

- M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein JL, Sawamoto, K.
New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain.
Neuron.67(2):213-23. 2010
- Mirzadeh Z, Doetsch F, Sawamoto, K., Wichterle H, Alvarez-Buylla A.
The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *J Vis Exp.* (39). pii: 1938. doi: 10.3791/1938. 2010
- Sakaguchi M, Imaizumi Y, Shingo T, Tada H, Hayama K, Yamada O, Morishita T, Kadoya T, Uchiyama N, Shimazaki T, Kuno A, Poirier F, Hirabayashi J, Sawamoto, K., Okano H.
Regulation of adult neural progenitor cells by Galectin-1/beta1 Integrin interaction. *J Neurochem.* 113(6): 1516-24. 2010
- Guirao B, Meunier A, Mortaud S, Aguilar A, Corsi JM, Strehl L, Hirota Y, Desoeuvre A, Boutin C, Han YG, Mirzadeh Z, Cremer H, Montcouquiol M, Sawamoto, K., Spassky N.
Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat. Cell Biol.* 12(4): 341-350.2010
- Kojima, T., Hirota, Y., Ema, M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., Sawamoto, K.
Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum *Stem Cells* 28(3):545-554. 2010
- Oki, K., Kaneko, N., Kanki, H., Imai, T., Suzuki, N., Sawamoto, K., Okano, H.
Musashi1 as a marker of reactive astrocytes after transient focal brain ischemia *Neurosci. Res.* 66(4): 390-395, 2010
- (和文)
黄誌恵、廣田ゆき、澤本和延.
繊毛の構造と機能.
細胞 印刷中
- 太田晴子、匹田貴夫、祖父江和哉、澤本和延.
脳卒中の再生医療に向けて.
循環器内科 68(4): 393-397, 2010.
- 金子奈穂子、澤本和延.
成体脳を移動する新生ニューロンは周囲のアストロサイトの形態を制御することにより移動経路を形成・維持している.
ライフサイエンス新着論文レビュー
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/882>
- 廣田ゆき、澤本和延
中枢神経系における繊毛の機能
小児の脳神経 35(1): 11-14, 2010.
- 2.学会発表
金子奈穂子, 原晃一, 安達一英, 武藤淳, 井上賢, 伊藤豊志雄, 吉田一成, 岡野栄之, 澤本和延
霊長類脳梗塞モデルにおけるニューロン・グリア再生過程の解析. 第10回日本再生医療学会総会、2011.3
- Kishimoto, N., Shimizu, K., Sawamoto, K.
A Zebrafish Model to Study Adult Brain Injury and Regeneration. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会合同大会), 2010.12
- Hirota, Y., Meunier, A., Huang, S., Shimozaawa, T., Kida, Y. S., Inoue, M., Ito, T., Kato, H., Nakaya, M., Nonaka, S., Ogura, T., Higuchi, H., Okano, H., Spassky, N., Sawamoto, K.
Planar polarity of multiciliated ependymal cells on the lateral ventricular wall of mouse brain regulated by non-muscle myosin II. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会合同大会), 2010.12
- Kaneko, N., Marín, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., Rubenstein, J. L. R. Sawamoto, K.
New neurons use Slit1 to form/maintain their migration route for their rapid migration in the adult brain. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会合同大会), 2010.12
- 岸本憲人, 清水耕平, 澤本和延
ゼブラフィッシュ成魚脳におけるニューロンの産生と移動. 第9回成体脳のニューロン新生懇談会, 2010.11
- 澤田雅人, 金子奈穂子, 稲田浩之, 和氣弘明, 加藤康子, 柳川右千夫, 小林和人, 根本知己, 鍋倉淳一, 澤本和延
感覚入力による嗅球糸球体新生ニューロンの定着と除去の時空間的制御. 第9回成体脳のニューロン新生懇談会, 2010.11
- Kaneko, N., Marín, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., Rubenstein, J.L.R., Sawamoto, K.
New neurons form and maintain their path of astrocytic processes for rapid migration in

- the adult brain. Neuro2010 (第33回神経科学大会、第53回日本神経化学会大会、第20回日本神経回路学会大会), 2010.9
- Kako, E., Kaneko, N., Takebayashi, H., Ikenaka, K., Hida, H., Sobue, K., Togari, H. Fate mapping and time-lapse imaging of Oligo2-expressing oligodendrocyte progenitors generated in the neonatal brain after hypoxia/ischemia. Neuro2010 (第33回神経科学大会、第53回日本神経化学会大会、第20回日本神経回路学会大会), 2010.9
- Hirota, Y., Meunier, A., Huang, S., Shimosawa, T., Kida, Y. S., Inoue, M., Ito, T., Kato, H., Nakaya, M., Nonaka, S., Ogura, T., Higuchi, H., Okano, H., Spassky, N., Sawamoto, K. Planar cell polarity of multiciliated ependymal cells regulated by non-muscle myosin II. Neuro2010 (第33回神経科学大会、第53回日本神経化学会大会、第20回日本神経回路学会大会), 2010.9
- Kishimoto, N., Shimizu, K., Sawamoto, K. Injury-induced Activation of Cell Proliferation and Migration in the Adult Zebrafish Telencephalon. Neuro2010 (第33回神経科学大会、第53回日本神経化学会大会、第20回日本神経回路学会大会), 2010.9
- Sawada, M., Kaneko, N., Inada, H., Wake, H., Kato, Y., Yanagawa, Y., Kobayashi, K., Nemoto, T., Nabekura, J., Sawamoto, K. The spatio-temporal context for turnover of an adult-born interneuron subtype revealed by in vivo two-photon laser ablation. 成体嗅球介在ニューロンの入れ替わりにおける時間的・空間的特徴の解析. Neuro2010 (第33回神経科学大会、第53回日本神経化学会大会、第20回日本神経回路学会大会), 2010.9
- Kishimoto, N., Alfaro-Cervello, C., Shimizu, K., Garcia-Verdugo, J.M., Sawamoto, K. The Cellular Composition of the Ventricular Zone and Neuronal Migration in the Adult Zebrafish Telencephalon. 第43回日本発生生物学会大会年会, 2010.6
- 金子奈穂子, Martin, O., 小池正人, 廣田ゆき, 内山安男, Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., 岡野栄之, Rubenstein, J.L., 澤本和延 新生ニューロン-アストロサイト相互作用によるニューロン移動経路の形成・維持機構. 日本分子生物学会第10回春季シンポジウム, 2010.6
- 加古英介, 金子奈穂子, 森永智也, 竹林浩秀, 藤田義人, 祖父江和哉, 澤本和延 未熟児・先天性心疾患児におけるオリゴデンドロサイトの脆弱性. 日本麻酔科学会第57回学術集会, 2010.6
- (招待講演等)
- 澤本和延 脳室下帯に内在する神経再生機構とその制御. 第10回日本再生医療学会, シンポジウム「神経再生医療の最前線」, 2011.3
- Sawamoto, K. Stem Cells & Regeneration. 理研BSIチュートリアルシリーズ2010, 2010.12
- Sawamoto, K. Cell polarization and migration in the postnatal brain. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会), シンポジウム Determination and Disruption of Polarity in Cell and Tissue Morphogenesis, 2010.12
- 澤本和延 脳に内在する神経再生機構. 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所開催セミナー, 2010.11
- 澤本和延 Directional ciliary beating and CSF flow on the developing ventricular wall 6th INTERNATIONAL ACADEMY OF PERINATAL MEDICINE (IAPM), シンポジウム International Symposium on Fetal Neurology (ISFN), Keynote Lecture, 2010.10
- 澤本和延 Migration of new neurons towards the injured brain tissue. 第51回日本神経学会総会(日本神経化学会との合同シンポジウム), シンポジウム7”The Forefront of Regenerative Medicine Research”, 2010.5
- H.知的財産権の出願・登録状況
- 1.特許取得
なし
 - 2.実用新案登録
なし
 - 3.その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

霊長類モデルを用いたインターフェロン治療における幹細胞機能の変化と
うつ病発症に関する基礎研究

研究分担者 金子 奈穂子 名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野・助教

研究要旨

インターフェロン(IFN)は抑うつをはじめとする精神症状を惹起し、これらの有害作用は治療完遂の妨げとなっているが、そのメカニズムは不明である。近年、成体脳に存在する神経幹細胞・新生ニューロンの機能と抑うつ状態との関連が示唆されており、我々はこれまでに、げっ歯類脳においてIFNが神経幹細胞・前駆細胞の増殖を抑制することを見いだした。本研究では、IFNの神経幹細胞・前駆細胞機能への影響を、IFNを長期投与した霊長類モデルを用いて検証し、抑うつ行動との関連性を解析する。

A.研究目的

IFNは抗ウイルス薬として慢性ウイルス性肝炎治療において重要であるが、高頻度に抑うつ状態を惹起し、これらは治療完遂の妨げとなっている。しかしその発症メカニズムは不明である。

近年、発達期を終えた成体脳にも神経幹細胞が存在することが明らかになった。これらが産生した新生ニューロンは神経の可塑性・再生に寄与し、精神症状との関連も示唆されている。我々はこれまでに、IFN- α がげっ歯類の海馬において神経幹細胞・前駆細胞の増殖を抑制することを明らかにしており(Kaneko et al, 2006)、この作用は抑うつ状態の誘発と関連するものであると考えられる。

霊長類脳とげっ歯類では、脳の基本構造は非常に類似しているが、多くの差異も認められる。そこで本研究では、霊長類であるコモンマーモセットを用い、神経幹細胞機能へのIFNの作用を明らかにする。またマーモセットは個体間接触に富んだ高い社会性を有し、精神症状の観察に非常に有用であるため、本研究では行動学的解析も並行して行う。

B.研究方法

成体マーモセットに活動量持続計測装置を装着して経時的活動量測定を開始し、1週間基礎活動量の計測を行った後、ヒトPEG-IFN α を1週毎に4週間投与した。対照群としては溶媒である酢酸緩衝液を同様に投与した。各群2個体を実験に用いた。

海馬歯状回の神経幹細胞は、分裂を繰り返

して歯状回ニューロンを持続的に産生している。神経幹細胞のニューロン新生能を解析するため、増殖細胞の核内に取り込まれるBrdUをIFN投与開始から10日間にわたって腹腔内投与して新生細胞を標識し、IFN投与終了後に灌流固定を行った。これらの脳切片を用いた免疫組織学的解析により神経幹細胞のニューロン新生能の評価を行うとともに、IFN投与期間中の活動量の経時的变化の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本実験は名古屋市立大学動物実験規定に基づき行ったものである。

C.研究結果

BrdUを用いて標識した新生細胞のニューロンへの分化・海馬歯状回における分布を、固定脳切片の免疫染色法によって解析した。PEG-IFN α 投与群では、新生ニューロンが供給される顆粒細胞層において、BrdU標識された新生細胞数が顕著に減少していた。

次にこれらの細胞のニューロンへの分化を調べるために、成熟ニューロン(NeuN)・幼若ニューロン(Dcx)のマーカールとBrdUとの共染色を行い、海馬歯状回における新生ニューロンの分布・成熟過程を調べたところ、PEG-IFN α 投与群では歯状回内の新生ニューロン数が約40%減少しており、新生細胞中のニューロンへ分化した細胞の割合も低下していた。これらの結果は、PEG-IFN α が海馬歯状回の神経幹細胞によるニューロン新生を抑制することを示唆している。

活動量持続測定による行動学的変化の解

析においては、PEG-IFN α 投与群で昼・夜ともに活動量が低下する傾向が見られた。この傾向は投与第3週をピークとし、PEG-IFN α 投与期間中持続していた。

D. 考察

本年度の実験により、PEG-IFN α が霊長類脳においても神経幹細胞によるニューロン産生を抑制することが明らかになった。この変化について、神経幹細胞の増殖能の低下・新生細胞のニューロンへの分化の障害など複数の原因が考えられ、今後これらを明らかにする必要がある。げっ歯類モデルにおいて、IFN 投与により神経前駆細胞の減少・増殖抑制やグリア細胞の活性化が示唆されており、同様の現象が霊長類モデルにおいても生じているのか、次年度において検討を行う。

また活動量の経時的変化の測定により、PEG-IFN α 投与が段階的・持続的に活動量を低下させる傾向が明らかとなり、IFN が霊長類においても抑うつなどの精神神経学的異常を惹起する可能性が示唆された。マーマセットは社会性が高く個体間の接触に富んでおり、今後霊長類に特徴的な行動の評価法の検討が必要である。一般に行動学的解析は個体差が大きく、次年度はさらに実験個体数を増やして検討を行っていく。

E. 結論

霊長類を用いて PEG-IFN α 投与モデルを作製して行動学的・脳組織学的解析を行い、神経幹細胞のニューロン新生機能の低下・行動学的変化を検出することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu J, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein J & Sawamoto K. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 67: 212-223 (2010).
- 2) Sawada M, Shi-hui Huang, Yuki Hirota, Kaneko N & Sawamoto K. Neuronal migration in the adult brain. *Neurogenesis in the adult brain*, Springer, in press.
- 3) Kaneko N, Kako E & Sawamoto K. Prospects and Limitations of Using Endogenous Neural Stem Cells for Brain Regeneration. *Genes*, 2:

107-130 (2011).

- 4) 金子奈穂子 「成体脳内で産生され長距離を移動する新生ニューロンとアストロサイトの相互作用」 *神経化学: in press*.
- 5) 金子奈穂子 「成体脳におけるニューロングリア相互作用と新生ニューロンの移動制御機構」 *Nagoya Medical Journal: in press*.
- 6) 金子奈穂子 「グリア細胞との相互作用による新生ニューロンの移動制御機構」 *再生医療* 10: 45-51 (2011).
- 7) 金子奈穂子・澤本和延 「成体脳を移動する新生ニューロンは周囲のアストロサイトの形態制御によって自らの移動経路を形成・維持している」 *ライフサイエンス新着論文レビュー* (2010).

2. 学会発表

【招待講演】

- 1) 金子奈穂子 「グリアとの相互作用による新生ニューロンの移動制御と傷害脳の再生過程の解析」平成22年度名古屋市立大学医学会総会・名古屋市立大学医学会賞受賞記念講演 (2010)
- 2) 金子奈穂子 「アストロサイトとの相互作用による新生ニューロン移動経路の形成・維持機構」第9回成体脳のニューロン新生懇談会、東京医科大学 (2010)
- 3) 金子奈穂子 「精神疾患と神経幹細胞の機能」星薬科大学認定薬剤師研修制度講演会シリーズ第2回講座「科学的根拠に基づくファーマシューティカルケアの実践を目指して」、星薬科大学 (2010)
- 4) Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein J & Sawamoto K. Dynamic interaction of migrating neurons with glial cells in adult brain. 第2回日本再生医療学会 Young Investigator's Award 受賞者講演, 第9回 日本再生医療学会総会, 広島国際会議場 (2010)

【一般口演】

- 1) 金子奈穂子, 原晃一, 安達一英, 武藤淳, 井上賢, 伊藤豊志雄, 吉田一成, 岡野栄之,

澤本和延 「霊長類脳梗塞モデルにおけるニューロン・グリア再生過程の解析」第10回日本再生医療学会総会, 京王プラザホテル (2011)

2) Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein J & Sawamoto K. New neurons form and maintain their path of astrocytic processes for rapid migration in the adult brain. 第53回日本神経化学学会大会, 神戸国際会議場 (2010)

3) 金子奈穂子, Marin O, 小池正人, 廣田ゆき, 内山安男, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, 岡野栄之, Rubenstein J & 澤本和延「成体脳内を移動する新生ニューロンの Slit1 分泌を介した移動経路維持メカニズム」第33回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場 (2010)

4) 金子奈穂子, Marin O, 小池正人, 廣田ゆき,

内山安男, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, 岡野栄之, Rubenstein J & 澤本和延「グリアとの相互作用による新生ニューロンの移動制御と傷害脳の再生過程の解析」平成22年度名古屋市立大学医学例会 (2010)

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

成体神経幹細胞における ATP の役割

研究分担者 岡野栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室・教授

研究要旨

成体哺乳類動物におけるニューロン新生と抗うつ薬の効果との関連が明らかになり、うつ病発症の機序解明を目指し、成体ニューロン新生の制御メカニズムの解明が望まれてきた。研究分担者らは、ATP, ATP antagonist である suramin を脳室へ浸透圧ポンプを用いて持続的に投与することにより、ATP が神経前駆細胞の増殖を制御していることを明らかにした。また、受容体の発現解析により、神経前駆細胞に受容体として P2Y1 レセプターが発現していることを明らかにし、P2Y1 レセプター特異的な antagonist である MRS2179 を脳室へ持続的に投与することにより、ATP による増殖が P2Y1 レセプターを介していることを明らかにした。以上の結果から、うつ病発症機序の解明に向け、ATP の担う生理的意義についての検討の価値が見出された。

A.研究目的

「哺乳類の中樞神経系は一度損傷を受けると二度と再生しない」というセントラルドグマは、ヒトを含む成体哺乳類動物の脳における神経幹細胞の存在、そして生涯にわたるニューロン新生の発見によって覆された。近年になり、既存の抗うつ薬(SSRI)が海馬・歯状回に存在する神経前駆細胞を標的として成体ニューロン新生を亢進し、抗うつ効果を発揮することが報告された。この知見から、神経前駆細胞からニューロンへの分化を制御するメカニズムの解明が、うつ病の発症のメカニズムの解明に直結するものと期待される。

ATP は生体エネルギーとして機能することがよく知られているが、細胞外に放出され細胞外シグナルや神経伝達物質として細胞増殖、細胞移動、神経活動など様々な機能を果たしている。また、うつ病では、脳の糖代謝が正常より低くなり、ATP の濃度も低くなる。これらの知見から、うつ病において細胞外シグナルとして働く ATP の機能異常が起こっている可能性が示唆される。しかしながら、生体内における ATP の神経前駆細胞に対する機能、およびその分子メカニズムについては不明な部分が多い。そこで研究分担者らは、ATP に着目して成体ニューロン新生を司るメカニズムを解明することを試みた。

B.研究方法

生体における ATP の機能を明らかにするため、浸透圧ポンプを用いて ATP および ATP antagonist である suramin を脳室へ持続的に投与し、BrdU による増殖細胞の標識と、細胞増殖および分化マーカーの発現解析により、成体マウス側脳室下帯でのニューロン新生への ATP の影響を生理食塩水投与マウスとの比較により評価した。

また、ATP の作用機序を明らかにするために、プリン受容体の発現解析、受容体特異的な antagonist の投与により、ATP の神経前駆細胞への作用機序の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した実験動物の取り扱いは全て慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認の下に行われた。

C.研究結果

ATP 投与マウス群では BrdU 陽性の増殖細胞数が生理食塩水投与群に比べ、有意に増加していた。一方、ATP antagonist である suramin 投与群では BrdU 陽性細胞が生理食塩水投与群に比べ有意に減少していた。分化マーカーの染色により、神経前駆細胞の増殖が ATP により亢進し、ATP antagonist により減少することが確認された。以上のことから ATP は成体において神経前駆細胞の増殖を制御することが明らかとなった。

神経前駆細胞におけるプリン受容体の発現解析の結果、神経前駆細胞には P2Y1 レセプターが高発現していることが確認された。

また、P2Y1 レセプターの特異的な antagonist である MRS2179 を投与したマウス群では、suramin 投与群と同様に神経前駆細胞の増殖が抑制されることが分かった。以上のことより成体マウス側脳室下帯において ATP は P2Y1 レセプターを介して神経前駆細胞の増殖を制御していることが明らかとなった。

D. 考察

本研究により、ATP が成体ニューロン新生を制御する因子の一つであることが証明された。*in vivo*において ATP が成体のニューロン新生に影響することから、適切なニューロン新生には細胞外の ATP 濃度が非常に重要な役割を果たしていることが示唆されるとともに、うつ病では ATP の影響により適切なニューロン新生が起こっていない可能性が推察される。SSRI の抗うつ効果と成体神経前駆細胞の関連を踏まえると、ATP がうつ病の発症機序や病態に関連している可能性があり、ATP の神経前駆細胞に対する役割を検討することは高い価値があると考えられる。現在、P2Y1 レセプターの欠損マウスを用いた解析を行っており、予備実験において欠損マウスではニューロン新生が減少していることが確認された。今後は、海馬における検討や条件付き行動解析を行うことで、成体ニューロン新生とうつ病の関連についてのさらなる基礎的知見を提供することが目標である。

E. 結論

ATP は成体マウス側脳室下帯において、神経前駆細胞の増殖を制御する細胞外シグナルの一つであった。この ATP による神経前駆細胞の増殖は P2Y1 レセプターを介していた。ATP の成体ニューロン新生に対して担う生理的意義についてのさらなる検討が、うつ病の発症機序および病態解明に貢献するものと期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H & Sawamoto K. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells*.

28(3):545-554 (2010).

- 2) Kanki H, Shimabukuro MK, Miyawaki A & Okano H. "Color Timer" mice: visualization of neuronal differentiation with fluorescent proteins. *Mol. Brain* 3: 5 (2010).

2. 学会発表

- 1) Hideyuki Okano: "Regeneration of CNS using iPS cells", 2010 SEOUL SYMPOSIUM ON STEM CELL RESEARCH, *session 8/25 (Centennial Hall, Yonsei University, Seoul, Korea)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【平成 22 年度】

【海外】

発明の名称 神経幹細胞の生存及び/又は増殖及び神経突起伸張を促進する方法並びに促進剤、神経幹細胞を含む医薬組成物、検定方法、スクリーニング方法

出願番号 アメリカ 10/571,277

特許番号 アメリカ 7785596 (2010/08/31)

出願日 2004/9/8

出願人 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、坂口昌徳、岡野ジェイムズ洋尚

水澤 英洋 (東京医科歯科大学)、石橋 哲 (東京医科歯科大学)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

出願特許

【平成 22 年度】

【国内】

発明の名称 神経幹細胞の自己複製促進剤およびその使用方法

出願番号 (出願日) 特願 2010-101415 (2010/04/26)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 並木 淳、岡野栄之

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

インターフェロニングナルによる神経幹細胞制御の解析

研究分担者 中島欽一 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
分子神経分化制御学講座・教授

研究要旨

近年、成体脳においても神経幹細胞が存在することが明らかとなり、この神経幹細胞の増殖・分化制御には、それを取り巻く微小環境（ニッチ）からのシグナルが重要な役割を果たすと考えられている。本研究では神経幹細胞と隣接して存在するミクログリアに発現する Toll 様受容体を介したシグナル伝達に着目し、神経系と免疫系のクロストークのメカニズムを明らかにする。

A.研究目的

我々の生体には様々な多分化能を有する組織幹細胞が存在し、成体脳においても神経幹細胞が存在し、恒常的にニューロン新生が起こっていることが明らかとされている。神経幹細胞の分化は様々な細胞外因子によって制御されているが、最近、自然免疫で重要な役割を担う Toll 様受容体 (TLR) ファミリー分子のうち、細胞表面に発現し LPS などに結合する TLR 2, TLR 4 及びそのアダプターとして機能するシグナル伝達因子 MyD88 が神経幹細胞の増殖・分化を制御しているとの報告がなされた (Rolls et al., *Nat cell biol* 2007)。TLR ファミリーは 10 種類ほどのメンバーから構成されるが、その多くの活性化が炎症性サイトカインであるインターフェロン (IFN) の発現誘導に至る。そこで本研究では先に報告のあった TLR2 及び TLR4 とはリガンドや局在が異なるものの、同様にその活性化によって IFN の発現が惹起される TLR7 及び TLR9 (TLR7 及び TLR9 はエンドソームに局在し、それぞれ一本鎖 RNA 及び非メチル化 DNA をリガンドとする) 遺伝子欠損マウスを用いて、生理的あるいは脳障害時においてこれらシグナル活性化の神経幹細胞の増殖・分化における役割を解析する。

B.研究方法

本年度は、生理的条件下およびカイニン酸投与 (35 mg/kg) によりてんかんを誘導した条件下における、成体マウス海馬領域での神経幹細胞の増殖抗 Ki67 抗体染色) とニューロンの細胞死 (Fluoro-Jade B による染色) を検討した。

(倫理面への配慮)

本実験は奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会の規定に基づき行ったものである。

C.研究結果

1. 生理的条件下では、成体マウス海馬領域に存在する神経幹細胞の増殖は、野生型と TLR7 遺伝子および TLR9 遺伝子をそれぞれ欠損するマウス間で顕著な差は見られなかった。
2. カイニン酸によるてんかん誘導時には、成体マウス脳海馬領域において、TLR7 遺伝子あるいは TLR9 遺伝子を欠損したマウスの方が野生型マウスと比較して多くの増殖細胞が見られた。
3. カイニン酸によるてんかん誘導時には、成体マウス脳海馬領域において、TLR7 遺伝子あるいは TLR9 遺伝子を欠損したマウスの方が野生型マウスと比較して、ニューロン細胞死が減少していた。

D.考察

今回の結果からは、1) 生理的条件下では TLR7 及び TLR9 は成体海馬神経幹細胞の増殖に影響しないこと、2) てんかん誘導時には、TLR7 と TLR9 は成体海馬神経幹細胞の増殖に抑制的に作用すること、3) てんかん誘導時には、TLR7 と TLR9 は成体海馬ニューロン細胞死に対して促進的に作用すること、が示唆された。

E. 結論

本年度の研究で、神経系細胞と免疫系細胞が成体海馬内において、TLR シグナルを介して相互作用する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muotri A R, Marchetto M C, Coufal N G, Oefner R, Yeo G, Nakashima K & Gage F H. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468: 443-446 (2010).
- 2) Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, Saito M, Kohno K, Kohyama J, Namihira M, Komiya S & Nakashima K. Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest* 120: 3255-3266 (2010).
- 3) Kohyama J, Sanosaka T, Tokunaga A, Takatsuka E, Tsujimura K, Okano H & Nakashima K. BMP-induced REST regulates the establishment and maintenance of astrocytic identity. *J Cell Biol* 189: 159-170 (2010).
- 4) Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie D C, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortiguera R, Marques-Torres M A, Nakashima K, Colak D, Gotz M, Farinas I & Gage F H. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7: 78-89 (2010).
- 5) Juliandi B, Abematsu M & Nakashima K. Chromatin remodeling in neural stem cell differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 20: 408-415 (2010).
- 6) Juliandi B, Abematsu M & Nakashima K. Epigenetics, Stem cells and Cellular differentiation. in *Handbook of epigenetics: The new molecular and*

medical genetics (ed. Tollefsbol T.O.) 315-328 (Elsevier, 2010).

- 7) Juliandi B, Abematsu M & Nakashima K. Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Dev Growth Differ* 52: 493-504 (2010).
- ### 2. 学会発表
- 〈国内学会〉
- 1) 伊藤謙治、滝沢琢己、中島欽一、神経幹細胞性質変換に伴う遺伝子座の核内配置の変動解析、第5回神経発生討論会、福井県民ホール
 - 2) 鈴木暁也、辻村啓太、中島欽一：神経幹細胞の増殖・分化におけるメチル化DNA結合タンパク質MECP2の役割、第5回神経発生討論会、福井県民ホール
 - 3) 好岡美津子、切替郁枝、中島欽一：哺乳類の中枢神経系および免疫系の相互作用による神経幹細胞の増殖・分化制御機構の解明ー中枢神経系の免疫担当細胞ミクログリアにおけるToll様受容体の観点からー、第5回神経発生討論会、福井県民ホール
 - 4) 裏山悟司、滝沢琢己、神山淳、中島欽一：Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression in embryonic stem cells (ESCs). BMB2010、神戸ポートアイランド
 - 5) 鈴木暁也、辻村啓太、中島欽一：Rett 症候群原因遺伝子産物 MeCP2 の新規機能解析。BMB2010、神戸ポートアイランド
 - 6) 武藤哲司、中島欽一：Hypoxic condition facilitates Notch-induced DNA demethylation of astrocytic genes, resulting in the enhanced astrocyte differentiation of neural precursor cells. BMB2010、神戸ポートアイランド
 - 7) 中島欽一：抗てんかん薬バルプロ酸のエピジェネティックな作用とその応用。第3回 Stroke Science Academy、ホテル日航福岡（口頭）
 - 8) 中島欽一：神経幹細胞制御におけるヒス

- トン脱アセチル化酵素阻害剤の影響とその影響. 大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪大学吹田キャンパス (口頭)
- 9) 中島欽一、Berry, J.: 抗てんかん薬バルプロ酸の神経系における良い作用と悪い作用、日本遺伝学会第 82 回大会. 北海道大学高等教育機能開発総合センター (口頭)
- 10) Berry J, Tanemura K, Abematsu M, Igarashi K, Kanno J & Nakashima, K.: Prenatal HDAC inhibition affects adult hippocampal neurogenesis. Neuro2010、神戸コンベンションセンター
- 11) 辻村啓太、鈴木暁也、深尾陽一郎、藤原正幸、中島欽一: メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2 の相互作用因子解析. Neuro2010、神戸コンベンションセンター
- 12) 佐野坂司、波平昌一、滝沢琢己、中島欽二: アストロサイト分化誘導性サイトカイン発現細胞の同定. Neuro2010、神戸コンベンションセンター
- 13) 齋藤敦、落合希実子、村上智彦、佐野坂司、中島欽一、和中明生、今泉和則: アストロサイト分化における小胞体ストレス応答の役割. Neuro2010、神戸コンベンションセンター (口頭)
- 14) 滝沢琢己、高木美智、笹岡寛敏、伊藤謙治、中島欽一: 神経活動依存性遺伝子発現の時空間制御. Neuro 2010、神戸コンベンションセンター (口頭)
- 15) 中島欽一: 発生期脳における神経幹細胞のアストロサイトへの分化能獲得および分化誘導機構. 第 50 回日本先天異常学会学術集会、淡路夢舞台国際会議場 (口頭)
- 16) 裏山悟司、滝沢琢己、堀由貴奈、神山淳、中島欽一: 胚性幹細胞における GFAP 遺伝子の発現制御機構の解析. 日本分子生物学会 第 10 回春季シンポジウム、ホテル松島大観荘
- 17) 滝沢琢己、高木美智、伊藤謙治、中島欽二: 神経活動依存性転写の時空間的制御. 第 9 回核ダイナミクス研究会、ラフォーレ修善寺 (口頭)
- 18) 辻村啓太、鈴木暁也、藤原正幸、深尾陽一郎、中島欽一: メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2 の新規相互作用因子の探索. 日本エピジェネティクス研究会 第 4 回年会、米子市文化ホール
- 19) 武藤哲司、武藤正弘、古関庸子、古関明彦、中島欽一: 成体海馬ニューロン新生における NP95 の役割. 日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会、米子市文化ホール
- 20) 中島欽一: HDAC 阻害剤を用いた神経幹細胞制御による損傷脊髄新規治療法. 日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会、米子市文化ホール (口頭)
- 21) 中島欽一: 移植神経幹細胞由来ニューロンによる脊髄損傷治療. 神経組織の成長・再生・移植研究会 第 25 回学術集会、大阪市立大学 (口頭)
- 22) Berry, J.、辻村啓太、精松昌彦、神山淳、中島欽一: The role of histone acetylation on cortical development. 第 8 回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場
- 23) 武藤哲司、中島欽一: Oxygen tension can control the DNA methylation status of GFAP promoter through Notch signaling and allows propagation and maturation of neuronal progenitor. 第 8 回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場
- 〈国際学会〉
- 1) Takiyazawa T, Takagi M, Itoh K & Nakashima K.: Spatiotemporal regulation of activity dependent genes in post-mitotic neurons. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010 (oral)
- 2) Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, Saito M, Kohno K, Kohyama J, Namihira M, Komiya S & Nakashima K.: Epigenetic regulation of transplanted neural stem cells reconstructed injured spinal cord. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010,

- San Diego, November 13-17, 2010
- 3) Sanosaka T, Namihira M, Takizawa T & Nakashima K.: Meningeal cells express astrocyte inducing cytokines in the developing mouse brain. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010
 - 4) Tsujimura K, Fukao M, Fujiwara R, Suzuki A, & Nakashima K.: Proteomic identification of co-factors for the methyl-CpG binding protein, MeCP2. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010. San Diego, November 13-17, 2010
 - 5) Urayama S, Takizawa T, Hori Y, Kohyama J, & Nakashima K.: Analysis of DNA methylation independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression in embryonic stem cells. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010
 - 6) Mutoh T & Nakashima K.: Hypoxic condition facilitates Notch induced DNA demethylation of astrocytic genes, resulting in the enhanced astrocyte differentiation of neural precursor cells in response to the astrocyte inducing cytokine LIF. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010
 - 7) Berry J, Tsujimura K, Abematsu M, Kohyama J & Nakashima K.: The effects of histone deacetylase inhibition on cortical development. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010, San Diego, November 13-17, 2010
 - 8) Sanosaka T, Namihira M, Takizawa T, & Nakashima K.: Meningeal Cells Induce Astrocyte Differentiation of Neural Stem Cells. The 29th NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010
 - 9) Mutoh T, Koseki Y, Mutoh M, Koseki H, & Nakashima K.: Np95 Regulates Astroglialogenesis in the Developing Cerebral Cortex. The 29th NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010
 - 10) Nakashima K.: Astrocyte Differentiation Mediated by Cytokines' Signaling. The 29th NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD, SHONAN VILLAGE CENTER, October 5-8, 2010 (oral)
 - 11) Nakashima K.: Neurons derived from transplanted neural stem cells reconstruct disrupted neuronal circuits in the injured mouse spinal cord. 2010 Shanghai Summer Stem Cell Symposium, Shanghai, August 9-10, 2010 (oral)
 - 12) Takagi M, Sasaoka H, Itoh K, Kimura H, Nakashima K & Takizawa T.: Spatiotemporal regulation of activity dependent gene expression in post-mitotic neurons. The 75th Cold Spring Harbor Symposium, Cold Spring Harbor, New York, June 2-9, 2010
- H.知的財産権の出願・登録状況
該当なし

抑うつ作用を有する薬剤の神経幹細胞に対する効果の検討

研究分担者 等 誠司 生理学研究所・分子神経生理部門・准教授

研究要旨

C型肝炎患者に対するインターフェロン α 長期投与後に、しばしば観察される抑うつ症状のメカニズムを明らかにするため、インターフェロン α の神経幹細胞に対する効果を検討した。成体マウス脳の脳室下層に存在する神経幹細胞を、neurosphere assay と呼ばれる培養系を用いて培養した。インターフェロン α 存在下では、神経幹細胞から形成される neurosphere の数が減少し、その自己複製能の低下が示唆された。このような効果は胎仔脳から採取した神経幹細胞では観察されなかったが、これは主にインターフェロン α の受容体の発現の差によると考えられた。発達期と成体脳とではインターフェロン α に対する感受性が異なることが示唆された。また、インターフェロン α 存在下で培養した成体脳の神経幹細胞は、分化能が低下していることが示唆され、成体脳神経幹細胞—神経細胞新生システムの修飾が、抑うつ症状の形成に関与していることが考えられた。

A.研究目的

慢性ストレスの負荷や抗うつ薬の投与が、成体脳の神経細胞新生を変動させることが広く知られるようになり、逆に成体脳の神経幹細胞およびそれから産生される新生神経細胞の数の減少が抑うつ状態の原因の1つである可能性が指摘されている。副作用として抑うつ症状を伴うインターフェロン α の、神経幹細胞に対する薬理効果を明らかにし、その分子メカニズムを解明するとともに、抑うつ症状を克服する治療戦略構築の分子細胞基盤を得ることを目的とする。

B.研究方法

マウス胎仔および成体の脳から神経幹細胞を採取し、neurosphere assay を用いて培養した。インターフェロン α/β を培養液に添加し、神経幹細胞の増殖・分化に対する影響を観察した。また、インターフェロンの直接のターゲットの1つと考えられる、脳の免疫担当細胞であるミクログリアを培養し、インターフェロンを添加して培養した培地を神経幹細胞の培養に加え、インターフェロンの間接的な効果も測定した。これらの条件下で培養した神経幹細胞の、自己複製能および分化能も併せて測定した。

C.研究結果

マウス胎仔脳から培養した神経幹細胞はインターフェロン α/β に対する(共通の)受

容体を発現しておらず、直接のターゲットとはなり得ない。また、インターフェロン α 添加のミクログリア培養上清も神経幹細胞に対して大きな効果を示さなかった。

一方、マウス成体脳の神経幹細胞はインターフェロン α/β 受容体を発現しており、インターフェロン α/β の添加によって濃度依存的に neurosphere の形成が阻害された(図

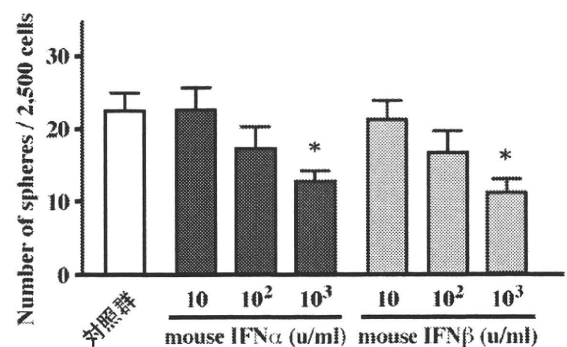


図1: インターフェロン α/β 存在下での成体脳神経幹細胞の primary neurospheres 形成能 (mean \pm s.e.m.)。*, 対照群と比べて有意な低下を示す ($P < 0.05$)。

1)。神経幹細胞の自己複製能は、形成された primary neurosphere から secondary neurosphere への継代培養によって測定されるが、インターフェロン α 存在下で培養した神経幹細胞は、自己複製能が低下していた。また、神経細胞やオリゴデンドロサイトへの分化能も、対照と比べて低下していることが明らかになった。インターフェロン α を添加

したミクログリアの培養上清は、成体脳の神経幹細胞に対しても大きな効果はなかった。

D. 考察

インターフェロン α/β は、成体脳の脳室下層に存在する神経幹細胞に直接的に作用し、神経幹細胞の自己複製能を低下させるとともに、神経細胞・オリゴデンドロサイトへの分化能を低下させる。インターフェロン α を投与されたマウスの脳内でも同様の効果があると仮定すると、成体脳神経幹細胞—神経細胞新生システムの機能低下が、抑うつ症状の形成に関与する可能性が考えられる。

E. 結論

インターフェロン α は成体脳の神経幹細胞に直接的に作用し、神経細胞の新生を減少させる。今後は、インターフェロン α を慢性投与されたマウス脳での、神経幹細胞に対する効果を検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Espinosa-Jeffrey A., Hitoshi S., Zhao P., Awosika O., Agbo C., Olaniyan E., Garcia J., Valera R., Thomassian A., Chang-Wei R., Yamaguchi M., de Vellis J., Ikenaka K. (2010) Functional central nervous system myelin repair in an adult mouse model of demyelination caused by proteolipid protein overexpression. *J Neurosci Res* 88, 1682–1694

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

インターフェロン誘発性うつ病の病態理解
－末梢 BDNF 動態から考える新たな予防・治療法の可能性－

研究分担者 鶴飼 渉 札幌医科大学医学部神経精神医学講座・講師

研究要旨

近年、うつ病の病態や薬物治療反応性における末梢血での脳由来神経栄養因子（BDNF）の量的変動の意義に関する報告が続いている。本研究では、内科学講座との共同で、インターフェロン誘発うつ病患者の血中 BDNF 動態変化の解析に取り組み、インターフェロン治療によって全ての患者で血中の BDNF が低下し、その程度が患者の抑うつ症状発現の有無と強く相関していることを明らかとした。動物実験においては、末梢血の BDNF プールである血小板からの BDNF 遊離が抗うつ薬によって促進されること、また、末梢血中の BDNF が脳内に移行し、脳実質の細胞に取り込まれることが示されたことから、血中の BDNF を増加させることによる新たなインターフェロン誘発うつ病の予防・治療法の確立につながる知見となった。

A.研究目的

近年、うつ病や統合失調症といった精神疾患の患者において、末梢血中の脳由来神経栄養因子（BDNF）の変化の報告が相次ぎ、これが疾患病態と何らかに関わる可能性が指摘されている。うつ病については、特に、血中 BDNF の低値が多く報告され、それが薬物治療反応群では健常人のレベルまで回復することが示され、病態と治療反応性の生物学的マーカーとしての有用性が種々に報告されている。しかしながら、抗うつ薬の投与がどのような機序で末梢血 BDNF を増加させるのか、また、末梢血 BDNF の増加がうつ病の病態・治療にどのような意義を持つのかについては全く不明である。今回の研究では、特にインターフェロン誘発性うつ病における血中 BDNF の動態変化を解析し、その新たな病態理解と、より適切な予防・治療法の確立につなげることを目指す。

B.研究方法

【1】血小板 BDNF 遊離と脳内移行の検討

ラット末梢血から採血し、血小板分画を得た。薬物処置/非処置下で血小板から遊離した BDNF の量について ELISA 法で比較検討した。血小板から遊離した BDNF は、血液脳関門を通過し脳内濃度と一定の相関関係にあると推測されているが、詳細については明らかではない。そこで次に、ラット静脈より蛍光標識した BDNF を直接投与し、血

中 BDNF の脳内への移行性について脳組織切片、ホモジネートを用いて解析し、血小板から遊離した BDNF が、実際に脳内に移行し直接脳細胞機能変化に結びつく可能性について検討した。

【2】ヒト血液サンプルを用いた検討

兵庫医科大学倫理委員会の承認を得、患者からは口頭での説明と書面にて同意を得た。具体的には、インターフェロン治療開始前、および投与中・投与後に採血を行い、血清 BDNF 濃度について、ELISA 法にて解析した。

C.研究結果

（1）抗うつ薬の処置によって、血中 BDNF の主要なプール先である血小板からの BDNF 遊離が濃度依存的に促進された。また、その作用は種々の抗うつ薬が共通して持つものであった。

（2）蛍光 BDNF を用いた検討で、末梢血中の BDNF が海馬歯状回領域では脳内へ移行し脳細胞に取り込まれていることを観察した。

（3）インターフェロン療法を受けた患者の血清サンプルを解析した結果、ほぼ全ての患者において、血中 BDNF がインターフェロン治療開始後に有意に低下し、そのうち、睡眠障害や頭痛、食欲不振など、何らかの抑うつ症状を発現した患者では BDNF の減少の程度が有意に高いことが判明した。

D. 考察

BDNF は、脳内だけでなく末梢血中にも存在することが知られている。近年、うつ病患者の血清 BDNF 濃度と治療反応性についての報告が多数なされ、末梢血 BDNF 濃度がうつ病の病態を反映している可能性が示唆されている。今回、我々は、末梢血 BDNF の大部分が血小板内に存在することに注目し、抗うつ薬が血小板からの BDNF 遊離を促進する効果を持つことを明らかとした。BDNF は巨核球では検出されないため、他の組織（血管上皮細胞や平滑筋）で産生されたものが血小板に取り込まれていると考えられているが、血小板から遊離された BDNF がその後体内でどのような経過をめぐりどんな機能を発揮しているのかについては全く不明である。また、末梢血 BDNF が血液脳関門（BBB）を通り、脳内で作用を示すのかどうかについても全く分かっていない。

今回の研究で、我々は、末梢血内へ投与した BDNF が、海馬歯状回領域では BBB を超えて脳内へ移行し脳の実質細胞に取り込まれていることを示した。また、インターフェロン治療開始によって血中の BDNF が低下し、その程度が患者の抑うつ症状発現と有意に相関していたことから、インターフェロンうつ病の病態と末梢血 BDNF 低下との深い関わりが推察された。

今後、インターフェロン誘発うつ病モデル動物を用いるなどして、末梢血由来の BDNF が病態を改善する効果を有するかどうかの検討を進め、末梢で BDNF を増やすことが、インターフェロン誘発うつ病を予防・治療する新たな手段になり得るかどうかについて解析を続けたいと考えている。

E. 結論

インターフェロン療法を受けた患者の血清サンプルを調べ、ほぼ全ての患者において、血中 BDNF が治療開始後に有意に低下することを明らかとした。動物実験では、末梢血内へ投与した標識 BDNF が、海馬歯状回領域で BBB を超えて脳内へ移行し、脳の実質細胞に取り込まれていることをみた。今後、末梢血中で BDNF を増加させることが、インターフェロン誘発うつ病の予防・治療の新たな手法になり得るかどうかについて検討を進めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada M, Takahashi K, Ukai W et al. Neuroserpin is expressed in early stage of neurogenesis in adult rat hippocampus. *Neuroreport*. 2010; 21(2):138-142.
- 2) Ono T, Hashimoto E, Ukai W et al. The role of neural stem cells for in vitro models of schizophrenia: neuroprotection via Akt/ERK signal regulation. *Schizophr Res*. 2010; 122(1-3):239-247.
- 3) Watanabe K, Hashimoto E, Ukai W et al. Effect of antidepressants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release from platelets in the rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34(8):1450-1454.

2. 学会発表

- 1) Watanabe K, Hashimoto E, Ukai W et al. The change of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase B (TrkB) receptor on platelet in depression. *Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum*, June 6-10, Hong Kong, 2010
- 2) 渡邊公彦, 橋本恵理, 鶴飼渉 他. 末梢 BDNF の脳内移行に関する検討. 第 32 回日本生物学的精神医学会, 10 月 7-9 日, 小倉, 2010
- 3) Saito T, Hashimoto E, Ukai W et al. The Change of Brain-Derived Neurotrophic Factor and TrkB Receptor on Platelet in Depression. *American College of Neuropsychopharmacology 49th Annual Meeting*, December 5-9, The Fontainebleau Miami Beach, Florida, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

慢性 C 型肝炎のインターフェロン療法におけるうつ病発症に関する臨床研究

研究分担者 竹内 浩 名古屋市立大学大学院医学研究科精神・認知・行動医学・講師
研究分担者 野尻 俊輔 名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学・講師
研究分担者 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学・教授

研究要旨

インターフェロン（IFN）誘発性うつ病への対策は肝炎治療研究における最重要課題の一つである。本研究は、抑うつ状態を正確に評価する精神科的構造化面接によって抑うつ症状を追跡するコホート研究である。2010 年中に名古屋市立大学病院肝・膵臓内科で IFN 療法を開始した 40 例のうち 12 週まで治療を終了した 23 例のベック抑うつ質問票第 2 版（BDI-II）変化をみた。BDI-II が 6 点以上変化したものは 8 例あり、いずれも治療 8～12 週で得点が増加する傾向にあった。うち 1 例はうつ病の既往があった。いずれも精神科的対応には至らず、内科医の対応で経過している。治療法に変化があったためうつ病の発症が減少しているか、抑うつ状態がうつ病と認識されていない可能性があると考えられた。今後の経過と構造化面接による診断の集積を待ちたい。

A. 研究目的

インターフェロン（INF）誘発性うつ病への対策は肝炎治療研究における最重要課題の一つであるが、その発症・成立メカニズムの多くは未解明であり、世界的にも十分な対策・研究は行われていない。本研究は、抑うつ状態を正確に評価する精神科的構造化面接によって、INF 療法導入時の慢性 C 型肝炎患者の抑うつ症状を追跡するコホート研究である。年齢・性別・生物学的マーカー、海馬容積等の因子との関連性の探索により、INF 誘発性うつ病の発症に影響を与える因子をあきらかにする。得られる知見は、重篤な INF の副作用の一つであるうつ病の発症メカニズム解明とその予防法、治療法の開発に不可欠なものである。

B. 研究方法

名古屋市立大学病院肝・膵臓内科にて慢性 C 型肝炎に対して INF 療法を受けるすべての患者を対象に同意を得られた症例について、1. 観察開始時：人口統計学的変数、生物学的マーカー（甲状腺機能、貧血、生体内炎症性サイトカイン（IL-1 β , IL-6, TNF- α)), 頭部 MRI（海馬体積の測定）、セロトニントランスporter 関連遺伝子多型部位、ウイルスのサブタイプおよび遺伝子変異、ウイルス量、投与する INF の種類と量、リバビリンの投与量、肝機能障害の有無（ALT,

γ -GTP 等)、随時血糖、LDL-cholesterol, AFP, KL-6、自己抗体を測定すると共に、構造化面接 CIDI(Composite International Diagnostic Interview)によって大うつ病および双極性障害の既往歴、ベースラインの大うつ病エピソードの有無を判定する。同時にベースラインの抑うつ症状、睡眠状態を自記式評価尺度で測定する。2. 抑うつ症状、睡眠状態の経時的変化：ベック抑うつ質問票第 2 版(BDI-II)およびピッツバーグ睡眠質問票(PSQI)を治療開始後 4、8、12、16、20、24、36、48 週後に測定する。3. INF 療法終了時：精神科的構造化面接(CIDI)を行い、大うつ病エピソードの発症の有無・その時期を測定する。また、治療完遂率、C 型肝炎寛解率を測定する。4. 生物学的マーカーを 0、12 週後、INF 療法終了時（24 ないし 48 週後）に測定する。

これらを解析することにより、INF 療法中の抑うつ症状の出現・変化に関連する因子を明らかにしていく。

また、ウイルス学的・ゲノムワイド関連の解析も行うために、INF 療法中の血清保存を 0、12、24 週、INF 療法終了時（24 ないし 48 週後）、終了後 24 週に行う。

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

2009 年末から名古屋市立大学病院肝・膵臓内科にて患者エントリーを開始し、IFN 療法自体は 2010 年 1 月より開始された。2010 年末までにエントリーされたのは 40 例であった。1 例のみ外国人で日本語を十分に理解できないためにエントリーとならなかった。

40 例の主なプロフィールは以下のとおりである。

性別は、男性 23 例、女性 7 例。年齢は、20 歳代 1 例、30 歳代 5 例、40 歳代 7 例、50 歳代 13 例、60 歳代 13 例、70 歳以上 1 例であった。

ウイルスのタイプと量は以下のとおりであった。

表1 ウイルスサブタイプと量

ウイルスサブタイプ		量	
		高値	低値
1	24	24	0
2	16	14	2
不明	1	1	0

治療前にうつ病の既往のあったのは 3 例であった。

治療開始前の BDI-II は、無症状 30 例、軽症 7 例、中等症 3 例であった。

これまでの研究でうつ病発症は治療開始から 12 週までが多いと言われていたので、上記 40 例のうち治療が 12 週まで終了した 23 例の BDI-II の変化をみた。その結果、抑うつ症状の有意な変化があるとする 6 点以上変化したものが 8 例あり、8~12 週で得点が上昇する傾向があった。このうち 1 例はうつ病の既往があった。

D. 考察

現在までのところ、IFN 治療中に抑うつ状態を呈する患者はあるものの、精神科的治療には至っていない。治療 8~12 週で抑うつ状態を呈することが多いが、内科医師の対応で経過している。IFN が改良されるなど治療法が変わり、うつ病発症が減少している可能性もある。一方、抑うつ状態がうつ病と認識されていない可能性もある。

E. 結論

慢性 C 型肝炎の IFN 治療によるうつ病発

症を精神科的構造化面接を用いて診断することで、うつ病発症に影響を与える因子を明らかにする臨床研究を継続している。

まだ症例数自体が少ないため、統計学的検討などもできていない。今後の経過と、精神科的構造化面接 CIDI による診断症例の集積を待ちたい。

また、抑うつ状態の変化を BDI-II で追う他施設共同研究も進行中であり、この結果も合わせて IFN 誘発うつ病の解明を進めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyaki T, Nojiri S, Shinkai N, Kusakabe A, Matsuura K, Iio E, Takahashi S, Yan G, Ikeda K, Joh T.

Pitavastatin inhibits hepatic steatosis and fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats.

Hepatol Res. in press

Kataoka H, Hayano J, Mizushima T, Tanaka M, Kubota E, Shimura T, Mizoshita T, Tanida S, Kamiya T, Nojiri S, Mukai S, Mizuno K, Joh T.

Cardiovascular tolerance and autonomic nervous responses in unsedated upper gastrointestinal small-caliber endoscopy: a comparison between transnasal and peroral procedures with newly developed mouthpiece. Dig Endosc.23(1):78-85. 2011

Naitoh I, Zen Y, Nakazawa T, Ando T, Hayashi K, Okumura F, Miyabe K, Yoshida M, Nojiri S, Kanematsu T, Ohara H, Joh T.

Small bile duct involvement in IgG4-related sclerosing cholangitis: liver biopsy and cholangiography correlation.

J Gastroenterol. 46(2):269-76. 2011

Kusakabe A, Tanaka Y, Inoue M, Kurbanov F, Tatematsu K, Nojiri S, Joh T, Tsugane S, Mizokami M.

A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan.

J Gastroenterol. 46(1):117-24. 2011

N Sakamoto, M Nakagawa, Y Tanaka, Y Sekine-Osajima, M Ueyama, M Kurosaki, N Nishida, A Tamori, Y Nishimura-Sakurai, Y Itsui, S Azuma, S Kakinuma, S Hige, Y Ito, E

Tanaka, Y Hiasa, N Izumi, K Tokunaga, M Mizokami, M Watanabe.
Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C
J Med Virol. in press.

Afdhal NH, McHutchison JG, Zeuzem S, Mangia A, Pawlotsky JM, Murray JS, Shianna KV, Tanaka Y, Thomas DL, Booth DR, Goldstein DB; Pharmacogenetics and Hepatitis C Meeting Participants.
Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in 2010
Hepatology.53(1) 336-45. 2011

Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M.
Pre-treatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors.
J Hepatol.54(3)439-448.2011

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Tokunaga K, Mizokami M.
lambda-Interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C.
Hepatology. 40(5):449-60. 2010

Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsunami H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Honda M, Ito K, Mizokami M, Watanabe M.
ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C.
Hepatology. 40(11):1063-1071. 2010

Kurbanov F, Tanaka Y, Matsuura K, Sugauchi F, Elkady A, Khan A, Hasegawa I, Ohno T, Tokuda H, Mizokami M.
Positive selection of core 70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin.
J Infect Dis. 201(11):1663-71. 2010

2.学会発表

竹内浩、古川壽亮、田中靖人、野尻俊輔：
慢性C型肝炎のインターフェロン療法におけるうつ病発症に関する臨床研究（第1報） 第23回日本総合病院精神医学会総会。2010年11月。東京。

Shunsuke Nojiri, etsuko Iio, Kentaro Matsuura, Atsunori Kusakabe, Katsuhiko Senda, Noboru Shinkai, Tomokatsu Miyaki and Takashi Joh
Albumin suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation and the cell cycle
45th Annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL).
April 14-18, 2010, Vienna, Austria.

Shunsuke Nojiri, etsuko Iio, Kentaro Matsuura, Atsunori Kusakabe, Katsuhiko Senda, Noboru Shinkai, Tomokatsu Miyaki and Takashi Joh
Noninvasive evaluation of hepatic fibrosis in HCV-infected patients using EOB-MR imaging
45th Annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL).
April 14-18, 2010, Vienna, Austria.

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得
なし

2.実用新案登録
なし

3.その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

慢性C型肝炎のインターフェロン療法におけるうつ病発症に関する臨床研究

研究分担者 今村雅俊 国立国際医療センター消化器科国府台病院・第二消化器科医長

研究要旨

インターフェロン治療における副作用のひとつであるうつ病に関しては、IL-6、IL1-β、TNFαのどのサイトカインが、直接うつ病性障害の原因になったり、睡眠障害から抑うつ状態に移行したりすることなどが考えられている。国立国際医療研究センターは、名古屋市立大学と共同で研究にあっている。インターフェロン開始より3ヶ月の経過を観察し得た6症例においてサイトカインの動向とうつ病発症の関係について検討した。

A.研究目的

インターフェロン（IFN）誘発性うつ病への対策は肝炎治療研究における最重要課題の一つであるが、その発症・成立メカニズムの多くは未解明である。本研究は「慢性C型肝炎のインターフェロン療法における幹細胞機能の変化とうつ病発症に関する基礎・臨床連携研究」の中の臨床研究として名古屋市立大学と国立国際医療研究センター（国府台病院およびセンター病院）が共同して行うものである。詳細なプロトコールについては名古屋市立大学の報告書に記載されている通りである。

今回はエントリーされた症例のうち、12週経過を観察しえた症例に関して、サイトカインとうつ病発症の関係について検討し考察した。

B.研究方法

現在まで本研究にエントリーされた症例のうち、12週経過を観察し検討できたのは6症例であった。治療開始前と12週間後に検査されたサイトカイン（IL-6、IL1-β、TNFα）の動向とうつ病発症の関係について検討し考察した。

現在本臨床研究自体については漸次進行中であるが、これについては国立国際医療研究センターの倫理審査委員会の承認を得ている。

C.研究結果

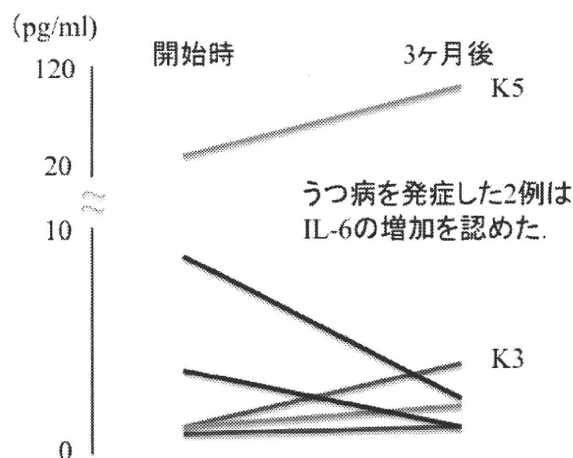
現時点で本研究にエントリーされた17症例の内訳は、男性3例女性14例。年齢は40～74歳で、70歳以上の症例が4例含まれていた。血小板数は11.5～31.3万/μl、HCV-RNAはセロタイプ1：13例、2：14例であった。ウイルス量に関しては16例が5.0LogIU/mlの高ウイ

ルス量を示し、IL28B・SNPsは全例がMajorであった（表1）。

症例	開始日	年齢	性別	ALT	Alb	PLT	log ₁₀ IU/ml	IL28B	SNPs	IL-6	IL-1β	TNFα	うつ病
K-1	May 21	65	F	86	4.4	11.5	1B	6.7	F1-2	A1	Major		
2	Jun 23	73	F	70	4.5	21.7	1B	7.0	ND		Major		
3	Jun 25	68	M	45	4.6	14.0	1B	5.8	F2	A1-2	Major		
4	July 7	53	F	26	4.6	13.7	1	6.8	ND		Major		
5	July 15	72	F	91	3.8	16.0	1B	5.9	F2-3	A2	Major		
6	July 12	54	F	29 [※]	4.4	11.6	1B	7.1	F2-3	A2-3	Major		
7	July 2	60	F	26	4.4	21.6	1B	7.1	F0-1	A1	Major		
8	Aug 6	40	F	37	4.3	23.4	2A	6.0	F1	A1	Major		
9	Aug 25	58	M	28	4.1	21.8	1	6.3	F1	A1	Major		
10	Aug 20	74	F	55	3.7	15.0	1B	6.5	F2	A1-2	Major		
11	Oct 8	64	F	60	4.6	11.7	1B	6.7	ND		Major		
12	Oct 8	60	F	36 ²	4.0	31.3	2B	7.2	F1	A2	Major		
13	Oct 22	73	F	29	3.8	14.7	1B	7.1	F2	A2	Major		
14	Nov 12	62	F	48	3.7	16.5	1B	5.7	F1	A1-2	Major		
C-1	Sep 22	40	F	55	4.6	28.7	2A	6.3	F1	A1	Major		
2	Nov 2	40	F	12	4.1	15.2	2A	4.1	ND		Major		
3	Nov 17	70	M	35	4.1	21.1	1B	6.8			結果未着	Major	

表1.エントリー17例（K-1～14は国府台病院、C-1～3はセンター病院）

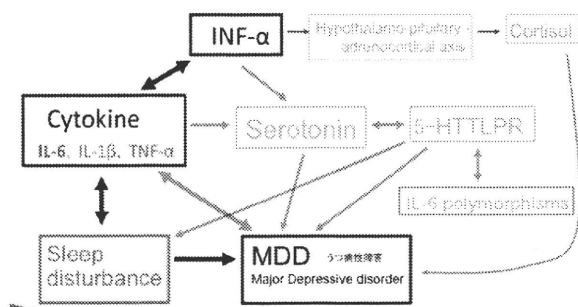
これらの症例の内、IFN投与から12週経過を追えた6例について、サイトカインの変動とうつ病発症との関連に関して検討を行った。12週間とうつ病ないし抑うつ傾向と判断されたのは2例（K3、K5）であった。



うつ病を発症していない4例との比較において、測定されたサイトカイン (IL-6, IL1- β , TNF α) のうち、IL1- β と TNF α については、投与前と12週後で優位な変化は認められなかった。しかしながら IL-6 については、うつ傾向を呈した2例はいずれも優位に増加していた。

D. 考察・E. 結論

サイトカインや神経栄養因子はセロトニントランスポーターや視床下部-脳下垂体-副腎皮質系に影響を与え、うつ病の病態と関連していると報告されている。また、血中 IL-6 濃度は健常者に比べてうつ病群で高いとの報告もあり、今回の12週間の検討でもこれを裏付ける結果であった。



治療開始から早い段階で IL-6 が増加してくる症例に関しては、うつ病発症のリスクが高いと考え、早期に精神科的診療を受けることで発症を予防できる可能性が示唆された。今後、症例および観察期間を増やしてさらに検討していく必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし