

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591368

研究課題名（和文）

スパイン・ダイナミクスの障害を基盤とした難治性うつ病の病態解明と新規治療法開発

研究課題名（英文）

Elucidation of pathophysiology of refractory depression and development of newer treatment based on the disturbance of spine dynamics

研究代表者

森信 繁 (MORINOBU SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30191042

研究成果の概要（和文）：

難治性うつ病の原因として、海馬での樹状突起スパインの形成障害によるシナプスの減少が推論されている。この仮説を検証する目的で、母子分離と学習性無力による難治療性うつ病モデルラットを作製し、1) 海馬でのスパイン形態の障害、2) 脳由来神経栄養因子(BDNF)発現の減少、3) マイクロ RNA132 の発現減少、4) マイクロ RNA134 は不変、5) TrkB 発現の減少、を報告した。このような結果は難治性うつ病の病態に海馬のシナプスの障害が関与し、その機序には BDNF-TrkB 情報系の低下が密接に関連しており、BDNF 遺伝子 3'側からのマイクロ RNA による発現減少の関連は乏しいことが分かった。

研究成果の概要（英文）：

The present study was undertaken to examine whether the decreased synaptic density through the spine abnormality in the hippocampus is involved in the pathophysiology of refractory depression. We developed a rat model of refractory depression using neonatal isolation and learned helplessness. The principal findings of this study were that 1) the spine length of dendritic spines was longer in the hippocampus of the model rats without any changes in spine density, 2) the immunoreactivity of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was decreased, 3) the levels of microRNA (miR)-132 were decreased, 4) the levels of miR-134 were not affected, 5) the immunoreactivity of TrkB was decreased. These findings suggested that the spine abnormality due to the decreased BDNF-TrkB signal in the hippocampus may be involved in the pathophysiology of refractory depression, with less contribution by downregulation of BDNF through miR regulation from the 3' region of the BDNF gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010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：分子精神医学

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：難治性うつ病、脳由来神経栄養因子、樹状突起スパイン、マイクロ RNA、海馬、母子分離、学習性無力、trkB 受容体

1. 研究開始当初の背景

選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)などの新規抗うつ薬の開発にもかかわらず、抗うつ薬治療に抵抗性を示す難治性うつ病患者はうつ病全体の約20%にものぼり、我が国のみならず世界的にも大きな社会的問題に発展している。これまで開発された抗うつ薬は、シナプス間隙のモノアミン濃度増大を起点に、アミン受容体以降の細胞内情報系の活性化を介して、脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現を亢進させ、シナプス後部を構成する樹状突起スパインの修復を引き起こすことで、抗うつ効果を発揮すると推論されている。しかしながらBDNF情報系への抗うつ薬の作用については、BDNF受容体であるtrkBのtyrosineリン酸化以後は未解明のままである。TrkB以後の情報系に障害があればBDNFによる神経修復作用が発揮されず、難治化する可能性がある。従って抗うつ薬によるtrkB受容体以後の情報系の変化を詳細に解析し、より直接的にtrkB受容体情報系に作用する治療戦略の開発が、うつ病難治化阻止には必要と思われる。

その一方で難治性うつ病の臨床研究から、うつ病難治化の要因には幼少期の不遇な環境に伴うストレス脆弱性の形成や、慢性ストレスに伴う頻回の再発による海馬の萎縮・神経細胞変性などがクローズアップされている。

本研究者らもうつ病難治化の要因であるストレス脆弱性形成の機序解明を行い、母子分離(NI)ラットはBDNF発現の低下や学習性無力状態(うつ病動物モデル)になりやすく抗うつ薬に抵抗性であり、その基盤には海馬LMK1発現の低下による未熟なスパイン形成のあることを報告してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの本研究者の成果を前提に、難治性うつ病ラットモデルを開発した上で、このモデルを用いてBDNF発現と共役してスパイン形成を制御しているLIMK1の発現を、マイクロRNA-134(miR-134)による翻訳制御の観点から明らかにし、BDNF-LIMK1シグナルによるスパイン・ダイナミクスの障害を基盤とした難治性うつ病発症機構を解明して新規治療法開発の基盤を築くことにある。同時にBDNF遺伝子の発現を3'側から制御している、複数のmiRの発現を解析することで、miRの発現変動がどのように難治性うつ病の病態に関与しているかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 難治性うつ病ラットモデルの開発

NIを受けて成長したラットを対象に学習性無力(LH)テストを行い、LHとなったラットを2週間後に再びLHテストに暴露して、2回

のテストともLHとなったラットを作製した。

NI処置:仔ラットを生後2日目から9日目まで1日1時間(午前中)、単独で母親・同胞から隔離した状態に置いた。その後は正常養育環境で生後21日目に離乳を行い、正常飼育下(3匹/ケージ)で飼育した。

LH処置:実験第1日目には、逃避不可能な条件でフットショック(0.8 mA, 15 sec)を80回(40分間の内の20分)与えた。実験第2日目には、同一環境であるもレバーを押すことでフットショックが回避出来る条件を設定し、合計15回のフットショック暴露に対して逃避する回数を計測した。15回の試験で逃避が5回未満のラットを、LHと評価した。

(2) miR発現計測法

mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion)を用いたmicroRNAの抽出:脳組織をミンチ状に細断し lysis buffer で溶解後、フェノール/クロロホルム抽出法にて精製することによってRNAをトラップし、専用の elution buffer による洗浄にてRNAを抽出した。

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems): 上記方法で得られたRNAとmiRNA専用primerを用いて、RT-PCR法でcDNAを合成した。

TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems): miR-134に特異的なreal-time PCR用のprimer set, TaqMan probeとTaqMan[®] Universal Master Mix (without AmpErase[®] UNG) (Applied Biosystems)を用いて、2)で合成されたcDNAをサンプルに7900HT Fast real-time PCRシステムにて発現定量を行った。

(3) BDNF, TrkBタンパク量の計測法:各タンパクに特異的な抗体を用いて、Western Blot法にて行った。

(4) スパイン形態の解析法:還流固定した脳組織のスライスを用いてGolgi染色を行い、スパインの密度・長さなどを計測した。

4. 研究成果

(1) 難治性うつ病ラットモデルの開発

上記方法にてNIラットおよび正常飼育で育ったラットに、第1回目LHテストを行いLHとなったラットを対象に、第2回目LHテストを行ったところ、有意にNI群で第2回目テストでもLHを呈することが分かった。この結果からNIラットはLHテスト負荷によって、うつ状態からの回復の悪い難治性うつ病モデルであることが示された。

(2) 海馬BDNF, TrkBタンパク発現の解析

難治性うつ病モデルラット海馬でのBDNF, TrkBタンパク発現を解析した結果、モデルラ

ットでは BDNF, TrkB の発現が正常飼育ラットと比較して減少していた。

(3) 海馬 miR 発現の解析

難治性うつ病モデルラット海馬での miR 発現を解析した結果、LIMK-1 の翻訳制御を行う miR-134 発現には、正常飼育群と比較して有意な差はみられなかった。BDNF の翻訳制御に関与する miR-103, -107 発現も、2 群間で有意な差はみられなかった。BDNF の転写に密接に関与する methyl-CpG-binding protein (MeCP)-2 の翻訳制御に関与する miR-132 の発現では、難治性うつ病モデル群で有意な減少がみられた。

(4) スパイン形態の解析：難治性うつ病への発症脆弱性を有した NI ラット海馬 CA3 領域では、正常飼育ラットと比較して、スパイン密度に変化はないが、スパインの長さが有意に長いことがみられた。

(5) 結果のまとめ

このような本研究の結果は、スパイン形成に密接に関与している BDNF-TrkB-LIMK-1 情報系の低下が、難治性うつ病の発症過程に関与していることを示唆している。同時にこの情報系の減少に関して LIMK-1 の発現を制御している miR-134 や、BDNF の発現を制御している miR-103, 107 は関与していないことがわかった。これに対して BDNF 発現の減少には、BDNF 遺伝子の転写に関与している MeCP-2 の発現を制御している miR-132 の減少がみられたことから、MeCP-2 による転写抑制機序が活性化して BDNF 発現減少が導かれている可能性が推測された。

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 12 件)

- 1) Takei Shiro, Morinobu Shigeru, Yamamoto Shigeto, Fuchikami Manabu, Matsumoto Tomoya, Yamawaki Shigeto, Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. J Psychiatric Res, 査読有, 45, 2011, pp460-468
- 2) Fuchikami Manabu, Yamamoto Shigeto, Morinobu Shigeru, Takei Shiro, Yamawaki Shigeto, Epigenetic regulation of BDNF gene in response to stress. Psychiatry Investigation 査読有, 7, 2010, pp251-256
- 3) Yamamoto Shigeto, Morinobu Shigeru, Iwamoto Yasuyuki, Ueda Yuto, Takei Shiro, Fujita Yosuke, Yamawaki Shigeto,

Alteration in the hippocampal glycinergic system in an animal model of posttraumatic stress disorder. J Psychiatric Res, 査読有, 44, 2010, 1069-1074

4) 森信繁、高橋輝道、山本茂人、ストレスとうつ病動物モデル、別冊・医学のあゆみ、査読無, 2010, pp190-195

5) Kurata Akiko, Morinobu Shigeru, Fuchikami Manabu, Yamamoto Shigeto, Yamawaki Shigeto, Maternal postpartum learned helplessness (LH) affects maternal care by dams and responses to the LH test in adolescent offspring. Horm Behav, 査読有, 56, 2009, pp112-120

6) Fuchikami M, Morinobu S, Kurata A, Yamamoto S, Yamawaki S, Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. Int J Neuropsychopharmacol, 査読有, 12, 2009, pp73-82

[学会発表] (計 15 件)

- 1) Segawa Masahiro, Fuchikami Manabu, Matsumoto Tomoya, Morinobu Shigeru, Yamawaki Shigeto, Electroconvulsive seizure induced tissue-plasminogen activator (t-PA) expression in rat hippocampus. Neuro2010, 11-15 Nov 2010, San Diego, U. S. A.
- 2) Fujita Yosuke, Morinobu Shigeru, Takei Shiro, Yamamoto Shigeto, Yamawaki Shigeto, The effect of the histone deacetylase inhibitor Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on extinction of conditioned fear. Neuro2010, 11-15 Nov 2010, San Diego, U. S. A.
- 3) 森信繁、養育環境の修飾によるうつ病動物モデル作成の可能性について、第 32 回日本生物学的精神医学会、2010 年 10 月 7-9 日、北九州
- 4) Takei shiro, Morinobu Shigeru, Yamamoto Shigeto, Fuchikami Manabu, Yamawaki Shigeto, Enhanced transcription of the BDNF gene and histone acetylation at its promoters are involved in fear memory consolidation in an animal model of PTSD, CINP2010, 6-10 JUN 2010, Hong Kong, China
- 5) 森信繁、うつ病発症の新たなメカニズム-エピジェネティクス-、第 106 回日本精神神経学会、2010 年 5 月 20-22 日、広島
- 6) Morinobu Shigeru, Takei Shiro, Yamamoto Shigeto, Fuchikami Manabu, Yamawaki Shigeto, Enhanced transcription of the

BDNF gene and histone acetylation at its promoters are involved in fear memory consolidation in an animal model of PTSD, Neuro2009, 17-21 Oct 2009, Chicago, U. S. A.

7) 倉田明子、森信繁、淵上学、山本茂人、松木文、山脇成人、産後早期の母ラットにおける学習性無力が養育行動及び仔のストレス脆弱性に与える影響、第 31 回日本生物学的精神医学会、2009 年 4 月 23-25 日、京都

8) Kurata Akiko, Morinobu Shigeru, Fuchikami Manabu, Yamamoto Shigeto, Yamawaki Shigeto, The influence of learned helplessness (LH) in dams during early postpartum period on their maternal care and the response to LH test in their adolescent offspring. Neuro2008, 15-19 Nov 2008, Washington D. C., U. S. A.

9) 森信繁、倉田明子、淵上学、松木文、土岐茂、山脇成人、うつ病発症感受性と養育環境、第 49 回日本心身医学会総会、2008 年 6 月 12-13 日、札幌

10) 森信繁、栄養因子・成長因子とシナプス可塑性からみたうつ病の病態メカニズム、第 104 回日本精神神経学会、2008 年 5 月 29-31 日、東京

[図書] (計 3 件)

1) 森信繁、日本評論社、樋口輝彦、野村総一郎編、こころの医学事典、2010 年、pp. 340-357

2) 森信繁、シナジー、下田和孝編、脳とこころのプライマリケア 1 うつと不安、2010 年、pp. 52-61

[その他]

特に該当せず

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森信 繁 (MORINOBU SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：30191042

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：