

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591384

研究課題名(和文) グリアにおける抗うつ薬の神経栄養因子誘導作用に関連する新規標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel targets related to induce expression of neurotrophic factors at antidepressant in glia

研究代表者

竹林 実 (TAKEBAYASHI MINORU)

国立病院機構呉医療センター精神科・臨床研究部 科長・室長

研究者番号：60304440

研究成果の概要(和文)：グリアにおける抗うつ薬のモノアミン非依存性新規作用部位の同定を試みた。抗うつ薬→MMP活性化→FGF2 shedding→FGFR1,2活性化→ERK活性化→神経栄養因子発現までの経路を明らかにし、MMPやFGFRの活性化にかかわる分子が候補になると考えられた。一方、ビオチン化抗うつ薬の合成を行い、これをリガンドとして結合する蛋白質を分離して染色しバンドを同定できたが、再現性を検証中である。

研究成果の概要(英文)：We have tried to identify the monoamine-independent novel target to antidepressant in glia. We revealed a pathway from antidepressant to expression of neurotrophic factors as follows; antidepressant→MMP activation→FGF2 shedding→FGFR1,2→ERK→CREB→expression of neurotrophic factors. This finding suggests that molecules related to activation of MMP and FGFR might be candidates of the novel targets. On the other hand, we synthesized the ligand of biotinylated antidepressant and separated the antidepressant-binding protein by using the ligand. Some bands were identified, which is being reconfirmed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 21 年度	1,000,000		1,000,000
平成 22 年度	600,000		600,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	360,000	3,160,000

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

グリアは高次脳機能に役割をもち、うつ病の病態・治療に関与する新しいターゲットの候補と推測されている。申請者たちはすでに、グリアの主要な種類であるアストロサイトに着目して、抗うつ薬の神経栄養因子の発現増加作用を報告し、誘導作用は、セロトニンなどのモノアミン非依存性であることも報告して

いる。

2. 研究の目的

確立したグリア細胞 assay 系を利用して、抗うつ薬のモノアミン非依存性新規作用部位への機能的アプローチおよびビオチン化抗うつ薬を用いた沈降法によるターゲット蛋白探索の直接的アプローチの2つのアプローチを用いて双方向から抗うつ薬の新

規作用部位を明らかにする。

3. 研究の方法

ラットグリア細胞株 (C6 細胞) およびヒト正常アストロサイト (NHA) を用いて、機能的アプローチに関しては主に薬理学的手法および分子生物学的手法 (siRNA 干渉法など) を用いて、抗うつ薬の作用機序を明らかにする。直接的アプローチとしては抗うつ薬リガンドを作成して、抗うつ薬に親和性の高い蛋白質を免疫沈降法で回収し、電気泳動で分離して染色しターゲット蛋白をバンドとして同定する。

4. 研究成果

(1) グリア細胞における神経栄養因子assayを用いた抗うつ薬のモノアミン非依存性新規作用部位への機能的アプローチ:

現在まで、抗うつ薬によって、選択的に細胞内情報伝達系の重要なキナーゼ分子である Extracellular signal-regulated kinase (ERK) およびチロシンキナーゼの急性の活性化がモノアミン非依存性に引き起こされることを明らかにし、チロシンキナーゼの種類として繊維芽細胞成長因子受容体 (FGFR) が唯一重要であること、その FGF リガンドが関与していることを明らかにした。さらに、FGFR1 および 2 の両者のサブタイプが重要であり、FGF2 のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を介した細胞外への切り出し (shedding) が、FGFR を活性化させることも明らかとした。すなわち、抗うつ薬→MMP 活性化→FGF2 shedding→FGFR1, 2 活性化→ERK 活性化→神経栄養因子発現までを明らかにした。

(2) ビオチン化抗うつ薬を用いた沈降法によるターゲット蛋白探索の直接的アプローチ: 直接的なアプローチとしては、ビオチン化抗うつ薬を作成し、グリア細胞溶解液と反応させて、抗うつ薬に親和性の高い蛋白質を免疫沈降法で回収し、同定するものである。現在まで、ビオチン化抗うつ薬の合成、精製に成功した (国内特許申請中)。このビオチン化抗うつ薬を用いてストレプトアビジンアガロースビーズとの沈降実験の基礎的検討を行った。しかしながら、このアガロースビーズでは、蛋白質の回収率が非常に低いため、現在は、他の磁気ナノビーズの使用へ変更し再検討し、その結果、良好な蛋白回収率が得られた。そのため、この磁気ナノビーズを用いて、抗うつ薬と結合する蛋白質を免疫沈降後に回収し、電気泳動で分離して染色しバンドを同定できた。現在は、実験の再現性を検証中である。

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 4 件)

1. Tsuchioka M, Hisaoka K, Yano R, Shibasaki C, Kajiatani N, Takebayashi M: Riluzole-induced glial cell line-derived neurotrophic factor production is regulated through fibroblast growth factor receptor signaling in rat C6 glioma cells. *Brain Research* 査読あり 1384:1-8, 2011.
2. Takebayashi M, Hashimoto R, Hisaoka K, Tsuchioka M, Kunugi H: Plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in patients with major depressive disorders. *Journal of Neural Transmission* 査読あり 117:1119-1122, 2010.
3. Hisaoka K, Maeda N, Tsuchioka M, Takebayashi M: Antidepressants induce acute CREB phosphorylation and CRE-mediated gene expression in glial cells: a possible contribution to GDNF production. *Brain Research* 査読あり 1196:53-58, 2008.
4. Tsuchioka M, Takebayashi M, Hisaoka K, Maeda N, and Nakata Y: Serotonin (5-HT) induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast

growth factor receptor 2 (FGFR2) in rat C6 glioma cells. Journal of Neurochemistry 査読あり 106: 244-257, 2008.

[学会発表] (計 5 件)

1. Kajitani N, Hisaoka K, Morioka N, Tsuchioka M, Yano R, Nakata Y, Takebayashi M: Antidepressants activate expression of neurotrophic/growth factors in astrocytes. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November, 2010
2. Tsuchioka M, Hisaoka K, Yano R, Shibasaki C, Kajitani N, Takebayashi M: Riluzole induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression through fibroblast growth factor receptor (FGFR) in rat C6 glioma cells. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, November, 2010
3. Takebayashi M, Hisaoka K, Tsuchioka M: Increased blood levels of neuronal adhesion molecule (NCAM) in remitted patients with mood disorders: a role of glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) signaling. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, October, 2009
4. Hisaoka K, Tsuchioka M, Takebayashi M:

Antidepressants increase glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) production through fibroblast growth factor receptor (FGFR) in glia. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, October, 2009.

5. Tsuchioka M, Hisaoka K, Fujita Y, Uike T, Nakata Y, Takebayashi M: Serotonin(5-HT) increases glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast growth factor 2 (FGFR2) in C6 glioma cells. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, November, 2008.

[図書] (計 1 件)

Takebayashi M, Hisaoka K, Tsuchioka M: Glial dysfunction in mood disorders: the role of GDNF. Recent Developments on Depression Research. Shirayama Y, Chaki S (eds), pp125-143, Reserch Signpost, India, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ビオチン誘導体又はその生理学的に許容される塩、その製造方法及びそれを用いたアフィニティクロマトグラフィ用材並びにタンパク質の分離方法

発明者: 竹林 実、土岡麻美

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2008-335333

出願年月日: 平 20. 12. 26

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹林 実 (TAKEBAYASHI MINORU)

国立病院機構呉医療センター 精神科・臨床研究部 科長・室長

研究者番号：60304440

(2) 研究分担者

仲田義啓 (NAKATA YOSHIHIRO)

広島大学薬学部 教授

研究者番号：40133152

(3) 連携研究者

久岡一恵 (HISAOKA KAZUE)

広島大学薬学部 助教

研究者番号：20393431

岡田 (土岡) 麻美 (OKADA MAMI)

国立病院機構呉医療センター 臨床研究部
研究員

研究者番号：30517280