

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間： 2008～2009
課題番号：20790847
研究課題名（和文） 抗うつ薬・気分安定薬および BDNF による脳内ミクログリア活性化の制御機序解明
研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism underlying the modulation of microglial function by antidepressants and/or BDNF

研究代表者 溝口 義人（MIZOGUCHI YOSHITO）
九州大学・医学研究院・特別教員
研究者番号：60467892

研究成果の概要（和文）：

うつ病を含む気分障害発症の背景に、海馬での神経新生の障害が指摘されており、抗うつ薬と気分安定薬の治療効果には、脳由来神経栄養因子（BDNF）産生放出の増加と神経新生の促進が関与する可能性が示唆されている。一方、脳内マクロファージ（ミクログリア）活性化は BDNF のほか、炎症性サイトカインやフリーラジカル等の神経細胞障害因子を放出し、神経新生に大きく影響する。本研究は抗うつ薬・気分安定薬および BDNF によるミクログリア活性化の制御メカニズムを解明することにより、気分障害の病態把握と治療薬開発に資することを目的とした。ミクログリアにおける BDNF の細胞内 Ca^{2+} 動態への作用については過去に報告がなかったが、申請者らはミクログリアにおいて BDNF 投与数秒以内に $[Ca^{2+}]_i$ が持続的に上昇する現象を見出し、BDNF による $[Ca^{2+}]_i$ 持続的上昇に transient receptor potential channel (TRP チャネル) を介した Ca^{2+} 流入が関与する可能性および BDNF によるミクログリア活性化抑制効果を報告した (Mizoguchi ら, J Immunol. 2009)。

研究成果の概要（英文）：

Microglia are intrinsic immune cells that release factors, including proinflammatory cytokines, NO, and neurotrophins, following activation after disturbance in the brain. Elevation of intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) is important for microglial functions, such as the release of cytokines and NO from activated microglia. There is increasing evidence suggesting that pathophysiology of neuropsychiatric disorders is related to the inflammatory responses mediated by microglia. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin well known for its roles in the activation of microglia as well as in pathophysiology and/or treatment of neuropsychiatric disorders. In this study, we observed that BDNF induced a sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$ through binding with the truncated tropomyosin-related kinase B receptor, resulting in activation of the PLC pathway and store-operated calcium entry in rodent microglial cells. RT-PCR and immunocytochemical techniques revealed that truncated tropomyosin-related kinase B-T1

receptors were highly expressed in rodent microglial cells. Sustained activation of store-operated calcium entry occurred after brief BDNF application and contributed to the maintenance of sustained $[Ca^{2+}]_i$ elevation. Pretreatment with BDNF significantly suppressed the release of NO from activated microglia. Additionally, pretreatment of BDNF suppressed the IFN- γ -induced increase in $[Ca^{2+}]_i$, along with a rise in basal levels of $[Ca^{2+}]_i$ in rodent microglial cells. We show direct evidence that rodent microglial cells are able to respond to BDNF, which may be important for the regulation of inflammatory responses, and may also be involved in the pathophysiology and/or the treatment of neuropsychiatric disorders.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：脳由来神経栄養因子(BDNF)、ミクログリア、気分障害、うつ病、カルシウム、神経炎症、精神薬理

1. 研究開始当初の背景

(1) 気分障害発症の背景に海馬での神経新生の障害が指摘されており (Dumanら, 2006: Biol Psychiatry など)、SSRI などの抗うつ薬あるいは気分安定薬投与により神経新生が促進されるという報告が近年相次いでいる (Santarelli ら, Science 2003、Coyle ら, Neuron 2003)。さらに、気分障害の病態に BDNF の発現低下が関与し、抗うつ薬の治療効果発現に、海馬での BDNF 産生および神経新生促進が関与する可能性が示唆されている (Martinowich, Manji & Lu, Nat Neurosci 2007)。BDNF やその受容体 (TrkB) の遺伝子変異が気分障害発病リスクと関連するという報告もあり (Okada ら, Mol Psychiatry 2006)、BDNF は気分障害の病態と治療における 1 つの鍵分子であると考えられる。

(2) 中枢神経系での neuroinflammation の機序には脳内ミクログリアが深く関与するが、ミクログリア活性化は BDNF など神経栄

養因子を産生するとともに、サイトカインやフリーラジカル等の細胞障害因子も産生放出する (Bessis ら, Glia 2007; Kempermann ら, Science 2003)。BDNF はミクログリアの分化能・食食能 (Elkabes ら, J Neurosci 1996) および炎症性サイトカイン放出等 (Nakajima ら, Glia 1998) を調節する。神経新生に対して、BDNF は促進的に作用するが、炎症性サイトカイン (TNF α や IL-1 β など) やフリーラジカル (NO など) は抑制的にはたらくことが示唆されている (Monje ら, Science 2003)。

(3) このように、ミクログリアのニューロンに対する作用は「両刃の剣」であり、この両方向性を制御する機序に近年注目が集まっている (Pocock と Kettenmann, Trends Neurosci 2007; Inoue K, Pharmacol Ther 2006)。

2. 研究の目的

(1) 最近、申請者の所属する研究室は、非定型抗精神病薬、SSRI などの抗うつ薬あるい

はリチウムなどの気分安定薬の前処置により、インターフェロン γ 刺激によるミクログリア活性化が抑制され、サイトカインやフリーラジカルの産生放出が抑制されることを見出し報告した (Kato, Monji ら, Schizophr Res 2007; Hashioka, Monji ら, Exp Neurol 2007 など)。これらの報告を総合すると、ミクログリア活性化がサイトカイン、フリーラジカルあるいは BDNF の産生放出を通じて、気分障害の発症において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。また抗うつ薬、気分安定薬および BDNF はミクログリア活性化を制御すると考えられ、その制御メカニズムの解明は、気分障害の治療において非常に重要である。

(2) BDNF は中枢神経系の発達、ニューロンおよびグリアの生存・分化・成熟のほかシナプス形成に関与する (長期的作用: 時間~日単位) 分子として研究されてきた (Thoenen, Science 1995; Bessis ら, Glia 2007)。これに加えて、近年、BDNF によるシナプス伝達修飾など短潜時作用 (秒~分単位) に注目が集まり研究が進んできた。(Poo, Nat Rev Neurosci 2001; Mizoguchi ら J Biol Chem 2003 など)。BDNF は短潜時で神経細胞 (Mizoguchi ら, Eur J Neurosci 2002 など) およびアストロサイト (Rose ら, Nature 2003) において細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるが、カルシウムイオン濃度上昇は LTP の発生・維持のほか関連遺伝子の発現さらにシナプス形成において重要である (Lu, Nat Rev Neurosci 2005)。

(3) 一方、ミクログリア活性化後のサイトカインやフリーラジカル等の産生放出において、細胞内カルシウムイオン濃度上昇が重要である (Hoffmann ら, J Neurosci 2002; Farbar ら, Glia 2006)。

(4) ミクログリアでの BDNF 投与後の細胞内カルシウムイオン動態は今まで報告されていないが、申請者はミクログリアにおいて BDNF 投与数十秒以内に細胞内カルシウムイオン濃度が持続的に上昇することを見出した。今後、細胞内カルシウムイオン濃度上昇の細胞内機序、とくに持続的上昇の維持機構の解明さらに生理的・機能的意義の解明が不可欠である。

3. 研究の方法

抗うつ薬あるいは気分安定薬によるミクログリア活性化抑制作用の細胞内メカニズムを以下のごとく解明する。さらに並行して、BDNF のミクログリア活性化への作用を検討し、続いてその細胞内メカニズムを解明する。

(1) 標本として培養ミクログリア細胞

(Sawada ら, FEBS Lett 1998; Okada ら, Glia 2003; Hashioka ら, Free Radic Biol Med 2007; Kato ら, Schizophr Res 2007 など) を

用いる。

(2) ミクログリア活性化によるサイトカインやフリーラジカルなどの産生放出には、細胞内カルシウムイオン濃度上昇が重要である (Farber ら, 2006:Glia)。抗うつ薬あるいは気分安定薬によるミクログリア活性化の抑制作用の細胞内メカニズムとして、薬剤による細胞内カルシウムイオン動態の制御が関与する可能性が高い。今後 Fura-2 AM による細胞内カルシウムイオン測定を用い、関与するメカニズムを検索する。

さらに電気生理学的手法 (パッチクランプ法) を用い、複数種あるカルシウムイオンチャンネル、TRP チャンネル、Store-operated Calcium チャンネル、クロライドイオンチャンネル等の関与も検討する。

(3) サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IL-6 など) を ELISA 法や RT-PCR 法で、NO の主要な代謝産物である NO $_2$ を Griess 法により定量化する。ウェスタンブロット法、さらに superoxide radical (O $_2^-$) 測定には in vitro ESR (electron spin resonance) 法も適宜用いる。

(4) BDNF によるミクログリア活性化の制御について ELISA 法、Griess 法、in vitro ESR 法あるいは RT-PCR 法により検討する。さらにウェスタンブロット法により、関連する細胞内メカニズムの検索も行う。

(5) 申請者は BDNF 投与数十秒以内に細胞内カルシウムイオン濃度が持続的に上昇することを見出しており、今後、細胞内カルシウムイオン濃度上昇の細胞内機序、とくに持続的上昇の維持機構の解明をカルシウム測定により検討する。同時に生理的・機能的意義の解明をおこなう。さらに電気生理学的手法 (パッチクランプ法) を用いて、複数種あるカルシウムイオンチャンネル、TRP チャンネル、Store-operated Calcium チャンネル、クロライドイオンチャンネル等の関与も検索する。

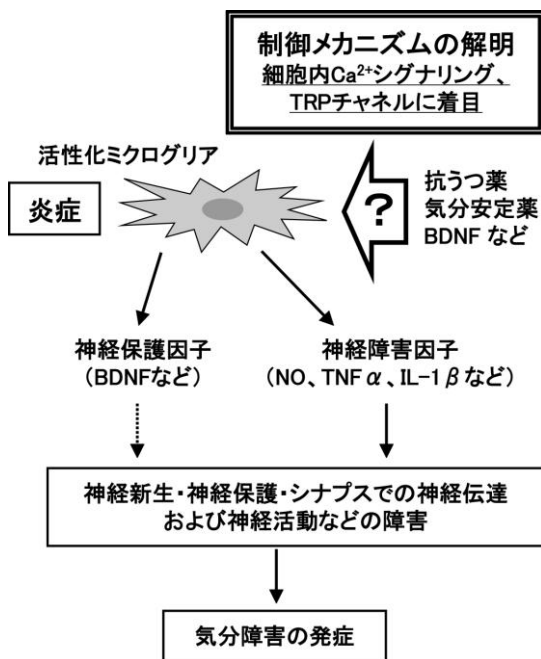
4. 研究成果

ミクログリアにおける BDNF の細胞内 Ca $^{2+}$ 動態への作用については過去に報告がなかったが、我々はミクログリアにおいて BDNF 投与数秒以内に [Ca $^{2+}$] $_i$ が持続的に上昇する現象を見出し、BDNF による [Ca $^{2+}$] $_i$ 持続的上昇に transient receptor potential channel (TRP チャンネル) を介した Ca $^{2+}$ 流入が関与する可能性および BDNF によるミクログリア活性化抑制効果を報告した (Mizoguchi ら, J Immunol. 2009)。

TRP チャンネルは Ca $^{2+}$ 透過性が高く、細胞内 Ca $^{2+}$ シグナリングにおいて重要な役割を担い、ミクログリア活性化を含む炎症過程のほか気分障害の病態との関与においても注目されている (Nilius ら, Physiol Rev 2007, Kato

T, Cell Calcium 2008)。

我々はさらに、抗うつ薬 (SSRI) あるいはリチウムを前処置したミクログリアにおいて、BDNF の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇効果が増強することを見出しており (Society for Neuroscience 2009 in Chicago 2009 において発表)、今後 $[Ca^{2+}]_i$ 持続的上昇の細胞内機序を、とくにTRP チャンネルに着目して解明することが、抗うつ薬および気分安定薬の作用機序を解明する上でも重要である。



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5件)

① Mizoguchi Y, Monji A, Kato T, Seki Y, Gotoh L, Horikawa H, Suzuki SO, Iwaki T, Yonaha M, Hashioka S, Kanba S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces sustained elevation of intracellular Ca^{2+} in rodent microglia. *J. Immunol.* 183:7778-7786. 2009 査読有

② Eggan SM*, Mizoguchi Y*, Stoyak SR, Lewis DA. (* Equally contributed authors) Development of Cannabinoid 1 Receptor Protein and Messenger RNA in Monkey Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Cereb. Cortex* (in the press) 査読有

③ Monji A, Takita M, Samejima T, Takaishi T, Hashimoto K, Matsunaga H, Oda M, Sumida

Y, Mizoguchi Y, Kato T, Horikawa H, Kanba S.

Effect of yokukansan on the behavioral and psychological symptoms of dementia in elderly patients with Alzheimer's disease.

Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 33:308-311, 2009. 査読有

④ Kato T, Mizoguchi Y, Monji A, Horikawa H, Suzuki SO, Seki Y, Iwaki T, Hashioka S, Kanba S.

Inhibitory effects of aripiprazole on interferon-gamma-induced microglial activation via intracellular Ca^{2+} regulation in vitro.

J. Neurochem. 106:815-25, 2008. 査読有

⑤ Bian Q, Kato T, Monji A, Hashioka S, Mizoguchi Y, Horikawa H, Kanba S.

The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon- γ .

Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 32:42-48, 2008. 査読有

[学会発表] (計2件)

① Possible role of BDNF-induced microglial intracellular Ca^{2+} elevation in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders.

XIV World Congress of Psychiatry 2008 2008年9月21日、Prague Congress Centre

② Possible role of BDNF-induced microglial intracellular Ca^{2+} elevation in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders.

Society for Neuroscience 2009 in Chicago, 2009年10月21日、McCormick Place

6. 研究組織

研究代表者

溝口 義人 (MIZOGUCHI YOSHITO)

九州大学・医学研究院・特別教員

研究者番号：60467892