

平成 21年 5月 15日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19790823
 研究課題名（和文） アルコール依存症とうつ病の病態基盤の接点—小胞体の障害による神経幹細胞の機能異常
 研究課題名（英文） The common pathophysiology of alcoholism and depression— neural stem cell dysfunction induced by impairment of endoplasmic reticulum
 研究代表者
 石井 貴男（ISHII TAKAO）
 札幌医科大学・保健医療学部・講師
 研究者番号：40404701

研究成果の概要：

エタノール処置によって、小胞体シャペロンの発現変化が認められ、エタノールが小胞体機能に影響を及ぼすことが示された。また、神経幹細胞に小胞体機能阻害剤を処置することによっても、エタノール同様に転写抑制因子 NRSF/REST の結合活性の増加および神経分化抑制が認められた。これらの結果から、小胞体および NRSF/REST を介した神経分化機能の変化が、アルコール依存症およびうつ病の共通した生物学的病態である可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 420,000 | 3,520,000 |

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

1. 研究開始当初の背景

アルコール依存症とうつ状態を合併することが多いことは臨床場面ではよく知られており、古くから現在までアルコール依存症とうつ病のcomorbidityに言及した報告は少なくない。申請者の研究室においても、これまでにアルコール依存症とうつ病の死後脳を用いた研究で、cAMP産生能の低下やcAMP情報伝達系に関連する転写因子 CREB(cAMP response element binding protein)のリン酸化の低下など、cAMP-CREBカスケードの抑制的变化という同様の傾向を認めており、両疾患に

共通の生物学的基盤が存在する可能性が強く示唆される。

近年、アルコール依存症やうつ病における神経新生(neurogenesis)の異常に関する研究が進むなかで両疾患において海馬の神経新生抑制が報告されており、両疾患に共通の生物学的基盤として神経幹細胞から神経細胞への分化機能異常の存在が推察される。

我々の研究室では、アルコールによる脳神経回路網の異常の原因として、アルコールが神経細胞の生存そのものの障害より、むしろ神経幹細胞から神経細胞を作っていく過程に及

ぼす影響が重要なのではないかと考え、研究をすすめてきた。これまでに、実際の生体にも起こり得る濃度のアルコールが神経幹細胞から神経細胞への新生を抑える一方でグリア系細胞の産生を増加させることや、このアルコールによる神経幹細胞の神経細胞への分化抑制作用のメカニズムに関して、ニューロン関連遺伝子の発現を制御し神経幹細胞の運命決定に大きく関与するとされる転写抑制因子 NRSF/REST (neuron-restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor) の活性および蛋白質発現がアルコールによって増加することを報告している (Tateno et al. J Neural Transm. 2005)。

一方、細胞内小器官である小胞体は、カルシウム貯蔵の他、産生した蛋白質の高次構造形成、異常構造蛋白質の分解などの蛋白質の品質を管理する役割を担うとされる。この蛋白質品質管理における小胞体機能のバランスに変化が生じ、結果として小胞体内に高次構造の異常な蛋白質が蓄積する状況が小胞体ストレスであり、これに対して細胞は種々の反応を示すことが知られている。小胞体は神経細胞においてはアポトーシス刺激の特異的な感知器官として、また細胞内シグナル伝達の発信地として知られており、細胞の生存維持に果たす役割を中心的に研究されているが (Kaufman RJ. Denes Dev 1999)、神経幹細胞内での役割、特に分化機能の変化との関連については未だ不明である。しかしながら、神経新生の障害が知られている双極性障害において小胞体反応系の低下 (Kakiuchi C, Kato T et al. Nat Genet. 2003) が多数報告されており、小胞体ストレスが神経幹細胞から神経細胞への分化抑制に関与することは十分考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、うつ病とアルコール依存症の共通する病態基盤として、神経新生の異常、すなわち神経幹細胞から神経細胞への分化機能異常が非常に重要であると考え、その機序について、感情障害との関連が報告されている小胞体機能変化に焦点をあてて、検討を行う。培養神経幹細胞を用いて、アルコール長期曝露が小胞体機能に及ぼす影響および小胞体機能変化が神経幹細胞の機能に及ぼす影響について、分化を中心に神経幹細胞の機能評価および発現変化する蛋白質や転写調節活性に関して検索する。さらに、神経新生促進作用あるいは神経保護作用を有することが知られている抗うつ薬、気分安定薬を用いて、アルコールによる神経幹細胞の機能異常に対する回復効果とその機序についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養神経幹細胞の獲得

妊娠13.5日のラット胎仔より神経幹細胞を単離し、塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) 含有培地にて、一次培養を行う。培養開始5~7日目で細胞数を均一にしてbFGFを除去した培地で播き直し神経細胞への分化を誘導する。

(2) アルコールおよび小胞体ストレス暴露後の神経幹細胞の分化機能変化解析 分化誘導開始後に設定した濃度のアルコールおよび小胞体機能特異的阻害剤

(thapsigargin) を培地に加えて培養を続け、その後分化機能評価を行う。具体的には、神経細胞・グリア細胞に特異的に高発現する蛋白質の抗体を用いて免疫染色法、ELISA法を用いた。

(3) アルコールおよび小胞体ストレス暴露後の神経幹細胞の細胞内情報伝達解析

①アルコールが神経幹細胞の小胞体機能に及ぼす影響について、小胞体ストレス蛋白質 (GRP78、PERKなど) の変化をWestern blotting法で解析する。

②アルコールおよび小胞体機能特異的阻害剤による細胞内情報伝達系の応答に関わる分子を、生存・増殖機能に重要な役割を担う栄養因子シグナル系であるMAP Kinase経路を中心に、western blotting法で解析する。神経幹細胞の転写因子の解析についてはCREB、NRSFの活性変化をWestern blotting法およびGel Shiftアッセイを応用したNo Shift法にて評価を行う。

③アルコールおよび小胞体ストレスによる神経幹細胞障害メカニズム解析の目的でリチウムなど神経細胞保護作用を有する物質を、アルコールおよび小胞体機能特異的阻害剤と併用し、障害性の変化を解析する。同時に薬物の効果についての細胞内情報伝達解析も行い、新たな予防・治療法の探索を試みる。

4. 研究成果

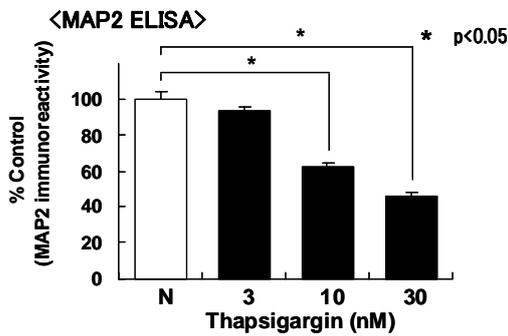
(1) 小胞体ストレス暴露後の神経幹細胞の分化機能変化解析

我々の教室ではこれまでに、神経幹細胞の生存に影響を与えない濃度のアルコールが、神経幹細胞から神経細胞への分化を抑制することを見出して報告してきた。本研究では、まず、小胞体ストレスが神経幹細胞の分化に及ぼす影響について検討を行った。

小胞体ストレスとしてthapsigarginを神経幹細胞の神経細胞の分化誘導時に処置して96時間後に評価した。結果(図1)、10nMという低濃度のthapsigarginによって神経細胞への分化は抑制されることが認められた。なお、この10nMのthapsigarginでは、神経細胞の生存自体には影響しないことを確認している。すなわち、アルコールと同様に、神経細胞死を

もたらさない程度の小胞体ストレスによって、神経分化は抑制されることが示された。

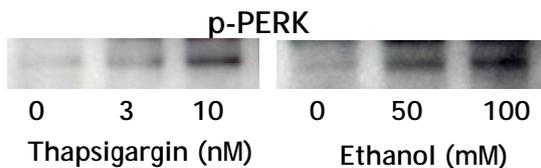
<図 1>



(2)アルコールが神経幹細胞の小胞体機能に及ぼす影響

次に、アルコールが神経幹細胞の小胞体機能に及ぼす影響について検討を行った。神経細胞の生存には影響を与えないが、神経分化を抑制する濃度である 100mM のエタノールを神経幹細胞の分化誘導時に処置した。小胞体ストレスの指標の一つである PERK のリン酸化を Western blotting 法にて評価を行った。図 2 に示す通り、エタノール処置によって、リン酸化 PERK の増加が認められ、その作用は thapsigargin と同様であり、エタノールによって小胞体機能に変化することが示唆された。一方、小胞体ストレス負荷によってシャペロン蛋白質である GRP78 の発現が誘導されることが知られているが、エタノール処置によって GRP78 の発現増強は認められず、エタノールは thapsigargin とは異なる作用機序で、小胞体機能を変化させる可能性が推察された。

<図 2>



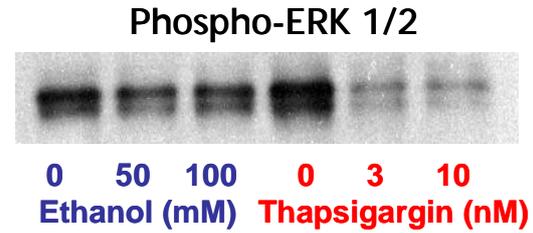
(3)アルコールおよび小胞体機能特異的阻害剤による細胞内情報伝達系の応答

次に、生存・増殖機能に重要な役割を担う栄養因子シグナル系である MAP Kinase 経路に、焦点をあてて、細胞内情報伝達系の変化の解析を試みた。

神経幹細胞の神経分化誘導時にエタノール、thapsigargin のそれぞれを処置し、MAP Kinase 経路の分子である ERK の活性化を Western blotting 法にて評価を行った。図 3 に示す通り、エタノール、thapsigargin ともにリン酸化 ERK の低下、すなわち ERK の活

性低下を認めた。

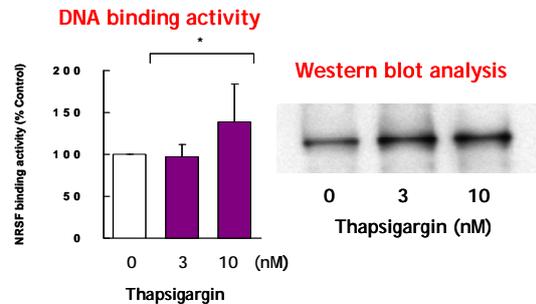
<図 3>



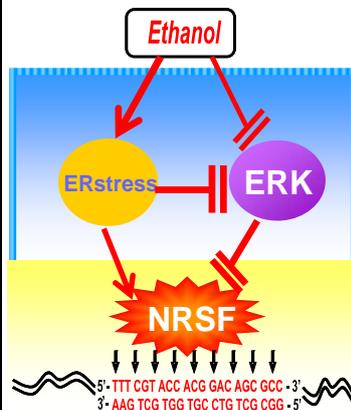
(4)小胞体ストレスによる転写抑制因子 NRSF/REST の結合活性変化

我々の教室では、アルコールによる神経幹細胞の神経細胞への分化抑制作用のメカニズムに関して、転写抑制因子 NRSF/REST の DNA 結合活性および蛋白質発現がアルコールによって増加することをこれまでに報告してきた。また、この NRSF/REST 活性は ERK シグナルによって制御されていることも見出し報告している。そこで次に、小胞体ストレスによる NRSF/REST の活性変化について検討を行った。神経幹細胞に thapsigargin を処置した後に DNA 結合活性変化を Western blotting および Gel Shift アッセイを応用した No Shift 法にて評価した (図 4)。エタノールの結果と同様に thapsigargin によって DNA 結合活性および蛋白質発現が増加することを認めた。

<図 4>



<図 5>



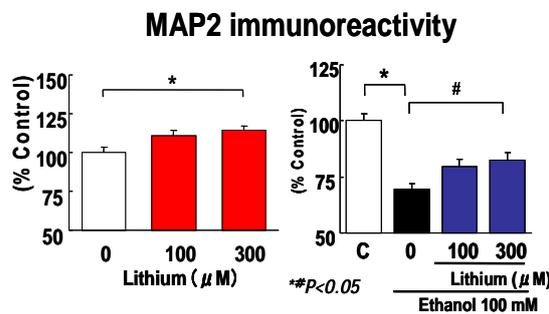
以上の結果より、アルコールは小胞体機能を変化させ、さらに小胞体機能変化を介して、NRSF の活性は増加して、神経細胞への分化抑制が起こることが示された。

また、小胞体機能変化による NRSF の活性変化は、一部には ERK を介する経路も存在する可能性が考えられた。(図 5)

(5)リチウムがエタノールの神経分化抑制作用に及ぼす影響

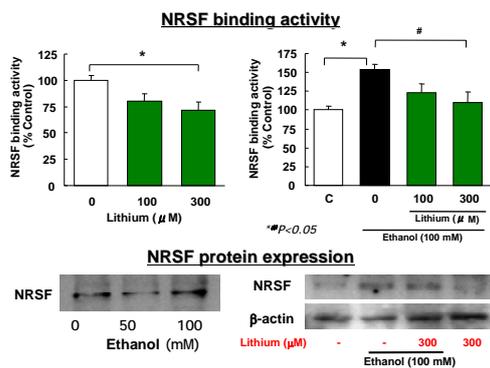
リチウムは、アルコール使用に関連した気分障害を含めた気分障害の治療に一般に用いられるが、近年になって神経新生促進作用あるいは神経保護作用を有することが知られている。リチウムを、実際の治療で用いられる濃度で神経幹細胞に処置したところ、神経細胞への分化増加が認められた(図 6 左)。さらに、リチウムはエタノールによる分化抑制作用を軽減させた(図 6 右)。

<図 6 >



次にリチウムが NRSF/REST に及ぼす影響について検討を行った。図 7 に示すようにリチウムは NRSF/REST の結合活性を低下させ、エタノールによって増加した結合活性を低下させることを認めた。Western blotting 法における解析においても、リチウムはエタノールによる NRSF/REST 蛋白質発現の増加を減少させた。

<図 7 >



上記の結果より、リチウムは転写抑制因子 NRSF/REST を介して、エタノールによる神経分化抑制作用を軽減すると考えられ、このような NRSF/REST の結合活性を減弱させる処置が、アルコールによる脳機能異常を回復させる可能性が示唆された。

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 4 件)

①Ishii T, Hashimoto E, Ukai W, Tateno M, Yoshinaga T, Saito S, Sohma H, Saito T. Lithium-induced suppression of transcription repressor NRSF/REST: effects on the dysfunction of neuronal differentiation by ethanol. *European Journal of Pharmacology* 593: 36-34, 2008. (査読有)

②石井貴男, 橋本恵理, 鶴飼渉, 館農勝, 吉永敏弘, 小野貴文, 渡邊公彦, 齋藤諭, 齋藤利和: アルコールによる脳障害とエピジェネティクス・ジェネティクス制御機構. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 2008, 43: 705-713 (査読有)

③鶴飼渉, 石井貴男, 吉永敏弘, 館農勝, 橋本恵理, 小野貴文, 渡邊公彦, 渡邊一平, 白坂智彦, 齋藤利和: アルコールによる脳神経回路障害のメカニズムとその修復法の探索. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 2008, 43: 763-769 (査読有)

④石井貴男, 鶴飼渉, 館農勝, 吉永敏弘, 小野貴文, 渡邊公彦, 齋藤諭, 橋本恵理, 齋藤利和, 相馬仁: エタノールによる神経幹細胞の分化制御 小胞体機能に関わる分子変動の解析. *アルコールと医学生物学* 2007, 27: 16-23 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

①Ishii T, Ukai W, Tateno M, Yoshinaga T, Ono T, Saito S, Hashimoto E, Saito T: The effect of antidepressants on ethanol inhibition of neuronal differentiation: the alteration of CREB/NRSF regulation in neural stem cell. *The 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience* November 12-15, Washington DC, USA, 2008

②Ishii T, Yoshinaga T, Ukai W, Hashimoto E, Tateno M, Ono T, Shirasaka T, Saito S, Saito T. (Symposium) The approach of reconstruction of damaged brain function by ethanol: Translational research of repairing therapy for the damaged brain by ethanol. *The 2nd World Federation of Societies of Biological Psychiatry Asia-Pacific Congress* Sep 11-13: Toyama, Japan, 2008.

③Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Tateno M, Ono T, Watanabe K, Hashimoto E, Saito S, Saito T. The alteration of CREB/NRSF regulation in the neural stem cell dysfunction by ethanol. The Joint Congress of 31th Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism / 14th Annual Meeting of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism June 28-July 2: Washington DC, USA, 2008.

④Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Tateno M, Ono T, Watanabe K, Hashimoto E, Saito S, Saito T. (Symposium) Alcohol-induced brain damage: new findings from the Asian-Pacific region: The common aspects of pathophysiology of alcoholism and depression. The Joint Congress of 31th Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism / 14th Annual Meeting of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism June 28-July 2: Washington DC, USA, 2008.

⑤Ishii T, Ukai W, Tateno M, Yoshinaga T, Ono T, Saito S, Hashimoto E, Saito T. The effect of lithium on ethanol inhibition of neuronal differentiation: role for transcription repressor NRSF. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience November 3-7: San Diego, USA, 2007.

⑥石井貴男, 鶴飼渉, 吉永敏弘, 館農勝, 橋本恵理, 齋藤諭, 齋藤利和: Trichostatin Aは転写制御変化を介してアルコールによる神経新生異常を抑制する. 第19回日本アルコール精神医学会・第10回日本ニコチン・薬物依存研究フォーラム第42回日本アルコール・薬物医学会・平成19年度合同学術総会, 大津, 2007年, 9月28-29日.

⑦鶴飼渉, 石井貴男, 吉永敏弘, 館農勝, 橋本恵理, 齋藤諭, 齋藤利和: (シンポジウム) エタノールによる神経幹細胞機能異常の細胞内メカニズム解析. 「アルコール・薬物依存の基礎研究の動向」第19回日本アルコール精神医学会・第10回日本ニコチン・薬物依存研究フォーラム第42回日本アルコール・薬物医学会・平成19年度合同学術総会, 大津, 2007年, 9月28-29日.

⑧Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Tateno M, Hashimoto E, Saito S, Saito T. (Symposium) Signaling Mechanisms in Alcohol dependence and neurotoxicity: The alteration of CREB/NRSF regulation in the

neurogenesis dysfunction by ethanol. 11th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism September 23-26: Berlin, Germany, 2007.

⑨石井貴男, 鶴飼渉, 吉永敏弘, 小野貴文, 館農勝, 渡邊公彦, 齋藤諭, 橋本恵理, 齋藤利和: エタノールによる神経幹細胞の分化機能変化に及ぼすリチウムの影響. 第29回日本生物学的精神医学会, 第37回日本神経精神薬理学会合同年会, 札幌, 2007年7月11-13日.

⑩鶴飼渉, 石井貴男, 吉永敏弘, 館農勝, 橋本恵理, 畠山佳久, 齋藤諭, 齋藤利和: (シンポジウム) アルコールによる脳神経回路網の異常: 神経幹細胞を用いた修復の試み. 第29回日本生物学的精神医学会, 第37回日本神経精神薬理学会合同年会, 札幌, 2007年7月11-13日.

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 貴男 (Ishii Takao)

札幌医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号: 40404701