

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 が神経前駆細胞など成体神経新生に関わる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、また P2Y1 ノックアウトマウスにおいて神経前駆細胞の増殖が減少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・受容体ノックアウトマウスの解析を行った。

(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 投与マウス群では増殖速度の速い細胞を BrdU によって標識する手法を用いた場合、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、この手法により BrdU 標識された細胞に神経前駆細胞が含まれており、それらの増殖が 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を含む増殖速度の速い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を含む増殖速度の速い細胞の増殖が抑制され、P2Y1 ノックアウトマウスにおいてこれらの細胞増殖が減少していることが分かった。さらに P2Y1 ノックアウトマウスでは ATP を投与しても細胞増殖は促進されなかった。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などの細胞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。

これらの研究は *Journal of Neuroscience* に現在投稿中である。今後さらに、成体脳における ATP 代謝と神経新生の関連性の検討や条件付き行動解析をすることで、成体ニューロン新生とうつ病の関連について、さらなる基礎的知見が得られるのではないかと考えている。

E. 結論

ATP は成体マウス側脳室下帯において、神経前駆細胞を含む増殖速度の速い細胞の増殖を制御する細胞外シグナルの一つであった。ATP によるこれらの細胞増殖は P2Y1 レセプターを介しており、P2Y1 ノックアウトマウスでは増殖細胞数は減少していた。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Masaya N, Okano H. Grafted human induced pluripotent stem cell-derived neurospheres promotes motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 108(40):16825-30, 2011
2. Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. : Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.* 20(23):4530-39, 2011
3. Renault-Mihara F, Katoh H, Ikegami T, Iwanami A, Mukaino M, Yasuda A, Nori S, Mabuchi Y, Tada H, Shibata S, Saito K, Matsushita M, Kaibuchi K, Okada S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. : Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through glycogen synthase kinase-3 inhibition. *EMBO Mol Med.* 3(11):682-96, 2011
4. Fujioka M, Tokano H, Fujioka-Shiina K, Okano H, Edge A.S. : Cre/lox mediated in vivomosaic cell ablation to generate novel models for early stages of degenerative disease and tissue repair. *J. Clin. Invest.* 121(6):2462-2469, 2011
5. Kubota Y, Hirashima M, Takubo K, Nagoshi N, Kishi K, Murakami M, Shibuya M, Takakura N, Okano H, Suda T. : Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. *J. Exp. Med* 208(5):949-960, 2011
6. Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Sehadi S, Robinson J, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo KI, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, Okano H, Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, Sawa A. : DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing

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

cortex. Nature 473(7345):92-96, 2011

7. Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Toyama Y, and Okano H: Schwann Cell Plasticity After Spinal Cord Injury Shown by Neural Crest Lineage Tracing. Glia 59(5):771-84, 2011

8. Sawamoto K, Hirota Y, Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, He X, Hayakawa-Yano Y, Yamada M, Hikishima K, Tabata H, Iwanami A, Nakajima K, Toyama Y, Itoh T, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, and Okano H: Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. J. Comp. Neurol. 519(4):690-713, 2011

2.学会発表

1. Hideyuki Okano : Regeneration of the damaged CNS using human iPSCs-derived neural progenitor cells :The ISSCR/CSH - Asia Conference on Cellular Programs and Reprogramming is the first of the new conference series of topic-specific regional meetings, 2011.10.26 *session 2011.10.24-28 (the Suzhou Dushku Lake Conference Center in Suzhou, China.)

2. Hideyuki Okano, Takeshi Matsui, Kenji Yoshida, Wado Akamatsu : Direct induction of neural stem cells from adult mouse fibroblasts : Neuroscience 2011, SfN's 41st annual meeting, 2011, 2011.11.15 *session 2011.12-16 (the Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC, USA)

3.Hideyuki Okano : Regeneration of the damaged CNS using reprogrammed fibroblasts.: 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2011.12.13 *2011.12.13-16 (パシフィコ横浜、横浜)

G.知的財産権の取得状況

1.特許取得

【平成23年度】国内1件 海外3件

【国内】

(1)発明の名称 シグナル伝達系活性化剤

出願番号:日本 特願 2006-104610

出願日:2006/4/5

特許番号:特許査定

取得日:特許査定

出願人 学校法人慶應義塾 独立行政法人
産業技術総合研究所

発明者 岡野栄之、坂口昌徳、澤本和延

【海外】

(1)発明の名称 インターロイキン-6 アン
タゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号:170399 出願日:2001/10/3

特許番号:170399

取得日:2011/05/29

国名:イスラエル

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、
吉崎和幸

(2)発明の名称:胚性幹細胞からの神経幹
細胞、運動ニューロン及び GABA 作動性ニ
ューロンの製造法

出願番号:2443151 出願日:2001/10/3

特許番号:2443151

国名:カナダ

取得日:2011/06/07

出願人:独立行政法人科学技術振興機構

発明者:岡野栄之、島崎琢也

(3)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:欧州 04787726.1 出願日:2004/9/8

特許番号:1674566

取得日:2011/04/13

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、石橋哲

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

Toll 様受容体シグナルによる神経幹細胞の
増殖・分化制御機構の解明

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 教授

研究要旨

神経幹細胞はニューロン及びその機能を支持するアストロサイトやオリゴデンドロサイトへの多分化能を持った細胞である。成体神経幹細胞の増殖・分化は、取巻く微少環境（ニッチ）により大きな影響を受ける。当研究室の先行研究により、成体脳海馬で神経幹細胞とミクログリアが隣接して存在することが明らかになったことから、ミクログリアもまた、このニッチ形成の一部に寄与している可能性が考えられた。本研究では、ミクログリアに発現する Toll 様受容体に着目し、ミクログリアの神経幹細胞増殖・分化への影響について明らかにする。

A.研究目的

我々は、てんかん誘導後の海馬において、ニューロン死と神経幹細胞の異常増殖が起こり、異所性ニューロンが産生された結果物体認識行動が障害されること、及び薬剤にて異常増殖を阻害した場合にこの障害が改善されることを示した (*J Neurosci* 2007)。しかし生体が本来どのようにこの異常増殖や分化を制御しようとしているかは不明である。神経幹細胞の増殖・分化は様々な細胞が取巻くニッチの影響を受ける。これに関して我々は、マウス成体海馬において神経幹細胞と免疫系細胞ミクログリアが隣接するという結果を得ており、それらのクロストークの存在を考慮した。その作用機序としては、死ニューロン含有核酸が自然免疫活性化で知られる Toll 様受容体 (TLR) の内在性リガンドとして作用する可能性を考えている。そこで本研究では、一本鎖 DNA をリガンドとする TLR9 の遺伝子欠損マウスを用い、*in vitro* と *in vivo* の両観点から免疫-神経系クロストークによる神経幹細胞制御機構を解明する。

B.研究方法

カイニン酸投与により野生型マウスおよびこれら遺伝子欠損マウスにてんかんを誘導し、細胞増殖の指標となる BrdU の取り込みや分化マーカー特異的抗体による免疫染色によって、海馬における成体神経幹細胞の増殖・分化への影響を観察した。

C.研究結果

カイニン酸投与により野生型および TLR9 遺伝子欠損マウスにてんかんを誘導し、細胞

増殖の指標となる BrdU を用いて神経幹細胞の増殖への影響を観察した。その結果、野生型と比較して TLR9 遺伝子欠損マウスでは、海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数が増加していることが明らかになった。さらに、免疫染色により、これら BrdU 陽性細胞はニューロblast および未成熟ニューロンであることを明らかにした。

D.考察

海馬歯状回におけるミクログリアに TLR9 が発現していることが、前回の結果から明らかになった。今回の結果とあわせて考えると、ミクログリアにおける TLR9 シグナルが神経幹細胞の増殖・分化を制御している可能性を示唆している。

E.結論

本年度の結果から、ミクログリアにおける TLR9 シグナルが成体神経新生を調節している可能性が示唆された。今後、TLR9 の内在性のリガンドを同定することにより、より詳細なメカニズム解明が必要である。本研究により、神経-免疫系の詳細なクロストーク様式が明らかになることで、神経疾患の新規治療薬開発の新たな基盤になるだけでなく、免疫系が神経系を介して行動を制御するかどうかなど、高次脳機能への展開が期待できる。

F.研究発表

1.論文発表

1) 書籍

1. Namihira M. & Nakashima K. Fate specification of neural stem cells. in

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

Neurogenesis in the adult brain I (eds. Seki, T., Sawamoto, K., Parent, J.M. & Alvarez-Buylla, A.) 87-107 (Springer, Tokyo, 2011).

2) 雑誌

1. Fujimoto Y., Abematsu M., Falk A., Tsujimura K., Sanosaka T., Juliandi B., Semi K., Namihira M., Komiya S., Smith A. & Nakashima K. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human iPS cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells* in press.
2. Mutoh T., Sanosaka T., Ito K. & Nakashima K. Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells via HIF1 α -Notch signal interaction in the developing brain. *Stem Cells* 30, 561-569 (2012).
3. Juliandi B., Abematsu M., Sanosaka T., Tsujimura K., Smith A. & Nakashima K. Induction of superficial cortical layer neurons from mouse embryonic stem cells by valproic acid. *Neurosci Res* 72, 23-31 (2012).
4. Nagao H., Ijiri K., Hirotsu M., Ishidou Y., Yamamoto T., Nagano S., Takizawa T., Nakashima K., Komiya S. & Setoguchi T. Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma. *J Pathol* 224, 169-179 (2011).
5. Kuwabara T., Kagalwala M.N., Onuma Y., Ito Y., Warashina M., Terashima K., Sanosaka T., Nakashima K., Gage F.H. & Asashima M. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol Med* 3, 742-754 (2011).

2. 学会発表

〈国内学会〉

1. Juliandi B., 精松昌彦, 佐野坂司, 辻村啓太, Smith A., 中島欽一 : Induction of superficial cortical layer neurons from mouse embryonic stem cells by valproic acid, 1st International Symposium/59th NIBB Conference NEOCORTICAL

ORGANIZATION、岡崎コンファレンスセンター、2012年3月10-13日

2. 波平昌一、野口浩史、田中友規、佐野坂司、中島欽一 : DNMT1 regulates neuronal differentiation of neural precursor cell in late-gestational forebrain, 1st International Symposium/59th NIBB Conference NEOCORTICAL ORGANIZATION、岡崎コンファレンスセンター、2012年3月10-13日
3. 武藤哲司、佐野坂司、伊藤慧、中島欽二 : Epigenetically regulated fate switching of neural stem cells by oxygen levels through HIF1 α -Notch signal interaction in the developing brain, 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日（招待講演）
4. 佐野坂司、武藤哲司、伊藤慧、中島欽二 : Oxygen levels play a critical role in fate switching of neural stem cells during brain development, 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日
5. 蟬克憲、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一 : NFIA-induced DNA demethylation in Olig1 promoter regulates the expression of the gene in late-gestational neural precursor cells, 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日
6. 野口浩史、波平昌一、田中友規、佐野坂司、中島欽一 : DNMT1 inhibits the neuronal differentiation of late-gestational neural precursor cells, 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日
7. 田中友規、波平昌一、野口浩史、五十嵐勝秀、辻村啓太、中島欽一 : Functional analysis of DNA-methyltransferase 1 in post-mitotic neurons, 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日

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

8. 中島欽一：エピジェネティック因子による神経幹細胞制御とその再生医療への応用、第37回日本重症心身障害学会学術集会、ホテルクレメント徳島、2011年9月29日（招待講演）
 9. 波平昌一、中島欽一：神経発生に置けるDNAメチル化とその酵素群の役割、第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月14-17日（口頭）
 10. 蟬克憲、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一：転写因子が誘導するOlig1遺伝子プロモーターの脱メチル化、第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月14-17日
 11. 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作用による神経幹細胞制御とその影響、第38回日本トキシコロジー学会学術年会、パシフィコ横浜、2011年7月11日（招待講演）
 12. 中島欽一：抗てんかん薬と神経幹細胞移植による脊髄損傷治療の可能性、第10回京都鴨川脊椎手術研究会、京都リサーチパーク、2011年6月25日（招待講演）
 13. 中島欽一：Epigenetic regulation of neural stem cells by surrounding environment、第576回生医研セミナー、九州大学生体防御医学研究所、2011年6月17日（招待講演）
 14. 中島欽一：Intra-and extra-cellular factors regulating astrocyte differentiation of neural stem cells during development、Neurogenesis 2011、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、2011年6月2-4日（招待講演）
 15. Juliandi Berry、種村健太郎、精松昌彦、五十嵐勝秀、菅野純、中島欽一：Adult hippocampal neurogenesis is impaired after prenatal histone deacetylase-inhibition、Neurogenesis 2011、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、2011年6月2-4日（口頭）
 16. 波平昌一、Fan Guoping、中島欽一：DNAメチル化による神経発生制御機構、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、KKRホテル熊本、2011年5月19-20日（口頭）
 17. 蟬克憲、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一：転写因子NFIAによって誘導されるOlig1遺伝子プロモーターの脱メチル化、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、KKRホテル熊本、2011年5月19-20日
- 〈国際学会〉
1. Noguchi, H., Namihira, M., Tanaka, T., Sanosaka, T., Nakashima, K.: DNMT1 regulates neuronal differentiation of neural precursor cell in late-gestational forebrain. 40th KEYSTONE SYMPOSIA, Keystone, Colorado, USA, January 17-22, 2012
 2. Sanosaka, T., Mutoh, T., Ito, K., Nakashima, K.: Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells during brain development. 40th KEYSTONE SYMPOSIA, Keystone, Colorado, USA, January 17-22, 2012
 3. Nakashima, K.: Neurons derived from transplanted neural stem cells reconstruct disrupted neuronal circuits in the injured mouse spinal cord. StepAhead Australia Ltd's 7th Annual Scientific Conference, Melbourne, November 29-December 4, 2011(Invited)、
 4. Nakashima, K.: Effect of HDAC Inhibitor VPA on neural stem cell differentiation and its application to the treatment of spinal cord injury. Shanghai, October 22-23, 2011(Invited)
 5. Nakashima, K.: BMP-INDUCED REST/NRSF REGULATES THE

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

- ESTABLISHMENT AND co-factors for the Rett syndrome
MAINTENANCE OF ASTROCYTE responsible gene product, MeCP2. 8th
IDENTITY. 10th European meeting on IBRO WORLD CONGRESS OF
Glial Cells in Health and Disease, Prague, NEUROSCIENCE, Florence, July 14-18,
September 13-17, 2011(Invited) 2011
6. Nakashima, K.: Effect of Valproic Acid on 10. Nakashima, K.: Effect of a hdac inhibitor
Neural Stem Cell Differentiation and Its on neural stem cell regulation and it
Therapeutic Application to Spinal Cord application to spinal cord injury. 11th
Injury. 2011 Seoul Symposium on Stem INTERNATIONAL CONFERENCE ON
Cell Research, Seoul, August 31, 2011 NEURAL TRANSPLANTATION AND
(Invited) REPAIR, Florida, May 4-8, 2011 (Invited)
7. Nakashima, K.: Intra-and extra-cellular 11. Nakashima, K.: Hdac inhibitor and neural
factors regulating neural stem cell stem cell transplantation(HINT)method for
differentiation during brain development. the treatment of spinal cord injury.
8th IBRO WORLD CONGRESS OF Symposium of the Bavarian Research
NEUROSCIENCE, Florence, July 14-18, Network for Adult Neural Stem Cells
2011 (Invited) ForNeuroCell, Munchen, April 7-8, 2011
(Invited)
8. Juliandi, B., Abematsu, M., Sanosaka, T., 8. Juliandi, B., Abematsu, M., Sanosaka, T.,
Nakashima, K.: Induction of neurons for Nakashima, K.: Induction of neurons for
superficial cortical layers from mouse superficial cortical layers from mouse
embryonic stem cells by valproic acid. 8th embryonic stem cells by valproic acid. 8th
IBRO WORLD CONGRESS OF IBRO WORLD CONGRESS OF
NEUROSCIENCE, Florence, July 14-18, NEUROSCIENCE, Florence, July 14-18,
2011 2011
9. Tsujimura, K., Fukao, Y., Fujiwara, M.& 9. Tsujimura, K., Fukao, Y., Fujiwara, M.&
Nakashima, K.: Proteomic identification of Nakashima, K.: Proteomic identification of

G.知的財産権の取得状況

- 1.特許取得
該当なし。
- 2.実用新案登録
該当なし。
- 3.その他
特になし。

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、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、ミクログリアを抑制する薬剤ミノサイクリン存在下では、成体脳神経幹細胞の neurosphere 形成能が亢進した。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を示唆するとともに、治療の可能性を示すデータが得られた。

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。さらに、脳内のインターフェロンの主要な産生細胞であるミクログリアを抑制する薬剤ミノサイクリンの効果も併せて調べた。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

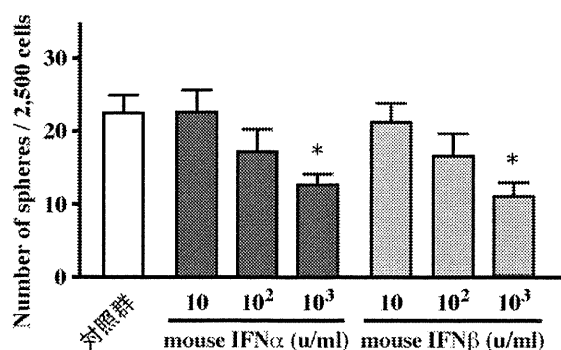


図1：インターフェロン α/β 存在下での成体脳神経幹細胞の primary neurospheres 形成能 (mean \pm s.e.m.)。*, 対照群と比べて有意な低下を示す ($P < 0.05$)。

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が、ミノサイク

リンは濃度依存的に neurosphere の形成を亢進した（図2）。

D. 考察

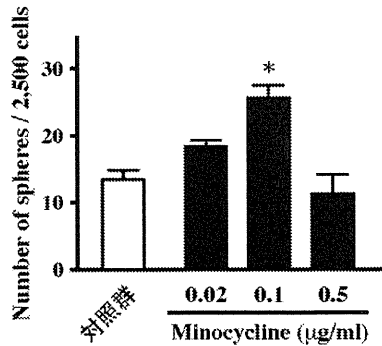


図2：ミノサイクリン存在下での成体脳神経幹細胞の primary neurospheres 形成能 (mean ± s.e.m.)。*, $P < 0.05$

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。

一方、ミノサイクリンの neurosphere 形成能に対する効果は、この培養系にミクログリアがほとんど含まれていないことから、成体脳の神経幹細胞に対する直接的な効果と考えられた。インターフェロン α/β の副作用の軽減治療として有用である可能性が示された。

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やミノサイクリン併用投与の治療効果を検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kato S., Kuramochi M., Takasumi K., Kobayashi K., Inoue K.-i., Takahara D., Hitoshi S., Ikenaka K., Shimada T., Takada

M., Kobayashi K. (2011) Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein. Hum Gene Ther 22, 1511-1523

Hitoshi S., Ishino Y., Kumar A., Jasmine S., Tanaka K.F., Kondo T., Kato S., Hosoya T., Hotta Y., Ikenaka K. (2011) Mammalian Gcm genes induce Hes5 expression by active DNA demethylation and induce neural stem cells. Nat Neurosci 14, 957-964

Kamitani A., Hamada M., Moriguchi T., Miyai M., Hitoshi S., Ikenaka K., Hosoya T., Hotta Y., Takahashi S., Kataoka K. (2011) MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. J Bone Mineral Res 26, 2463-2472

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

インターフェロン誘発性うつ病の病態
—末梢 BDNF 動態解析からの予見・予防・治療法の開発—

研究分担者 鵜飼 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、うつ病や統合失調症、アルコール依存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）の変化の報告が続き、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。

これまでの検討で我々は、インターフェロン α 療法を受けた患者の血清サンプルを調べ、解析したサンプルにおいては、ほとんど全ての患者で、血中 BDNF がインターフェロン治療開始によって有意に低下し、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との知見を得て報告してきた。今回、(1) 上記とは異なるインターフェロン β 投与患者について、抑うつ症状発現と血中 BDNF の変動について測定・解析を行い、インターフェロン β 投与患者では、インターフェロン α とは異なり、血中 BDNF の低下はほとんど無いことを明らかとした。さらに、(2) 先のインターフェロン α 投与患者のサンプルについて、精神疾患との関連が報告されている他のサイトカイン類の変動についても解析し、BDNF の変化とどのような関係にあるかについて調べを進め、TNF α 、VEGF、IL-6 が、インターフェロン α 療法患者において有意に変化することを示した。今後、末梢血で BDNF を増加させることによる抑うつ症状発現の予防・改善の可能性について詰めていくとともに、これらの BDNF 以外の因子の変動が病態にどう影響しているのかについても併せて検討していきたいと考えている。

A.研究目的

近年、うつ病や統合失調症、アルコール依存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）の変化の報告が続き、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。インターフェロン誘発性うつ病についても、ごく最近になって、研究報告が少しずつなされてきているところである。特に、うつ病、そして統合失調症においては、血中 BDNF の低値と、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、血中 BDNF の変化が病態と治療反応性の生物学的マーカーと成りうることで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、あるいは類似の他の栄養因子類の変動がどうなっているかについては未だ全く不明である。今回の研究では、インターフェロン誘発性うつ病における血中 BDNF、および他の類似の因子の

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した。

B.研究方法

ヒト末梢血液サンプルを用いた検討：研究は、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て実施した。具体的には、インターフェロン α 、および β 治療開始前、および投与中・投与後に採血を行い、血清 BDNF、TNF α 、VEGF、IL-6、IGF-1、FGF2、および Leptin 濃度について、それぞれの蛋白特異的な抗体を用いた ELISA 法にて評価・解析を行った。

C.研究結果

(1) インターフェロン β 療法を受けた患者の血清サンプルを解析した結果、インターフェロン治療開始後に、血中 BDNF 濃度に有意な変動は無かった。投与開始から、1例に軽度の不眠、1例に軽度の不眠と食欲不振があった以外、特に明らかなうつ症状の発現

分担研究報告書

は認められなかった。また、軽度の不眠の1例に対してマイスリーが、軽度の不眠と食欲低下の1例に対してとハルシオンとドグマチールが使用されたが、これらの患者では、薬剤投与後に血中 BDNF の急上昇が認められた。

(2) インターフェロン α 療法を受けた患者の血清サンプルを用いて BDNF 以外のサイトカイン類の変動について解析した。その結果、投与後に TNF α 、VEGF、および IL-6 が、それぞれ有意に低下していることをつかんだ。

D. 考察

うつ病の病態では、血中・脳中のグルココルチコイドの増加による神経細胞死・神経回路網の破壊が生じ、それが脳組織の委縮等につながっている可能性が推察されている。従来からの研究で我々は、種々の抗うつ薬が BDNF や他の増殖/栄養因子シグナルの増強を介して脳の神経回路の修復・再生を促進させる等、抗うつ薬の効果と BDNF の関係、およびうつ病における BDNF 変化の意義について検討を進めてきた。近年、生物学的臨床研究において、うつ病患者に抗うつ薬を投与した際に、患者の臨床症状改善に伴って末梢血中の BDNF が増加したとの報告が続いている。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り、その増減の病態に対する生物学的な意義についての理解は未だ十分ではない。

これまでの検討で我々は、インターフェロン α 療法を受けた患者さんの血清サンプルを調べ、解析したサンプルにおいては、ほとんど全ての患者さんで、血中 BDNF が有意に低下しているとの知見を得て報告してきたが、今回のインターフェロン β 療法患者さんで検討では、こうした BDNF の変動はほ

とんど認められず、また、同時に患者さんのうつ症状の発現もほとんど無いことから、インターフェロン β 療法時のうつ症状の副作用発現の低さと血中 BDNF 濃度が低下しないことに何らかの相関関係があることが推察された。また、睡眠導入剤などの投与によって血中 BDNF の上昇を見たことから、向精神薬の処置によって BDNF 濃度は敏感に変動していることが推察された。加えて、今回の検討で、BDNF 以外のサイトカイン類の変動について解析し、投与後に TNF α 、VEGF、および IL-6 が有意に低下していくことを明らかにした。TNF α と IL-6 はうつ病では増加していると指摘されているが、VEGF はうつ病で低下しているとの報告があり、BDNF の変動とともにうつ症状発現における役割を明らかにしていく必要があるものと思われた。現在、インターフェロン誘発性うつ病ラットに対する末梢 BDNF 投与の有効性を解析する計画を進めているが、今後、上記の検討の結果も含めて、こうした末梢 BDNF の投与がインターフェロンうつ病の新たな予防・治療手段になり得るかについて、さらに検討を進めたいと考えている。

E. 結論

インターフェロン β 投与患者について、抑うつ症状発現と血中 BDNF の変動について測定・解析を行い、インターフェロン β 投与患者では、インターフェロン α とは異なり、血中 BDNF の低下はほとんど無いことを明らかとした。加えて、インターフェロン α 投与患者において、血中 VEGF 濃度が BDNF と同様の変動を示しており、今後、末梢血で BDNF を増加させることによる抑うつ症状発現の予防・改善の可能性について詰めていく際に、VEGF 変動の病態への影響について併せて考えていく必要があるものと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwai T, Saitoh A, Ukai W et al. Rhotekin modulates differentiation of cultured neural stem cells to neurons. *J Neurosci Res.* 2012 [Epub ahead of print]
- 2) Iwamoto K, Bundo M, Ukai W et al. Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res.* 2011; 21: 688-696.

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

3) Shirasaka T, Ukai W, Yoshinaga T et al.
Promising therapy of neural stem cell
transplantation for FASD model--neural
network reconstruction and behavior recovery.
Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.
2011; 46: 576-584 (Japanese).

September 23-24, Seoul, Korea, 2011

3) Wataru Ukai, Kimihiko Watanabe et al.
Antidepressant-induced platelet BDNF
release: Implication to the neurogenesis
dysfunction in depression. Society for
Neuroscience, Nov 13-17, Washington DC,
2011

2.学会発表

1) Watanabe K, Hashimoto E, Ukai W et al. The
migration of peripheral brain-derived
neurotrophic factor (BDNF) to the
hippocampus in rats. 10th World Congress of
Biological Psychiatry, May 29- June 2,
Prague, Czech Republic, 2011

2) Watanabe K, Shirasaka T, Ukai W et al.
Serum BDNF as a Potential Biomarker for
Fetal Alcohol Effects. 2nd Congress of Asian
College of Neuropsychopharmacology,

G.知的財産権の取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

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。2011 年中に名古屋市立大学病院肝・膵臓内科で IFN 療法時に本研究参加の同意が得られた 69 例（内、1 例は後に同意撤回）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 週で得点が上昇する傾向にあった。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 MR I（海馬体積の測定）、セロトニントランスポーター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 療法終結時：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、INF 療法自体は 2010 年 1 月より開始された。2011 年末までにエントリーされたのは 69 例であった。外国人で日本語を十分に理解できなかった 1 例、理由は不明だが同意に至らなかった 5 例はエントリーとならなかった。また、同意後すぐに撤回されてエントリーとならなかった 1 例があった。

研究参加同意が得られた 68 例の主なプロ

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

フィールは以下のとおりである。

性別は、男性 37 例、女性 31 例。年齢は、20 歳代 1 例、30 歳代 10 例、40 歳代 11 例、50 歳代 18 例、60 歳代 23 例、70 歳以上 5 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	37	37	0
2	30	25	5
不明	1	1	0

治療前にうつ病の既往のあったのは 7 例、双極性障害の既往は 1 例であった。うつ病既往の 1 例を除き、精神科治療歴はなかった。

治療開始前の BDI-II は、無症状 52 例、軽症 8 例、中等症 8 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 69 例のうち治療が 12 週まで終了して BDI-II を取ることができた 41 例をみた。BDI-II で有症状とされたのは 10 例であり、治療開始時点で既に有症状であった例、うつ病既往があった例が多かった。BDI-II は 6 点以上が変化があると有意味であると言われていたので、同じく 41 例で治療開始時点から治療 12 週までで BDI-II 得点が 6 点以上変化した 11 例をみると、女性、1 型ウイルス感染、うつ病既往の傾向がみられたが、6 点以上変化があっても抑うつ症状としては無症状と判断されるものもあり、そこには一定の傾向はなかった。

D. 考察

IFN 治療中に抑うつ状態を呈する患者はあるが、治療 12 週後まででは特定の傾向はあると言えない。ただし、治療開始前から抑うつ症状を自覚しているものや、うつ病の既往があると抑うつ症状が強くなるのではないかと考えられる。また、抑うつ状態を呈し

ているものの精神科的治療には至るケースは少なく、不眠、倦怠感などについて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。IFN 治療の副作用としてしばしば出現する倦怠感が、単に薬の副作用による倦怠感なのか、抑うつ症状にしばしば伴う倦怠感であるのかの判断はむずかしい。

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
本年度なし
2. 学会発表
本年度なし

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

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

研究分担者 野尻俊輔 消化器・代謝内科 講師

研究要旨

インターフェロン（IFN）はC型肝炎の唯一の根治薬であるがうつ病などの重篤な副作用を誘発するため治療継続が困難となっている症例も少なくない。従ってIFN誘発性うつ病の発症メカニズムの解明とその治療法、予防法の開発が必須であるが未だその多くは未解明である。申請者らはIFNの脳神経幹細胞に対する影響を研究しておりまた分担者らは臨床的なうつ病の研究、C型肝炎の治療に日常から携わっている。我々はこれらの基礎研究と臨床研究の共同により新たな治療法の確立をめざすことを目的とした。さらに同じくIFNの副作用を研究している西口班との連携によりより大規模な研究となるように検討した。

A.研究目的

本研究は重篤なIFN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、治療法の開発を目的としている。

B.研究方法

基礎研究班では神経幹細胞を使ったIFNによる分子・細胞・動物レベルでの解析を進める。動物実験は人間に近いマウスセットを使った実験も並行して実施した。臨床班では実際にIFN治療中の患者さんのうち同意を得られた場合生体内サイトカインの変化を経時的に追跡する。うつ病発症と特に密接に関係していると予想される炎症性サイトカイン（IL-1 β , IL-6, TNF- α ）を中心に検討する。さらにうつ病との相関が予想されているセロトニントランスポーターの関連遺伝子多型を患者ゲノムにて検査する。これらの研究は名古屋市立大学倫理委員会の承認を得ている。またうつ病発症との関係が予測されている海馬の容積との関係も解析するため頭のMRIにて海馬体積を測定する。うつ病に関しては専門家による抑うつ状態の正確な評価のため構造化面接、自己式評価検査、ピッツバーグ睡眠質問表による経時的フォローアップを行う。

C.研究結果

当院での症例数は70例に達しており他施設での研究も開始され、全症例数は210例となっている。解析も順次進行しているが現在まだ研究が進行中ということもあり採

血データは全例そろってはいない。

そこで現在解析可能な症例で検討した。IFN開始前のBDI-IIスコアの点数とIL-1 β , IL-6, TNF- α の血中濃度を解析した。IL-1 β はほとんどの症例で検出感度以下であった。BDI-IIスコアが15以上と高値を占めた群とそれ以下の群で比較検討したがIFN投与前においてはそれぞれのサイトカインにおいて有意な差はみとめられなかった。

D.考察

研究のエントリーは総数200を超え、一旦終了とした。今後は治療終了までまだしばらく時間を要す。現時点の解析では治療開始前においてBDI-II高値例と低値例間で炎症性サイトカインの有意な差は認められなかったが今後全症例数で検討し、また治療開始後のBDI-IIとサイトカインの変化との関係を解析予定である。そのうえでSNPを含めインターフェロンによるうつ病発症のメカニズムや背景因子、予測因子を同定できれば今後IFN治療を進めるうえで非常に有用になると考えている。

E.結論

多数のIFN投与症例が集積されつつある。今後治療終了とともにサイトカイン、海馬体積、うつ病発症SNP解析を進め論理的に融合させて結論に持っていきたい。

F.研究発表

本年度は年2回の班会議で発表した。

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

1.論文発表	びアメリカ肝臓学会での発表を予定している。
Shunsuke Nojiri, Atsunori Kusakabe,	G.知的財産権の取得状況
Noboru Shinkai, Kentaro Matsuura, Etsuko	1.特許取得
Iio, Tomokatsu Miyaki, Takashi Joh.	なし
Factors influencing distant recurrence of	2.実用新案登録
hepatocellular carcinoma following	なし
combined radiofrequency ablation and	3.その他
transarterial chemoembolization therapy in	なし
patients with hepatitis C. Cancer	
Management and Research 2011;3 267-272	

2.学会発表
全体の結果が集計でき次第日本肝臓学会及

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

分担研究課題：インターフェロン誘発性うつ病に関連した遺伝要因の探索

分担研究者： 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学系研究科 教授
研究協力者： 西田 奈央、徳永 勝士 東京大学 人類遺伝学

研究要旨：全国 15 施設においてペグインターフェロン/リバビリン併用療法を施行され、ヒトゲノム研究同意が得られた 250 例に対して、GWAS を実施した結果、細胞増殖やうつ病に関連する複数の候補 SNPs を同定した。また、前向き研究として、全国 10 施設において PEG-IFN/RBV 施行された症例に対して、抑うつ症状の経時的変化を自記式うつ病評価尺度（BDI-II）で、睡眠状況の経時的変化をピッツバーグ睡眠質問表（PSQI）で追跡している。現在までに約 250 例のアンケート結果及びゲノム同意が得られており、現在 GWAS を追加で実施中である。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）治療はウイルス排除に多大な成果をもたらしたが、その反面うつ病などの重篤な副作用が問題となっている。今回の目的は、IFN に伴う抑うつあるいはうつ病に関連した遺伝要因をゲノムワイド関連解析（GWAS）により探索することである。

B. 研究方法

全国 15 施設において PEG-IFN α /RBV 併用療法を施行され、ヒトゲノム研究同意が得られた 250 例に対して、うつ病（抑うつ）に関するアンケート調査を実施した（後ろ向き研究）。過去の IFN 治療によりうつ病と診断された 69 例及びうつ病を発症しなかったコントロール 181 例を対象として、90 万種以上の SNP 解析用プローブが搭載された Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用いて、ゲノムワイド関連解析（GWAS）を実施した。

C. 研究結果

GWAS を実施した結果、細胞増殖やうつ病に関連する複数の候補 SNPs を同定した。また、前向き研究として、全国 10 施設において PEG-IFN α /RBV 施行された症例に対して、抑うつ症状の経時的変化を自記式うつ病評価尺度

（BDI-II）で、睡眠状況の経時的変化をピッツバーグ睡眠質問表（PSQI）で追跡している。現在までに約 250 例のアンケート結果及びゲノム同意が得られており、現在 GWAS を追加で実施中である。

D. 考察

うつ病を対象とした GWAS では、PEG-IFN α +RBV 併用療法でうつ病を発症した患者群が 69 検体と少なかったために、十分な検出力を持った検定ができていない。現在までに約 250 例のアンケート結果及びゲノム同意が得られており、現在 GWAS を追加で実施中である。最終的には、前向き研究及び後ろ向き研究で選ばれた候補 SNPs に関して、すべての検体を用いて検証する。

E. 結論

PEG-IFN α +RBV 併用療法でうつ病を発症する遺伝要因として、細胞増殖やうつ病に関連する複数の候補 SNPs が同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Seto WK, **Tanaka Y**, Liu K, Lai CL, Yuen MF. The Effects of IL-28B and ITPA Polymorphisms on Treatment of Hepatitis C Virus Genotype 6. Am

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

J Gastroenterol. 2011 ;106(5):1007-8.

2) **Tanaka Y**, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Hum Mol Genet. 2011;20(17):3507-16.

3) Kurosaki M, **Tanaka Y**, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. Antivir Ther. 2011;16(5):685-94.

2. 学会発表

1) Kuga C, Matsuda F, Torii Y, Enomoto H, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Nakamura H, Tsutsi H, Iijima H, **Tanaka Y**, Nishiguchi S. INTERFERON- β TREATMENT IS EFFECTIVE FOR CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS WITH ANTI-INTERFERON- α NEUTRALIZING ANTIBODIES. THE 62ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES. Nov.4-8, 2011. San Francisco.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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な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が考えられている。今回インターフェロンが導入された35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が、明らかな相関関係を見いだすことはできなかった。本研究に参加した症例のすべては精神科医が介入し、必要に応じてうつ病に対する治療が行われた結果、うつ病のために重篤な合併症をきたした症例がなかったことから、その予防には専門家の適切な治療が有効と思われた。

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。

B.研究方法

本研究にエントリーされた35症例の内訳は、男性7例、女性28例。年齢は32～75歳で、平均年齢は60.3歳であった。このうち1例が自己免疫性肝炎を併発しているため除外され、34例にpeg-IFN投与が開始された。完遂できたのは30例であり、脱落原因の内訳は、間質性肺炎1例（投与中断後に死亡）、皮疹1例、無効と判断1例、うつ病と診断され24週で終了した症例が1例（結果としてSVR）であった。

また、完遂できた30症例のうち、特筆すべき合併症を生じたのは5例あった。内訳は甲状腺機能亢進症1例、4例がうつ病（1例は入院後回復）であった。この30例の内、サイトカイン（IL-6、IL1-β、TNFα）を投与前と投与後12週時に比較することができた26例に関して検討を行った。

C.研究結果

うつ病を発症した5例と発症しなかった

21例を比較したところ、表1に示す通り、年齢、性別、HCV-RNAゲノタイプ、IL28B SNPsに有意差は認めなかった。また治療開始前に測定されたサイトカインでは、IL1βとTNFαに有意差はなかったが、IL-6はうつ病のない症例で高い値を示した。

	うつ（有） n = 5	うつ（無） n = 21
年齢	60.8	60.9
性	1 / 4	4 / 17
HCV-RNA (I/II)	5 / 0	17 / 4
IL28B SNPs (Major)	4 / 1	12 / 9
IL1β (12w)10以上	1 / 4	18 / 3
TNFα	1.82	2.13
IL-6	2.06	6.98

表 1.

これら26症例にお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した。IL1βについては、両者ともほとんど変動がなかった。TNFαは、うつ病発症例で2.12→1.82pg/mlとやや低下する傾向があったが、非発症例では、2.10→2.13pg/mlと変化を認めなかった。また、IL-6に関しては、うつ病発症例で2.70→2.06pg/mlとやや低下していたのに対して、非発症例では3.73→6.98pg/dlと増加していた（図1）が、統計学的に有意といえる差違は認められなかった。

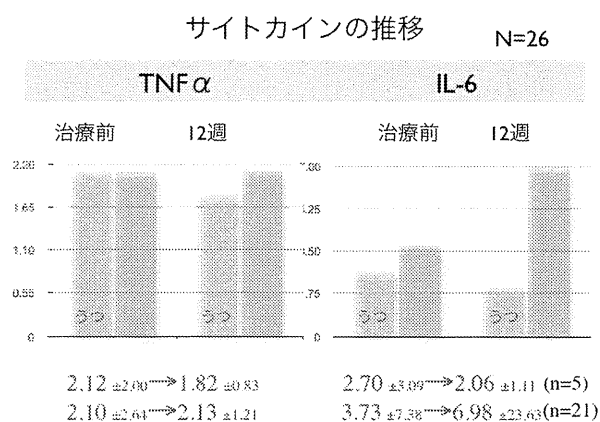


図 1

D.考察・E.結論

サイトカインや神経栄養因子はセトロ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本研究において比較・検討した。結果は予想に反して、うつ病非発症例でサイトカインが高くなるという結果であった。特にIL-6においてこの傾向が顕著であった。

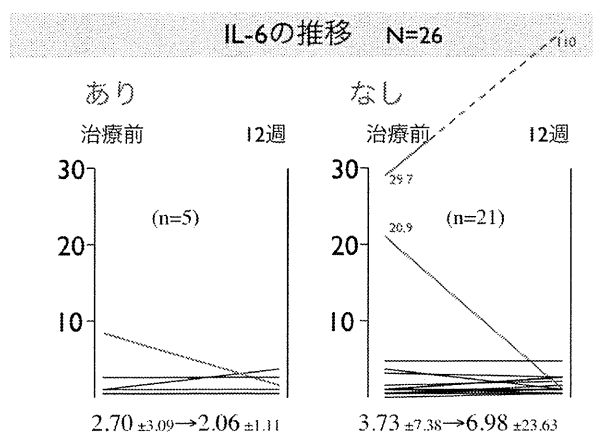


図 2

IL-6 値は、ほとんどの症例で 10pg/ml 以下の低値を呈していたが、うつ病非発症の 1 例が、29.7→110pg/ml と異常変動を認め、全体としてこのような結果となったものと考えられる（図 2）。今回の解析では、各種サイトカインの 12 週間での比較において、うつ病発症を予測する結果を得ることはできなかった。今後症例を増やすこととともに、投与終了時点でのさらなる検討を加える必要があると考えられた。

また、IFN 治療における憂慮すべき合併症であるうつ病発症のため、多くの症例で治療が中止せざるを得ないことが現実であった。しかし、本研究に参加した症例においては、明らかにうつ病のコントロールが良好で、ほとんどの症例で十分な治療を行うことが可能であった。これは治療開始時点から、精神科専門医の治療介入があったためと考えられる。このことが、IFN 治療における最大のうつ病対策であるのと思われた。

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