

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20240038

研究課題名（和文） 内分泌系の恒常性破綻による感情障害発症の分子基盤

研究課題名（英文） Study for the molecular basis of affective disorders caused by the dysregulated homeostasis of endocrine system

研究代表者

祖父江 憲治 (SOBUE KENJI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20112047

研究成果の概要（和文）：胎生後期のグルココルチコイド（GC）曝露による一過性大脳発達遅滞は、神経前駆細胞で GC 受容体（GR）を介するカルデスモン発現増加に伴う細胞運動異常が要因であることを見出した。この一過性大脳発達遅滞後に、思春期脳で神経回路網形成不全が起こることを MRI により見出した。この所見は、周産期 GC 曝露後の行動異常発現や感情障害発症の有力な根拠となる。GC 非存在下でシナプス形成に至る長期神経細胞培養系を確立し、GC のシナプス形成への影響を検討した。GC 曝露で成熟神経細胞のシナプス形成脆弱化が起こり、カルデスモン発現低下によるシナプスでのアクチンフィラメント不安定化に起因すること、GC によるカルデスモン発現低下は、GR を介した SRF 共役因子（MRTF-B）の発現低下によるものであることを明らかにした。本研究は、GC を介する内分泌系恒常性破綻に伴う感情障害発症の有力な分子基盤となるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that glucocorticoid(GC)-dependent transient retardation during cerebral development was caused by the disturbance of neuronal migration via the GC receptor (GR)-dependent upregulation of caldesmon expression. After this transient retardation, insufficient neuronal network formation was found in the adolescent brain as revealed by MRI. These findings provide a novel insight regarding behavioral abnormalities and increased risks of affective disorders. We further established a GC-deficit neuronal cell culture system in which neurons can form synapses. Using this culture system, GCs were demonstrated to be detrimental for synaptic formation via the destabilization of actin filaments mediated by the downregulation of caldesmon expression. We also showed that the expression of caldesmon was downregulated by suppression of SRF co-regulator MRTL-B. Thus this study presents the molecular basis for understanding the onset of affective disorders caused by the dysregulation of GC-linked endocrine system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	24,700,000	7,410,000	32,110,000
2009 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
総計	39,700,000	11,910,000	51,610,000

研究分野：脳・神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：①感情障害 ②グルココルチコイド ③ストレス ④大脳形成障害
⑤シナプス形成障害

1. 研究開始当初の背景

ストレスを始めとする外的環境要因による内分泌系恒常性の破綻は、うつ病・パニック障害・PTSD など感情障害の発症原因として有力視されてきた。成人期におけるストレスと感情障害の濃厚な相関は言うに及ばず、ストレスを受けた母親由来あるいは医原性に副腎皮質ステロイドホルモン（以下、グルココルチコイド; GC と略）の曝露を受けた胎児が成育後にうつ症状や行動異常を示す例はこれまで数多く報告されている。動物実験においても、胎生後期のストレス/GC 曝露により、成熟後に不安・恐怖反応亢進による異常行動が出現する。また、ヒト周産期と動物モデルの胎生後期のいずれのストレス/GC 曝露においても、大脳皮質の一過性発達遅滞と、シナプス形成の脆弱化が起こることが知られている。

このように、ストレスに伴う視床下部/下垂体/副腎皮質 (HPA) 系恒常性破綻による大脳発達障害・シナプス形成の脆弱化と行動異常の出現など現象論的解析の報告は数多いが、分子メカニズムの解析には至っていなかった。同様に、成人期のストレス/GC 曝露による感情障害患者の剖検脳で、海馬・前頭前野のシナプス脆弱化が著明であることも知られているが、この分子メカニズムも不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、ストレスのメディエーターである GC を介する内分泌系恒常性破綻に伴う大脳皮質形成障害とシナプス形成異常・脆弱化を脳発達期と成熟期の両面から解析し、感情障害発症の分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳発達期と成熟期の GC 曝露に伴う細胞骨格蛋白質・シグナル伝達分子・転写因子・シナプス特異的蛋白質群などの発現変化（生化学・免疫組織化学的手法と網羅的遺伝子発現解析法）と、これに起因する神経前駆細胞の細胞運動障害による大脳皮質と神経回路網形成異常の解析 (MRI、免疫組織化学、細胞培養系を用いた real-time イメージング法)。

(2) GC 異常によるシナプス形成とダイナミクス障害解析に向けた新規神経細胞培養系の確立、さらにこの培養系を用いた real-time イメージング法による分子メカニズムの解析。

4. 研究成果

(1) 胎生後期 GC 曝露後の一過性大脳発達遅滞に関する分子メカニズムと神経回路網形成障害（動物モデル）

GC 曝露による一過性大脳発達遅滞の要因の一つが、BrdU ラベリング法を用いた解析から興奮性神経前駆細胞の細胞運動 (radial migration) 障害であることを見出した。次いで GC 曝露が培養神経前駆細胞の細胞形態と運動障害を来すこと、網羅的遺伝子さらに蛋白質発現解析の結果、GC 曝露によりアクチン細胞骨格制御蛋白質の中で唯一カルデスモン (caldesmon) の発現亢進が起こり、神経前駆細胞の細胞形態と運動障害に至ることを解明した。そこで、ラット胎児脳へ経胎盤的 (in utero electroporation) に遺伝子を注入し興奮性神経前駆細胞でカルデスモンを過剰発現させると、BrdU ラベリングの結果と同様に、興奮性神経前駆細胞の一過性細胞運動障害が起こることを実証した (Mol. Psychiatry 14, 1119, 2009; Cell Adh. Migr. 4, 185, 2010)。また、カルデスモン発現亢進は、GC 受容体を介したカルデスモン遺伝子転写亢進によることも明らかにした (J. Biol. Chem. 283, 36683, 2008; Mol. Psychiatry 14, 1119, 2009)。同様の方法で、抑制性神経前駆細胞の細胞運動 (tangential migration) 障害もカルデスモン発現亢進が関与することを見出した (Cell Adh. Migr. 4, 185, 2010; in preparation; 図 1)。

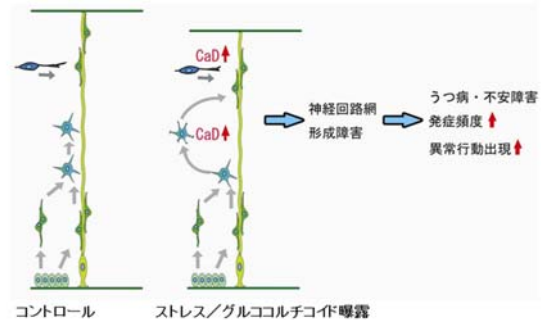


図 1. 大脳皮質形成期のストレス/GC 曝露による神経前駆細胞でのカルデスモン (CaD) 発現亢進に伴う運動障害により、一過性大脳発達障害を来す。その後、発達障害は回復するが、うつ病・不安障害発症頻度の増加 (ヒト) と異常行動が出現 (動物モデル)。

これまでストレス/GC 曝露による一過性大脳発達遅滞の分子メカニズムに関する報告はなく、本研究は世界に先駆けた成果である。GC によるアクチン細胞骨格制御の具体例としても大きなインパクトを有する。現在、カルデスモン遺伝子のコンディショニング欠損マウスの作製が終了しており、大脳皮質形成期のカルデスモンとアクチン系細胞骨格の役割、行動異常出現との相関などについて解析を行っている。

GC 曝露による大脳発達遅滞は一過性でその後の発達は正常と有意差はなくなるが、思春期以降に行動異常が出現したり精神疾患発症頻度が増加する。このメカニズムについ

ても不明であった。そこで胎生後期に GC 曝露を受けた思春期ラット脳の神経回路網を 11.3 テスラ MRI を用いた DTI 法と免疫組織化学法により解析し、脳梁形成や海馬／線状体と前頭前野／扁頭体の神経回路網形成不全を見出した (in preparation)。本研究成果もこれまでに報告例はなく、周産期 GC 曝露による一過性大脳発達遅滞後の行動異常出現や精神疾患発症の有力な根拠となるものと期待おり (図 1)、さらなる詳細な解析を進行中である。

(2) GC 非存在下の完全合成培地による長期神経細胞培養系確立と GC によるシナプス形成とダイナミクス障害の解析

①シナプス形成とダイナミクスの解析に向けた基礎研究

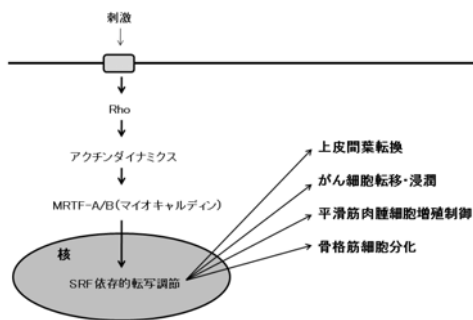


図 2. SRF 転写調節を介した MRTF-A/B (マイオカルディン) による細胞運動機能制御

カルデスモンを始めとしたアクチン系細胞骨格蛋白質、シナプス特異蛋白質、シグナル伝達分子、転写因子群によるシナプス形成とダイナミクスの解析に関して、神経細胞のみならず非神経細胞の細胞運動モデル系 (上皮間葉転換・がん細胞転移と浸潤・骨格筋細胞分化など) を用いて解析し、Rho シグナル→アクチンダイナミクス制御→ MRTF-A/B (マイオカルディン、myocardin) →SRF-依存性転写調節 (アクチン系細胞骨格蛋白質発現調節) による細胞運動制御を明らかにした (図 2; J. Cell Biol. 179, 2007; J. Biol. Chem. 283, 21230, 2008; Cancer Res. 70, 501, 2010; Carcinogenesis 31, 1185, 2010; J. Biol. Chem. 285, 37314, 2010; Cell Adh. Migr. 4, 150, 2011)。殊に、MRTF-A/B による上皮間葉転換制御とマイオカルディンによる平滑筋肉腫の細胞増殖制御は最初の報告である。また、本研究は「③GC によるシナプス形成とダイナミクス障害の解析」の重要な根拠を与えるものとなった。

②GC の混在しない完全合成培地による長期神経細胞培養系の確立

シナプス形成に至る長期神経細胞培養系において、GC の存在あるいは混在はこれまで不可避であり、従って純粋にシナプス形成に

及ぼす GC の役割や障害の解析は困難であった。本研究では、GC を全く含まずシナプス形成に至る完全合成培地を用いた長期神経細胞培養系を確立し、GC 効果の解析が初めて可能となりその有用性が実証された。

意外なことに GC 非存在下でシナプス形成とシナプス機能は活発であり、GC 濃度依存性にこの活性が抑制される。さらにストレスレベルの GC 濃度で、著明なシナプス形成脆弱化が起こることを見出した (in preparation)。培養系自体が最初の例であり、本研究の独創的な点である。従って本培養系を用いることにより下記の知見が得られたと共に、今後さらなる新知見が期待出来る。

③GC によるシナプス形成とシナプスダイナミクス障害の解析

前述の GC 濃度依存性シナプス形成脆弱化を解析した。シナプス (殊にシナプス後部構造、スパイン) におけるアクチンダイナミクスの解析の結果、GC によるカルデスモン発現低下に伴うアクチンフィラメント不安定化がシナプス形成脆弱化を引き起こすことが判明した。(図 3A)。また、GC による成熟神経細胞でのカルデスモン発現抑制は、前述の神経前駆細胞での GC 受容体を介するカルデスモン遺伝子の直接的転写活性化とは異なり、非神経細胞で解明した図 2 のアクチン細胞骨格遺伝子転写制御系の中でも MRTF-B 特異的転写抑制に伴うカルデスモン遺伝子発現低下によるものであることを明らかにした (図 3B; submitted)。

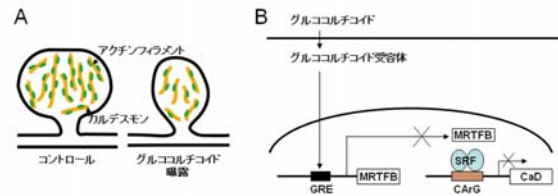


図 3. GC 曝露によるアクチンフィラメント不安定化に伴うシナプス (スパイン) 形成の脆弱化 (A) と GC を介するカルデスモン発現制御 (B)

シナプス特異的モノクローナル抗体を用いて見出したシナプス蛋白質・GRIN1 は、スパイン局在のみならずスパイン形成に必須であること、GC 反応性に発現制御を受けることを見出した (submitted)。シナプス成熟に必須の蛋白質として発見した PSD-Zip70 の遺伝子欠損マウスを作製し、PSD-Zip70 が Rap 系活性制御によりシナプス成熟化に関与することを解明した (in preparation)。併せて、ストレス/GC による PSD-Zip70 発現制御とシナプス成熟化への影響を解析中である。神経細胞極性に mTOR-p70S6K 系を介する CRMP2 と tau の翻訳制御が関与することを明らかにした (J. Biol. Chem. 284, 27734, 2009)。

以上の如く、われわれの開発した完全合成培地による長期神経培養系とこれを用いた

シナプス形成とダイナミクスの解析は、他に追従を許さない独壇場であり、さらなる追究を行っている。

研究室の岩手医科大学移転準備途上に東日本大震災に遭遇し、移転と研究室の立ち上げが遅れた。従って、本研究成果の中で投稿準備中と投稿中のものについては論文受理に数カ月の遅れが生じるものと予想している。

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 11 件)

- ① Sobue K. Letter from the guest editor. Special Focus: Actin-linked regulatory molecules. *Cell Adh. Migr.* 2011; 5(2):142-143. (査読有)
- ② Mayanagi T, Sobue K. Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. *Cell Adh. Migr.* 2011; 5(2):150-159. (査読有)
- ③ Nakamura S, Hayashi K, Iwasaki K, Fujioka T, Egusa H, Yatani H, Sobue K. Nuclear import mechanism for myocardin family members and their correlation with vascular smooth muscle cell phenotype. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(48):37314-37323. (査読有)
- ④ Yoshio T, Morita T, Tsujii M, Hayashi N, Sobue K. MRTF-A/B suppress the oncogenic properties of v-ras- and v-src-mediated transformants. *Carcinogenesis.* 2010; 31(7):1185-1193. (査読有)
- ⑤ Sobue K, Fukumoto K. Caldesmon, an actin-linked regulatory protein, comes across glucocorticoids. *Cell Adh. Migr.* 2010; 4(2):185-189. (査読有)
- ⑥ Kimura Y, Morita T, Hayashi K, Miki T, Sobue K. Myocardin functions as an effective inducer of growth arrest and differentiation in human uterine leiomyosarcoma cells. *Cancer Res.* 2010; 70(2):501-511. (査読有)
- ⑦ Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T, Sobue K. Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp. Cell Res.* 2010; 316(6):940-950. (査読有)
- ⑧ Morita T and Sobue K. Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(40): 27734-27745. (査読有)
- ⑨ Fukumoto K, Morita T, Mayanagi T, Tanokashira D, Yoshida T, Sakai A and Sobue K. Detrimental effects of glucocorticoids

on neuronal migration during brain development. *Mol. Psychiatry* 2009; 14(12): 1119-1131. (査読有)

⑩ Mayanagi T, Morita T, Hayashi K, Fukumoto K, Sobue K. Glucocorticoid receptor-mediated expression of caldesmon regulates cell migration via the reorganization of the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(45):31183-31196. (査読有)

⑪ Iwasaki K, Hayashi K, Fujioka T, Sobue K. Rho/Rho-associated kinase signal regulates myogenic differentiation via myocardin-related transcription factor-A/Smad-dependent transcription of the Id3 gene. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(30):21230-21241. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Yasunori Kimura, Tsuyoshi Morita, Ken'ichiro Hayashi, Tsuneharu Miki, Kenji Sobue. Myocardin functions as an effective inducer of growth arrest and differentiation in human leiomyosarcoma cells. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22-9 月 24 日 (大阪)
- ② Seiji Nakamura, Ken'ichiro Hayashi, Kazuhiro Iwasaki, Hiroshi Egusa, Hirofumi Yatani, Kenji Sobue. Nuclear import mechanism of myocardin family members. 第 62 回日本細胞生物学会大会 2010 年 5 月 19 日-5 月 21 日 (大阪)
- ③ 福本 健太郎, 森田 強, 真柳 平, 田之頭 大輔, 吉田 智之, 酒井 明夫, 祖父江 憲治 グルココルチコイドによるカルデスモンの発現上昇を介した大脳皮質形成障害 第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 16 日-9 月 18 日 (名古屋)
- ④ 森田 強, 祖父江 憲治 Specification of neuronal polarity mediated by mTOR-regulated local translation of CRMP2 and tau. 第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 16 日-9 月 18 日 (名古屋)
- ⑤ 福本 健太郎, 森田 強, 真柳 平, 田之頭 大輔, 吉田 智之, 酒井 明夫, 祖父江 憲治 新皮質発生時におけるグルココルチコイド誘発性のカルデスモン亢進による神経細胞移動の障害 第 61 回日本細胞生物学会大会 2009 年 6 月 2 日-6 月 4 日 (名古屋)
- ⑥ Tsuyoshi Morita, Kenji Sobue. Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and tau via the mTOR-p70S6K pathway. 第 61 回日本細胞生物学会大会 2009 年 6 月 2 日-6 月 4 日 (名古屋)
- ⑦ 中村 誠志, 林 謙一郎, 岩崎 一洋, 江草 宏, 矢谷 博文, 祖父江 憲治 Importin $\alpha 1/\beta 1$ により制御される転写

調節因子myocardinの核内輸送におけるN待つbasic domainの役割 第61回日本細胞生物学会大会 2009年6月2日-6月4日 (名古屋)

⑧ 岩崎 一洋、林 謙一郎、藤岡 知昭、祖父江 憲治 RhoA依存的骨格筋細胞分化の分子メカニズムの解析 第97回日本泌尿器科学会総会 2009年4月16日-4月19日 (岡山)

⑨ 祖父江 憲治 先進医療に向けた脳研究のアプローチ 動脈硬化症・癌・精神疾患 異質な疾患群へ戦略 第20回日本脳循環代謝学会総会 2008年11月6日、7日 (東京)

⑩ 岩崎 一洋、林 謙一郎、藤岡 知昭、祖父江 憲治 RhoA依存的骨格筋細胞分化の分子メカニズムの解析 第73回日本泌尿器科学会東部総会 2008年9月18日-20日 (東京)

⑪ 祖父江 憲治、福本 健太郎、真柳 平 脳皮質形成のメカニズム 神経化学からの貢献 グルココルチコイドにより誘導される神経細胞移動障害の分子メカニズム 第51回日本神経化学学会大会 2008年9月11日-13日 (富山)

⑫ Tsuyoshi Morita, Toshiyuki Yoshio, Kenji Sobue, Caldesmon suppresses the invasiveness of RSV-transformant and cancer cells by regulating podosome/invadopodium formation and dynamics. 第61回日本細胞生物学会大会 2008年6月29日-7月1日 (横浜)

⑬ Tsuyoshi Morita, Taira Mayanagi, Kenji Sobue. Dual roles of MRTFs in epithelial-mesenchymal transition: Induction of slug expression and remodeling of the actin cytoskeleton. 第60回日本細胞生物学会大会 2008年6月29日-7月1日 (横浜)

[図書] (計 1件)

① 石川 統, 黒岩 常祥, 塩見 正衛, 松本 忠夫, 守 隆夫, 八杉 貞雄, 山本 正幸編集 生物学辞典, 東京化学同人, 2010年12月10日発行, 388ページ、523ページ

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kokoro/group.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祖父江 憲治 (SOBUE KENJI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 20112047

(2) 研究分担者

林 謙一郎 (HAYASHI KEN' ICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 90238105

森田 強 (MORITA TSUYOSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 80403195

真柳 平 (MAYANAGI TAIRA)
大阪大学・連合小児発達学研究所・
特任助教 (常勤)

研究者番号: 20432544

福本 健太郎 (FUKUMOTO KENTARO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 00514407

(3) 連携研究者

()

研究者番号: