各種カラムにより IgG アルブミン等が除去できることが分かった。
- 2) 銀染色したゲルを切り出し、TOF-MS 解析する条件を確立した。この方法により、主たる蛋白質は同定可能となった。しかし、微量蛋白質、ペプチドについては別の条件設定が必要であった。
- 3) ナノ LC-MS/MS により 1 回の解析で 10,000 個以上の蛋

白質が半定量的に同定できるようになった。

以上、資料を前処理することにより IgG やアルブミン等大量に存在する蛋白質が除去され、少量の蛋白質が分離されるようになった。これを銀染色することによりスポットとして認識でき、TOF-MS 解析が可能となった。しかし、微量の蛋白質については、スポットとして可視化できていても、TOF-MS 解析により信号が得られなかった。そこで、より感度の高いナノ LC-MS/MS 解析を行った。この方法により 1 回で 10,000 個以上の蛋白質情報が半定量的に得られるようになった。しかし、nM オーダーで存在するアミロイドベータ蛋白 ($A\beta$) はひっかかっておらず、微量蛋白質解析にはさらに高感度化する必要があることが分かった。次年度は脳から蛋白質を抽出する方法の確立、前処理法の確立を行い、二次元電気泳動-TOF-MS 解析、及びナノ LC-MS/MS 解析を試みる予定である。また、この方法によりストレスのバイオマーカーが同定できる可能性があり、髄液検査をひき続き行うことも重要である。

3. 炎症性サイトカインである Th1 系のサイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α 、interferon (IFN)- γ および interleukin (IL)-4 は拘束性ストレス群では対照群に比し増加傾向を示した。一方 Th2 系サイトカインである IL-10 は拘束性ストレス群では低下傾向を示した。以上より拘束性ストレスは Th1 系サイトカインを増強し、Th2 系サイト間を抑制し、TMEV-IDD を増悪させる可能性が示唆された。このことは拘束性ストレスのようなストレスが Th1 系サイトカインを増強させ、MS を再発・増悪させる危険因子であることを示唆するものと考えられる。今後、ストレスにより Th1 系に傾くメカニズムを解明する必要がある。

E. 結論

1. 慢性ストレス負荷ラットの前頭前野あるいは海馬における遺伝子発現を、DNA チップを用いて網羅的に解析した。両部位で発現が変化していた遺伝子を、ADX、CORT、および TJ-12 というファクターを用いて絞り込んだ。最終的に、両部位で、機能未知の遺伝子を含む数百の遺伝子が見出された。
2. プロテオーム解析の方法を確立した。
3. ストレスは免疫系を Th1 優位に偏奇させることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

溝口和臣 Prefrontal cortex: from synaptic plasticity to cognition, Kluwer Academic Publishers, 2004

溝口和臣. 慢性ストレスによるうつ病様病態の分子メカニズムと漢方. Dementia Japan 18 (3) 2004

Mizoguchi K, Ishige A, Takeda S, Aburada M, Tabira T. Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. J Neurosci 24: 5492-9, 2004

Moon C, Ahn M, Kim HM, Lee Y, Koh CS, Matsumoto Y, Shin T. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the early and peak of autoimmune neuritis in rat sciatic nerves. Brain Research (in press)

Moon C, Ahn M, Wie MB, Kim HM, Koh CS, Hong SC, Kim MD, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T. Phenidone, a dual inhibitor of cyclooxygenases and lipoxygenases, ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes. Brain Research (in press)

Nakayama K, Nagase K, Tokutake Y, Koh CS, Hiratochi M, Ohkawara T, Nakayama N. Multiple POU-binding motifs, recognized by tissue-specific nuclear factors, are important for Dll1 gene expression in neural stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 325 (3):991-6, 2004

Ahn M, Lee Y, Moon C, Jin JK, Matsumoto Y, Koh CS, Kim HM, Shin T. Upregulation of osteopontin in Schwann cells of the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis. Neurosci Lett. 372 (1-2):137-41, 2004

Ahn M, Moon C, Lee Y, Koh CS, Kohyama K, Tanuma N, Matsumoto Y, Kim HM, Kim SR, Shin T. Activation of extracellular signal-regulated kinases in the sciatic

nerves of rats with experimental autoimmune neuritis. Neurosci Lett. 372 (1-2):57-61, 2004

Shin T, Koh CS. Immunohistochemical detection of osteopontin in the spinal cords of mice with Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. Neurosci Lett. 356 (1):72-4, 2004

Moon C, Ahn M, Jee Y, Heo S, Kim S, Kim H, Sim KB, Koh CS, Shin YG, Shin T. Sodium salicylate-induced amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is associated with the suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenases. Neurosci Lett. 356 (2):123-6, 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし