

令和元年5月29日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07073

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト機能異常よるうつ病発症機構へのタンパクメチル化の関与

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the onset of major depression induced by oligodendrocyte dysfunctions

研究代表者

宮田 信吾 (MIYATA, Shingo)

近畿大学・東洋医学研究所・教授

研究者番号：70403194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オリゴデンドロサイト特異的かつ慢性ストレス特異的なリン酸化シグナルに対する制御因子としてのアルギニンメチル化の新規役割を解明し、オリゴデンドロサイト機能維持によるうつ病性疾患や不安障害の治療・予防への応用に展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

本研究課題では、慢性ストレス暴露におけるPRMTファミリーのひとつと想定されるアルギニンメチル化の低下とPI3Kシグナルの活性化が生じている可能性を見出すと共に、RNA結合タンパク質のひとつがメチル化制御されている可能性を見出した。更に、Na-K ATPase活性が慢性ストレス負荷時に有意に低下することも見出すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、慢性ストレス暴露によるうつ病発症には脳白質オリゴデンドロサイトにおけるアルギニンメチル化レベルの変化と関連するリン酸化シグナルカスケードの活性化が重要な役割を果たす可能性を明らかに出来た事に加えて、オリゴデンドロサイトから軸索への情報伝達機構の重要性についても明らかに出来た。すなわち、脳白質オリゴデンドロサイトでのリン酸化シグナル機能異常をキーとしたうつ病治療のための創薬という臨床応用への基盤を確立できたものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Repeated stressful events are associated with the onset of major depressive disorder. We previously showed oligodendrocyte-specific activation of the serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 cascade, increased expression of axon-myelin adhesion molecules, and elaboration of the oligodendrocytic arbor in the corpus callosum of chronically stressed mice. In the current study, we demonstrate that the Na-K ATPase level and membrane potential of oligodendrocytes were reduced by chronic stress exposure. Furthermore, we found that oligodendrocyte primary cultures subjected to chronic stress resulted in changes of protein arginine methylation levels in several RNA-binding proteins. Our these findings suggest that chronic stress disrupts the organization of the nodes of Ranvier by suppressing the Na-K ATPase levels in oligodendrocytes, and that specific white matter abnormalities are closely associated with major depressive disorder onset.

研究分野：神経化学

キーワード：オリゴデンドロサイト タンパクメチル化 慢性ストレス PI3Kシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らはこれまでに、うつ病発症の大きな環境要因である繰り返し受けるストレス、すなわち慢性的なストレス暴露により引き起こされるうつ様症状出現時に観察されるマウス脳内の特異的な変化を見出し、その分子機序の解析を行ってきた。

(2) その一つとして、脳内のグリア細胞の一つオリゴデンドロサイト(OLs)特異的かつ慢性ストレス暴露な特異的 SGK1 (Serum/glucocorticoid regulated kinase 1) の発現上昇とその活性化によるPI3Kリン酸化シグナル経路を介した脳白質の構造的変化を見出している(Miyata et al., PLoS One. 6, e19859, 2011; Miyata et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 464:76-82, 2015; Miyata et al., BioMed Res Int, 2015:797280)。

(3) また、最近になりアルギニンメチル化によりPI3Kリン酸化シグナルが制御される可能性があること、すなわちこの経路のリン酸化コンセンサス配列にアルギニンメチル化モチーフ R-X-R の存在が示された (Yamagata et al., Mol. Cell. 32, 221-231, 2008) だけでなく、このメチル基のドナーであると共にドーパミンやセロトニンなどの合成に必要な葉酸合成に関わる Methylation cycle の主要構成因子 S-Adenosylmethionine (SAM-e) 投与によるうつ病治療の有効性も報告されたことは注目に値する (Nahas and Sheikh, Can Fam Physician, Vol.57, 659-63, 2011)。

(4) このようなアルギニンメチル化については、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 Protein Arginine N-methyltransferases (PRMTs) の機能解析を中心に申請者らは脳におけるメチル化の意義についても精力的に解析を続けている。これまでに神経回路形成機構や神経突起伸展機構 (Ikenaka et al., Neuroscience, 141, 1971-1982, 2006; Miyata et al., Neurosci. Lett. 445, 162-165, 2008)、神経分化機構 (Fujiwara et al., Mol. Cell Biol. 26, 2273-2285, 2006)、損傷時の応答機構 (Taneda et al., Bra. Res. 1155, 1-9, 2007; Kousaka et al., Neuroscience, 163, 1146-1157, 2009) 等の研究成果を継続的に報告してきた。さらに申請者は慢性ストレス暴露後の脳白質においてアルギニンメチル化レベルが低下することを見出しており、うつ病発症とアルギニンメチル化、SGK1 を含む PI3K シグナル活性化との関連性に非常に興味を持たれた。

### 2. 研究の目的

本研究は慢性ストレス暴露における脳白質 OLs の構造的・機能的変化の分子機序について基礎的研究を完成し、OLs の構造変化を防ぐような治療薬の開発や確定的診断方法開発といった臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1) OLs におけるアルギニンメチル化について、PRMTs の発現量等の変化の有無やメチル化活性の変化について神経細胞との違いについて明らかにする。すなわち、神経細胞においては、SAM-e はコリンやカテコールアミンなどへのメチル基のドナーであり、脳白質においてはミエリン蛋白へのメチル基のドナーでもある。慢性ストレス暴露マウス脳において、これらタンパク質のアルギニンメチル化レベルの変化の有無について解明する。

(2) さらに、申請者らがこれまでに見出している PDK1-SGK1-NDRG1 カスケードのリン酸化亢進による活性化経路に、PRMTs ファミリーによるアルギニンメチル化が関与しているのかについて、これら基質におけるアルギニンメチル化レベルの変化の有無を明らかにする。

(3) アルギニンメチル化レベルの制御により、これまで観察されている OLs の構造変化やランピエ絞輪の構造変化、さらにはうつ症状が回復し得るのか否かについて明らかにする

(4) ニューロン-グリア共培養系を用いて、OLs 特異的なアルギニンメチル化レベルの制御による髄鞘形成能への影響の有無を明らかにすると共に、OLs またはニューロンそれぞれのアルギニンメチル化レベルの制御による神経軸索活性レベル (Na-K ATPase 活性、等) への影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 申請者らは、水浸拘束法により慢性ストレス負荷を行ってきた。この慢性ストレス暴露マウスでは恒常的に血中のコルチコステロン量が増加しており、尾懸垂法などの行動解析で無気力レベルの上昇や海馬歯状回における神経新生レベルの低下など、ヒトうつ病患者で観察されるような動態を示したことからうつ病のモデルマウスであると考えられることから本研究計画においても使用する。

(2) 本研究計画では、まず OLs および神経細胞におけるアルギニンメチル化の変化について PRMTs の発現量等の変化の有無やメチル化活性の変化を検討し、各細胞特異的なアルギニンメチル化タンパク質の同定も試みる。次に、OLs において、PDK1-SGK1-NDRG1 カスケードのリン酸化亢進による活性化経路に PRMTs ファミリーによるアルギニンメチル化が関与しているのかについて検討する。さらに、ニューロン-グリア共培養系を用いて、OLs 特異的なアルギニンメチル化レベルの制御による髄鞘形成能への影響や神経軸索活性レベル (Na-K ATPase 活性、等) への影響を解明する。

(3) 慢性ストレス暴露における神経細胞およびグリア細胞 (OLs、アストロサイト、ミクログリア) でのアルギニンメチル化レベルについて、SYM11 (anti-dimethyl-Arginine, symmetric) 抗体および ASYM24 (anti-dimethyl-Arginine, asymmetric) 抗体を用いて Western blotting 法により比較検討する。

(4)慢性ストレス暴露により、OLsにおいて変化するアルギニンメチル化が PDK1-SGK1-NDRG1 シグナルのどの因子に関与するのかについて、ASYM24 抗体や SYM11 抗体を用いた免疫沈降法により解明する。さらにこの検討を、OLs の初代培養などの培養細胞系を用いて、合成グルココルチコイド Dexamethazone (Dex) 刺激の有無により比較検討する。

(5) PDK1-SGK1-NDRG1 リン酸化シグナル活性に関与するアルギニンメチル化を触媒する PRMTs のサブタイプの同定を行う。PRMT1-8 各 siRNA 処理後の OLs の初代培養などの培養細胞系を用いて、合成グルココルチコイド Dexamethazone (Dex) 刺激によるリン酸化シグナル活性の変化およびアルギニンメチル化レベルの変化について Western blotting 法により比較検討する。

(6) PRMTs によるメチル化供与因子の同定を 2 次元電気泳動および MALDI-TOF-mass を用いて行う。この解析および免疫染色法などにより OLs における、PDK1-SGK1-NDRG1 リン酸化シグナル活性だけでなく核におけるヒストンメチル化や細胞内小器官における RNA 結合タンパク質のメチル化の有無と刺激応答性を解明する。

(7) ニューロン-グリア共培養系を用いて、OLs 特異的なアルギニンメチル化レベルの制御による髄鞘形成能への影響について免疫染色法により、神経軸索活性レベル (Na-K ATPase 活性、等) への影響について ELISA 法により検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 慢性ストレス暴露における神経細胞およびグリア細胞でのアルギニンメチル化レベルについて、SYM11 抗体および ASYM24 抗体を用いて Western blotting 法などにより比較検討すると共に、培養細胞やオリゴデンドロサイトの DEX 刺激による PI3K シグナル活性化と変化する PRMTs のサブタイプの同定を行った。その結果、PI3K シグナルへ PRMT family のひとつの関与の可能性が示唆されると共に SYM11 抗体を用いた検討では各細胞に変化は観察されず、ASYM24 抗体を用いた検討でオリゴデンドロサイトや神経細胞等の一部でアルギニンメチル化レベルの変化が観察された。

(2) オリゴデンドロサイトでの慢性ストレス時に低下する PRMT の基質の探索を行うための予備検討を実施した。その結果、我々の系では SYM11 および ASYM24 によるメチル化タンパク検出感度が非常に悪いことが判明したため、急遽他の抗体導入を検討し、新たに導入した SDMA 抗体および ADMA 抗体を用いた Western blotting 法により十分な検出感度を得ることに成功した。更に、オリゴデンドロサイト初代培養系と共にニューロン-オリゴデンドロサイト共培養系を作成し、神経軸索活性レベルとしての Na-K ATPase 活性の測定条件の検討を ELISA 法により行った。

(3) 次に、オリゴデンドロサイトでの慢性ストレス時に低下する PRMT の基質の探索を行った。その結果、オリゴデンドロサイトにおいて RNA 結合タンパク質のひとつがこの PRMT によりメチル化制御されている可能性を見出すことが出来た。更に、オリゴデンドロサイト初代培養系と共にニューロン-オリゴデンドロサイト共培養系において、神経軸索活性レベルおよびオリゴデンドロサイト活性レベルとしての Na-K ATPase 活性について ELISA 法により測定し、慢性ストレス負荷時に両者ともに有意に低下することを見出すことが出来た。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Miyata S.

Cytoskeletal signal-regulated oligodendrocyte myelination and remyelination. Springer Books/ Myelin-Basic and Clinical Advances. 2019, In press. 査読有り  
URL: <https://www.springernature.com/jp/products/books>

Shimizu S, Ishino Y, Tohyama M, Miyata S.

NDE1 positively regulates oligodendrocyte morphological differentiation. Sci Rep. 2018 May 16;8(1):7644. 査読有り  
DOI: 10.1038/s41598-018-25898-4.

Tanaka T, Shimizu S, Ueno M, Fujihara Y, Ikawa M, Miyata S.

MARCKSL1 Regulates Spine Formation in the Amygdala and Controls the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Anxiety-Like Behaviors. EBioMedicine. 2018 Apr;30:62-73. 査読有り  
DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.03.018.

Shimizu S, Tohyama M, Miyata S.

The antistress effect of the Kampo medicine Yokukansan. The Autonomic Nervous System. 2017; 54:21-25. 査読有り  
URL: <http://www.jsnr-net.jp/about/gakkaishi.html>

[学会発表](計 28 件)

宮田信吾、新垣健太、金澤成行、清水尚子、石野雄吾、遠山正彌

フェルラ酸によるヒト皮膚線維芽細胞でのストレス保護効果  
第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.28-30, 横浜

Miyata S, Yoshikawa K, Shimizu S, Ishino Y, Yamamoto A, Kawakami A, Kaneita M, Yamamoto Y, Tohyama M.

うつ病発症に関連するオリゴデンドロサイト接着因子群の解析  
第 91 回日本生化学会大会 2018.09.24-26, 京都

Yasugaki S, Liu CY, Miyata S, Yanagisawa M, Hayashi Y.

Effects of Chronic Stress on Sleep in Mice  
Tsukuba Global Science Week 2018, 2018.08.20-22, 筑波

Miyata S, Shimizu S, Ishino Y, Yamamoto A, Kawakami A, Tohyama M.

うつ病発症における脳白質構造変化とオリゴデンドロサイト機能変化の関連  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ComBio2017)、第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会 2017.12.06-09, 神戸

Miyata S, Shimizu S, Ishino Y, Tohyama M.

Molecular mechanisms of the onset of neuropsychiatric disorders by the changes in glial functions.

The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry.2017/09/07-09, 仙台

Miyata S, Shimizu S, Yamamoto A, Kawakami A, Tohyama M.

The cadherin superfamily proteins in oligodendrocytes in the mouse corpus callosum were changed after chronic stress exposure.

The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2017/07/20-23, 千葉

Miyata S, Yoshikawa K, Shimizu S, Yamamoto A, Kawakami A, Ishino Y, Kaneita M, Yamamoto Y, Tohyama M.

慢性ストレスによる脳白質機能変化と大うつ病性障害の関連

第 17 回日本抗加齢医学会総会 2017/06/02-04, 東京

宮田信吾、清水尚子、松村彬世、川上あゆみ、鹿島美恵子、遠山正彌

うつ病性障害発症とオリゴデンドロサイト機能

第 122 回日本解剖学会総会・全国学術総会 2017/03/28-30, 長崎

清水尚子、遠山正彌、宮田信吾

Functional analysis of DISC1-binding zinc finger protein (DBZ) during oligodendrocyte differentiation

第 21 回グリア研究会 2016/12/3, 大阪

宮田信吾、清水尚子、松村彬世、川上あゆみ、遠山正彌

microRNA を介した脳内ストレス応答機構への抑肝散の効果

第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/30-12/2, 横浜

宮田信吾、清水尚子、服部剛志、遠山正彌

精神疾患関連分子によるオリゴデンドロサイト発達制御

第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会 2016/9/8-10, 福岡

宮田信吾、遠山正彌

ホヤから見いだされた神経突起進展制御に関連する因子の機能解析

第 17 回 ORIGIN 神経科学研究会 2016 2016/8/27-28, 福井

他、計 28 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門(基礎研究部門)

<http://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/index.html>

近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門(基礎研究部門)研究成果

<http://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/results.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。