

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20390318

研究課題名（和文） 神経栄養因子受容体の精神疾患における役割に関する研究

研究課題名（英文） Role of neurotrophin receptor p75 in psychiatric diseases

研究代表者

功刀 浩 (KUNUGI HIROSHI)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第三部 部長

研究者番号：40234471

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳由来神経栄養因子などのニューロトロフィンとその受容体の精神疾患における役割を明らかにすることを目的として、ニューロトロフィン共通の低親和性受容体であるp75^{NTR}を前脳特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作成した。サザンブロット、ウエスタンブロットと免疫組織化学的染色によって、目的とする大脳皮質、海馬での過剰発現が見られることを確認した。独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター マウス表現型解析開発チームの協力を得て行動解析を行い、尾懸垂試験や異動運動量での異常を見出した。さらに、この遺伝子の機能多型Ser205Leuと大うつ病性障害についての関連を報告した。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the role of neurotrophins such as brain-derived neurotrophic factor and their receptors in psychiatric disease. In this study, we generated novel transgenic mice that overexpress p75^{NTR} specifically in the forebrain. Transgenic mice were identified based on southern blot analysis. Western blotting and immunohistochemical staining were used to determine the expression pattern of the transgene. We observed the very high levels of p75^{NTR} protein in the hippocampus and cortex lines, but not in cerebellum in these analyses. According to the results of autopsy, the general morphology of brains of adult transgenic mice appeared normal. We have been conducted cooperative research on behavioral analysis with technology and Development Team for Mouse Phenotype Analysis, RIKEN BioResource Center. Our transgenic mice were estimated by light/dark transition, open-field test, home-cage activity test, passive avoidance test, tail suspension test, hot-plate test, tail-flick test. Then, they showed hyper-activity. Furthermore, we reported evidence supporting the association between the Ser205Leu polymorphism of p75^{NTR} and MDD in our original sample and in the meta-analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000円	2,040,000円	8,840,000円

2009年度	2,400,000円	720,000円	3,120,000円
2010年度	2,400,000円	720,000円	3,120,000円
2011年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
年度	0	0	0
総計	13,100,000円	3,930,000円	17,030,000円

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：遺伝子、神経科学、脳神経疾患、薬理学、神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

神経栄養因子(NGF)、BDNF、NT-3などのニューロトロフィンは、中枢神経系の発達、分化、生存、維持、新生、可塑性などにおいて重要な役割を果たしており、とりわけ BDNF は、神経変性疾患や、統合失調症・気分障害などの精神疾患においても鍵分子となることを示唆する所見が増えている。例えば、抗うつ薬は BDNF の発現を高め、これが治療効果と関連することが示唆されている。また、気分障害患者の血中 BDNF 濃度や死後脳における BDNF 発現量が低下しているという所見も再現性が高い。心理的ストレスは、BDNF の発現を低下させることも知られている。ニューロトロフィンには、それぞれの分子に特異的な受容体(TrkA, TrkB, TrkC)と、共通の受容体である p75^{NTR} とが存在する。Trk は主として神経栄養作用をもたらすが、p75^{NTR} (neurotrophin receptor)は、腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーに属する分子であり、ニューロン軸索の伸長阻害やアポトーシスの誘導作用をもつことが明らかにされ、注目されている。

我々はこれまでに精神疾患と神経栄養因子との関連について、分子遺伝学的方法や細胞生物学的方法によって長年検討してきた。BDNF の新規遺伝子変異を世界に先駆けて見出し、統合失調症、アルツハイマー病と関連

する可能性について報告したほか(Kunugi et al: Mol Psychiatry 2001; Nanko et al: Schizophr Res 2003)、BDNF の転写を制御する遺伝子多型を同定し、双極性障害の発病リスクと関連することを見出した(Okada et al: Mol Psychiatry 2006)。さらに、p75^{NTR} のアミノ酸置換型 SNP (Ser205Leu)が、うつ病や自殺行動と関連することも世界に先駆けて報告した(Kunugi et al: Am J Med Genet 2004)。すなわち、Ser205 型対立遺伝子がうつ病や自殺行動のリスクを高めることを見出した。その後、この SNP が抗うつ薬の治療反応性を規定するという報告も海外の他の研究施設から出てきている。以上の知見から、p75^{NTR} は、うつ病などの精神疾患において役割を果たしているのではないかという仮説をたてた。しかし、p75^{NTR} と精神疾患との関連やこの分子を標的にした治療法の開発に関する研究は意外にも殆どないのが現状である。

2. 研究の目的

精神神経疾患(統合失調症、気分障害、神経変性疾患など)の病態の鍵分子として、脳由来神経栄養因子(BDNF)をはじめとする神経栄養因子が注目されている。そこで本研究では、ニューロトロフィン共通の受容体 p75^{NTR} に注目し、精神神経疾患における役割を解明

することを目的にする。本研究によって、p75^{NTR} が果たす高次機能や精神疾患における役割に迫り、精神疾患モデル動物の作成、治療薬の開発につなげ、学術的にも臨床医学的にも意義深い研究とすることを目標とする。

3. 研究の方法

- (1) p75^{NTR} 遺伝子を前脳特異的に過剰発現する遺伝子改変マウスを作成し、その行動解析、分子病態の解析を行う。
- (2) この動物やその他のうつ病モデル動物を用いて、p75^{NTR} の拮抗薬が精神疾患治療薬として有用である可能性について検証する。
- (3) 申請者らの先行研究によってうつ病と関連がみられた p75^{NTR} タンパクのアミノ酸置換 (Ser205Leu) がタンパクにいかなる機能変化を与えるかについて、細胞生物学的に明らかにする。

4. 研究成果

遺伝子改変動物作成のためのコンストラクトの作成から始め、これまでに p75^{NTR} を前脳特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作成に成功した。結果として4系統の p75^{NTR} 過剰発現マウスにおいて、ライン A およびライン B では 100 コピー、ライン C では 30 コピー、ライン D では 10 コピーがゲノムに組み込まれていた。これらはウエスタンブロットによる実験と免疫組織切片染色の実験から、目的とする大脳皮質、海馬での過剰発現が見られることを確認した。また一方で、小脳では野生型との変化がないことも確認できているため、これらのマウスのラインは部位特異的な p75^{NTR} の過剰発現マウスとして確立できたとしている。

行動解析については、独立行政法人理化学

研究所・バイオリソースセンター マウス表現型解析開発チームの協力を得ている。既に、つくばの理化学研究所の施設にマウスを一部移し、第一段階として行動解析用に繁殖させ、明暗往来試験、オープンフィールドテスト (図 1)、受動的回避学習試験、尾懸垂試験 (図 2)、ホームケージテスト (図 3)、ホットプレートテスト、テールフリックテストを行い、解析した。その結果、オープンフィールドテスト (図 1) では活動量が増加しており、ホームケージテスト (図 3) でもトランスジェニックマウスでの有意な活動量の増加が観察された。一方で、尾懸垂試験 (図 2) ではトランスジェニックマウス側で無動時間が有意に増加しており、鬱様行動の増強が確認できており、興味深い精神疾患モデルマウスが構築できたとと言える。

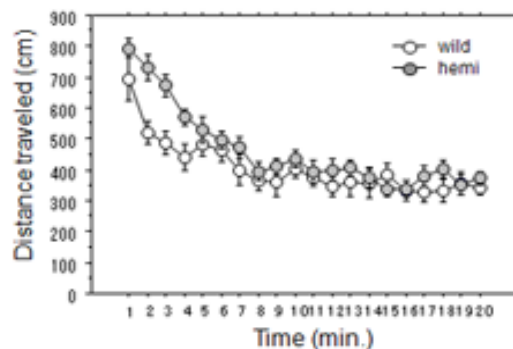


図 1 オープンフィールドテストの結果

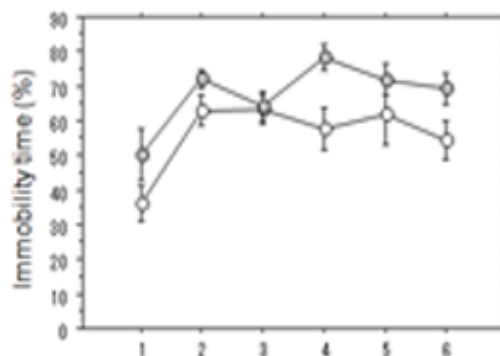


図 2 尾懸垂試験の結果

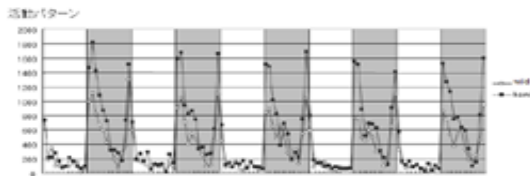


図3 ホームケージテストによる結果

組織化学的解析については、大脳皮質、および海馬に着目して、パルバルブミン陽性細胞、カルビンジン陽性細胞の構造的な変化を観察して精神疾患マウスとしての有用性を検証している。

また、マイクロアレイによる海馬での発現遺伝子の変化を調べた結果、これまで精神疾患で発現の増減が見られるとする遺伝子で発現の変化が確認できており、これについては qPCR 等による確認が必要である。

p75^{NTR} の拮抗薬であることが報告されている低分子化合物 LM11A をマウスに投与し、行動実験を行ったが、著明な行動変化はみられなかった。

また、p75^{NTR} 自身、もしくはそのシグナル伝達と関与することが期待されている分子の関連解析も並行して行なうなかで、p75^{NTR} タンパクのアミノ酸置換 (Ser205Leu) を与える遺伝子多型とうつ病との関連について、独立のサンプルで解析を行い、関連が再現されることを確認し、過去の解析結果をすべて統括したメタ解析も行い論文として発表した。また、機能解析を行うためにアミノ酸置換を生じしている組み換えタンパク質を作成し、培養ニューロンに過剰発現させたところ、Ser205 型の方が、Leu205 型に比較して、細胞生存率が高いことを見出した (図4)。

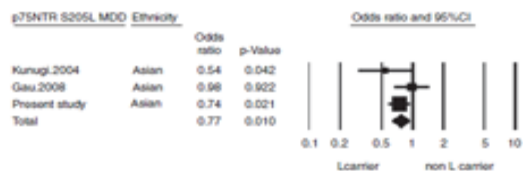


図4 新規サンプルによる我々の結果とメタ解析による結果

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 5 件)

① Support for association between the Ser205Leu polymorphism of p75 (NTR) and major depressive disorder. Fujii T, Ota M, Hori H, Sasayama D, Hattori K, Teraishi T, Yamamoto N, Hashikura M, Tatsumi M, Higuchi T, Kunugi H. J Hum Genet. 2011 Nov;56(11):806-9. 査読有り
DOI: 10.1038/jhg.2011.107

② Interface between hypothalamic - pituitary - adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression. Kunugi H, Hori H, Adachi N, Numakawa T. Psychiatry Clin Neurosci. 2010 Oct; 64 (5) :447-59. DOI: 10.1111/j.1440-1819.2010.02135.x. 査読有り

③ p75NTR as a therapeutic target for neuropsychiatric diseases. Fujii T, Kunugi H. Curr Mol Pharmacol. 2009 Jan; 2(1):70-6. 査読有り
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021447>

④ Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: New data and meta-analysis. Fukumoto N, Fujii T, Combarros O, Kamboh MI, Tsai SJ, Matsushita S, Nacmias B, Comings DE, Arboleda H, Ingelsson M, Hyman BT, Akatsu H, Grupe A, Nishimura AL, Zatz M, Mattila KM, Rinne J, Goto Y, Asada T, Nakamura S, Kunugi H. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5;153B(1):235-42. 査読有り DOI: 10.1002/ajmg.b.30986

⑤ Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC-gamma signaling for glutamate release via a glutamate transporter. Numakawa T, Kumamaru E, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Kunugi H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 13;106(2):647-52. 査読有り DOI: 10.1073/pnas.0800888106

[学会発表] (計 3件)

① 藤井 崇: 大うつ病性障害における p75NTR 遺伝子のミスセンス多型 Ser205Leu の解析. 第 34 回日本神経科学会, 横浜, 2011 年 9 月 16 日.

② 功刀 浩: グルココルチコイドと神経栄養因子を鍵分子とした精神疾患研究. 第 2 回生物学・化学・情報科学融合のための戦略的先進理工学研究基盤の形成 (FBT)・超専攻型融合テーマスタディクラスター教育 (TSC-PBL) ジョイントシンポジウム, 東京, 1. 23, 2010

③ 藤井 崇: BDNF 遺伝子の機能多型 Val66Met とアルツハイマー病発症との女性特異的関

連. 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 2009 年 9 月 26 日.

[図書] (計 1 件)

① 功刀 浩: うつ病の BDNF 仮説. 最新うつ病のすべて (樋口輝彦編) 別冊・医学のあゆみ, 医歯薬出版, 東京, pp 184-189, 2010. 査読無

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

報道関連情報

「BDNF の Val66Met 多型は女性ではアルツハイマー危険因子、国立精神・神経セが世界 16 機関からタイピングデータの協力得る (日本人類遺伝学会第 54 回大会、発表者 藤井崇)」
日経バイオニュース 2009 年 9 月 29 日
<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/oc/2006/5641/>

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r3/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

功刀 浩 (KUNUGI HIROSHI)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部・部長

研究者番号: 40234471

(2) 研究分担者

沼川 忠広 (NUMAKAWA TADAHIRO)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部・室長

研究者番号：40425690

藤井 崇 (FUJII TAKASHI) 独立行政法

人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部・科研費研究員

研究者番号：10450610