

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591390  
 研究課題名（和文）うつ病の治癒機転に重要な転写因子が制御するターゲット遺伝子の探索と機能評価  
 研究課題名（英文）An antidepressant related transcription factor Math2 regulates Prg1 expression and induces neurite differentiation.  
 研究代表者  
 山田 美佐（YAMADA MISA）  
 国立精神・神経センター精神保健研究所・老人精神保健部・科研費研究員  
 研究者番号：10384182

## 研究成果の概要（和文）：

抗うつ薬の作用メカニズムに関連する脳内分子システムを解明するため、これまでに我々が抗うつ薬関連遺伝子として同定した転写因子 Math2 が転写を制御するターゲット遺伝子として Prg1 を同定し、転写調節様式を明らかとし、Math2-Prg1 による機能を検討した。また、種々の薬物投与におけるラット脳内の Math2 及び Prg1 の発現を定量した。本研究結果から、「Math2-Prg1-神経可塑的变化」の分子システムを、新たな抗うつ薬の作用メカニズム仮説として提示した。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present study, we identified the gene, plasticity-related gene 1 (Prg1), targeted by a transcription factor Math2 which is an antidepressant related gene. Our results may support the hypothesis that Math2-Prg1 mediated plastic changes of nervous system in frontal cortex are involved with therapeutic action of antidepressants.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学、抗うつ薬、転写因子、大脳皮質初代培養神経細胞、網羅的探索

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の自殺者数は年間 3 万人を越え大きな社会問題となっているが、自殺に寄与する最大の要因はうつ病であると言われていた。うつ病の病態及び治癒機転については、既存の抗うつ薬がシナプス間隙におけるモノアミン濃度を上昇させることから、うつ病ではモノアミン神経系に障害があるのではないかという「モノアミン仮説」が提唱されてきた。しかし、このような薬理作用が抗うつ薬投与後短時間で生じるのに対し、抗うつ薬効果発現には数週間を要するなど矛盾点も指摘された。近年、「抗うつ薬投与による転写因子 CREB のリン酸化亢進とこれに続く brain derived neurotrophic factor (BDNF) 等のターゲット遺伝子の転写調節、さらに BDNF による神経保護、神経新生等の機能変化」といった一連の流れがうつ病の治癒につながるという報告が多数なされ、うつ病治癒メカニズム仮説として一定の評価を受けている。しかし、BDNF の発現増加がすべての抗うつ薬に共通する現象ではないこと、BDNF の活動性を変化させる遺伝子多型 Val66Met とうつ病の関連性について一致した見解が得られていないことなどが報告されている。また、増加した BDNF による神経可塑的变化が、情動へ及ぼす影響についても十分に明らかにされていないなど、BDNF 仮説のみで、うつ病の治癒メカニズムをすべて説明するには不十分である。うつ病の治癒メカニズムの解明には、「仮説」をさまざまな手法を用いて、さまざまな角度から検証し、矛盾点を説明できるように改めていくことが必要であると考える。

## 2. 研究の目的

これまで我々は、さまざまな仮説にとらわれずに抗うつ薬の奏効機転に関連する脳内

分子システムを明らかにするために、抗うつ薬長期投与後にラット脳内で発現量が特異的に変化する遺伝子を網羅的に探索し、707 種を同定してきた (ADRG#1-707)。さらに、これらの ADRG 遺伝子をスポットした ADRG microarray を開発し、候補遺伝子の 2 次スクリーニング (絞り込み) を行ってきた。その結果、2 次スクリーニングされた ADRG#701 は bHLH 構造を有する転写因子 Math2 であることが明らかとなった。そこで本研究では、抗うつ薬投与による Math2 の発現変化を定量し、Math2 が転写を調節するターゲット遺伝子群を同定し、さらに同定されたターゲット遺伝子の機能を解明することを目的とする。本研究により、「CREB-BDNF-神経保護、神経新生等の神経可塑的变化」とは異なる新たなうつ病治癒メカニズム仮説を提示できるものと考えている。

## 3. 研究の方法

Math2 が転写制御するターゲット遺伝子群の探索

ラット前頭葉皮質初代培養神経細胞を調製し、Math2 をトランスフェクション後、Math2 発現細胞のみを分離し、GeneChip を用いて Math2 により転写調節を受けるターゲット遺伝子を探索し、発現プロファイルを解析した。Math2 によるターゲット遺伝子の発現変化は real time RT-PCR 法で再確認し、転写調節様式はクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) で、転写調節に重要な領域の同定はルシフェラーゼアッセイにより検討した。

Math2 のターゲット遺伝子の機能の検討

Math2 及びターゲット遺伝子の発現ベクター及び siRNA を作成し、PC12 細胞にトランスフェクション後、経時的形態変化 (神経突起の伸長) を蛍光免疫染色法により観察し、

各 50 細胞について神経突起長を計測した。

### 薬物投与による **Math2** 及びターゲット遺伝子の発現定量

**Math2** 及びターゲット遺伝子の特異的プライマーを設計し、抗うつ薬、抗精神病薬、躁病治療薬投与によるラット前頭葉皮質における発現変化を real-time RT-PCR 法により定量した。

#### 4. 研究成果

### **Math2** が転写を調節するターゲット遺伝子の探索

**Math2** を発現した大脳皮質初代培養神経細胞を分離し、**Math2** により転写調節を受けるターゲット遺伝子の探索を GeneChip 解析により検討した。その結果、**Math2** の過剰発現により発現変化する 46 遺伝子を下流遺伝子として得た。これらの遺伝子の 1 つで、神経特異的に発現する plasticity related gene 1 (**Prg1**)に着目した。**Math2** 過剰発現による **Prg1** の発現変化を real time RT-PCR 法により定量した結果、大脳皮質初代培養神経細胞において有意な発現増加が認められ、GeneChip 解析の再現性が確認できた (図 1 A)。また、PC12 細胞でも、**Math2** 過剰発現による **Prg1** の有意な発現増加が認められた(図 1 B)。

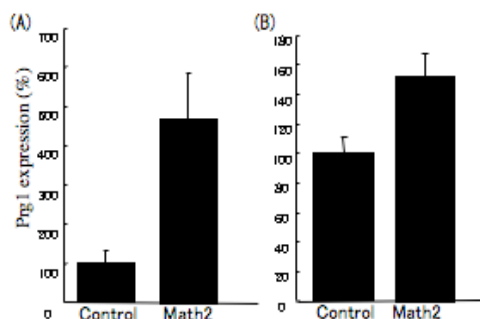


図 1 **Math2** 過剰発現細胞における **Prg1** 発現量の定量 大脳皮質初代培養神経細胞(A)または PC12 細胞 (B)に **Math2** を過剰発現させ、**Prg1** の発現量を real time RT-PCR 法により定量した。

### **Prg1** プロモーター解析

**Prg1** の転写開始部位の上流 3,000 bp についてプロモーター解析を行った結果、500 bp 以内に **Math2** が結合する配列である E box consensus 配列が 4 ヶ所 (-E4~-E1) 存在することが明らかになった (図 2)。この 4 ヶ所の E box をターゲットとしてクロマチン免疫沈降法を行った。その結果、**Math2** は **Prg1** 上流の 4 ヶ所の E box のうちいずれかに直接結合することが明らかとなった。次に、種々の長さの **Prg1** プロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼアッセイ用ベクターを作成し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、-E4 から-E2 を有するベクターでは、高いルシフェラーゼ活性が得られたが、-E1 を欠くベクターでは、ルシフェラーゼ活性が低下した (図 3)。このことから、転写開始部位に最も近い E box が転写に必要な不可欠であることが明らかとなった。

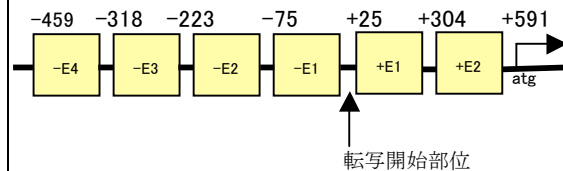


図 2 : **Prg1** プロモーター解析 **Prg1** の転写開始部位より上流 3kb について E box consensus 配列を調べたところ、4 箇所の E-box が存在していることが明らかとなった。

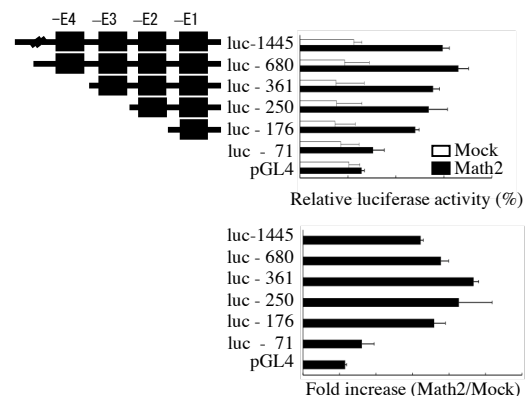


図 3 **Prg1** プロモーター活性 種々の **Prg1** プロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼアッセイ用ベクターを作成し、活性を測定した。

### Math2 ターゲット遺伝子 Prg1 の機能の検討

PC12 細胞に Math2 または Prg1 をトランスフェクションした後、経時的な形態変化を検討した。その結果、72 時間後において、対照に比べ顕著な神経様突起の伸長が観察された。実際に突起長を計測したところ、24、48 時間後では変化は認められなかったが、72 時間後には有意な突起伸長が認められた (図 4 A)。さらに、Prg1 発現を siRNA により抑制した結果、Math2 過剰発現による神経様突起伸長が Prg1 siRNA により認められなくなった (図 4 B)。

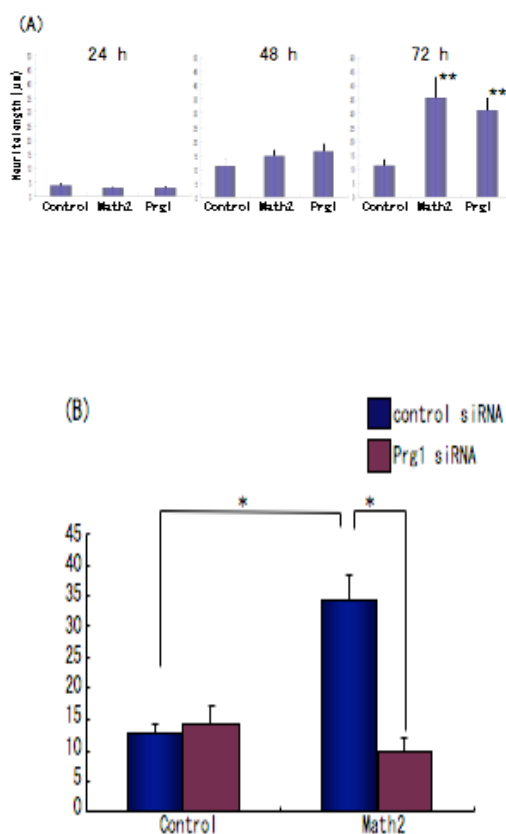


図 4 PC12 細胞における神経突起長の変化 PC12 細胞に、Math2、Prg1 をトランスフェクションし、24、48、72 時間後に突起の長さを計測した (A)。\*\*<0.01 ANOVA followed by Dunnett Control または Math2 と control siRNA または Prg1 siRNA をトランスフェクションし、72 時間後突起の長さを計測した (B)。\*<0.05 ANOVA followed by Tukey-Kramer

### 薬物投与による Math2 及び Prg1 の発現定量

種々の薬物を投与したラット前頭葉皮質における Math2 及び Prg1 の発現を real time RT-PCR 法により定量した。抗うつ薬の sertraline、fluoxetine による Math2 及び Prg1 の発現定量の結果、3 週間投与により有意な発現増加が認められたが、1 日または 1 週間投与では変化は認められなかった。このことは、抗うつ薬の臨床効果発現という時間経過との一致からも、抗うつ薬の作用発現メカニズムとの関連が示唆される。また、haloperidol、lithium では発現変化が認められなかったことから、Math2、Prg1 発現変化は抗うつ薬特異的であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Yamada, M., Shida, Y., Takahashi, K., Tanioka, T., Nakano, Y., Tobe, T., and Yamada, M.: Prg1 is regulated by the basic helix-loop-helix transcription factor Math2. J. Neurochem. 査読有 **106**, 2375-2384. 2008

Yamada, M., Shida, Y., Takahashi, K. and Yamada M.: Induction of the transcription factor Math2 and its target gene Prg1 after chronic treatment with selective serotonin reuptake inhibitors in rat brain. J. Mental Health. 査読有 **55**, 103-109. 2009

[学会発表] (計 2 件)

Yamada, M., Yamada, M., Shida, Y., Takahashi, K., Tanioka, T., Nakano, Y and Tobe, T.: An antidepressant related transcription factor Math2 regulates Prg1 expression and induces neurite differentiation. The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 11.13-14. 京都国際会議場 Kyoto, Japan

志田美子, 高橋弘, 山田美佐, 中野泰子, 戸部徹, 山田光彦 抗うつ薬の作用メカニズムに関わる転写因子 ADRG701 が制御する下流遺伝子の探索. 第 30 回日本分子生物学会年会, 第 80 回日本生化学会大会合同大会 BMB2007, パシフィコ横浜, 神奈川県 2007.12.11-15.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等: なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 美佐 (YAMADA MISA)

国立精神・神経センター 精神保健研究所  
老人精神保健部 科研費研究員

(現、独立行政法人 国立精神・神経医療  
研究センター 精神保健研究所 精神薬  
理研究部)

研究者番号: 1 0 3 8 4 1 8 2

### (2) 研究分担者

山田 光彦 (YAMADA MITSUHIKO)

国立精神・神経センター 精神保健研究所  
老人精神保健部 部長

(現、独立行政法人 国立精神・神経医療  
研究センター 精神保健研究所 精神薬  
理研究部)

研究者番号: 6 0 2 4 0 0 4 0

高橋 弘 (TAKAHASHI KOU)

国立精神・神経センター 精神保健研究所  
老人精神保健部 外来研究員

(現、独立行政法人 国立精神・神経医療  
研究センター 精神保健研究所 精神薬  
理研究部)

研究者番号: 2 0 4 1 5 5 8 2

(3) 連携研究者: なし