

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03577

研究課題名(和文) 全身疾患に随伴するうつ症状・認知機能低下の共通メカニズム解明と治療への応用

研究課題名(英文) Identifying of common mechanisms of depression and cognitive decline associated with systemic diseases and application to treatment

研究代表者

中曾 一裕 (NAKASO, Kazuhiro)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：30379648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：認知機能障害、うつ症状など、種々の全身疾患や神経疾患にみられる共通症状の発現機序を検討した。病態環境下において脳内ミクログリアに発現が誘導されるxc-系/xCTと、それを介して放出される細胞外グルタミン酸に注目し、各種病態モデルにおける関与を明らかにした。xCT遺伝子欠失マウスおよびxCT阻害剤により、ビタミンE欠乏(一種の酸化ストレス、老化モデル)、アルツハイマー病モデル、パーキンソン病モデルにおいて、症状の軽減効果を認めた。これによりxCTが認知機能障害やうつ症状に対する新規の治療標的になりうることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の認知機能障害やうつ症状の病態研究は、疾患ごとの原因に注目しつつ行われてきた。本研究では種々の疾患に共通な症状発現メカニズムの候補として「xc-系/xCT由来のグルタミン酸」に注目し、新規治療標的分子として位置付けた。さらに、この標的分子を制御できる化合物や抗体を得ることができれば、「認知希望障害やうつ症状克服」という社会的ニーズに応えることが可能となる。これは将来的には神経・精神疾患だけでなく、多種多様な疾患に随伴して見られる認知希望障害やうつ症状対策への波及効果が期待出来る。

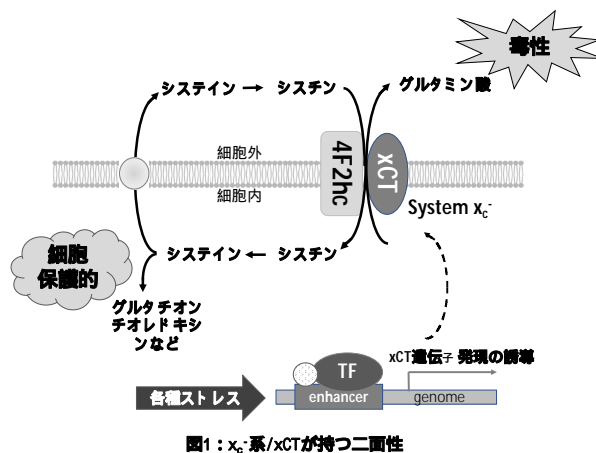
研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms of common symptoms, such as cognitive impairment and depression, observed in various systemic and neurological disorders. We focused on the "system xc-/xCT" induced in brain microglia under pathological conditions and the extracellular glutamate released through it. We clarified its involvement in various pathological models. We observed a symptom-reducing effect of genetic deficiency of xCT or chemical xCT inhibitor on vitamin E deficiency (a type of oxidative stress, aging model), Alzheimer's disease model, and Parkinson's disease model. These results suggest that xCT could be a new therapeutic target for cognitive impairment and depression.

研究分野：神経内科学，生化学，神経科学，分子生物学

キーワード：xCT xc-系 ミクログリア グルタミン酸 認知症 うつ症状 アルツハイマー病 パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

うつ症状・認知機能低下(以下 **DCD**: **D**epression and **C**ognitive **D**ecline)は、脳・精神疾患に限らず、全身疾患に随伴して高頻度、かつ同時に出現する“**common disease 的**症状”である。基礎疾患ごとの病因とは別に、**DCD** を誘発する共通メカニズムが存在していると予想される。したがって、この共通メカニズムを明確にし、幅広い疾患における **DCD** の予防・治療に結びつけることができれば大きなインパクトとなる。従来、認知症病態の一部に“細胞外グルタミン酸による興奮性神経毒性”の関与が知られており、うつ症状への関与に関する報告も散見される。しかし、このグルタミン酸発生源については不明であったため、治療標的に成り得なかった。我々はこれまでに、敗血症後の **DCD** に細胞外グルタミン酸が重要であること、その発生源として脳内ミクログリアに誘導される**シスチン・グルタミン酸交換系トランスポーター“System xc⁻”(xc-系)**が重要であり、治療標的になり得ることを明らかにした(*Sci Rep.* 2019)。さらに xc-系由来のグルタミン酸は、他のあらゆる病態に随伴する **DCD** にも関与することが示唆されつつあり、極めて有望な研究対象である。xc-系/xCT は発現した細胞には保護的に作用する一方、周辺の細胞には毒性に作用するという二面性が想定され、今までにはない視点で病態を捉えることが可能となる(図1)。



2. 研究の目的

本研究は、種々の疾患に随伴して出現する **DCD** の共通メカニズムを明らかにし、将来的な臨床応用を想定した、既存治療には無い特性を持つ新規治療の基盤確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 病態解析 (DCD 発症メカニズムの検討)

<<動物モデルによる DCD 検討>>

例えばうつ病モデルや認知機能低下モデルを「野生型マウス vs xCT-KO マウス」で比較すれば、フェノタイプと xc-系/xCT の関係を明らかにできる。我々が所有する (a) 遺伝子改変マウスと、以下 (b) 疾患モデルの組み合わせによる行動実験、薬理・生化学実験、組織学検討を包括的に行い、DCD と xc-系/xCT の関係を明らかにする。

(a) 遺伝子改変マウス

xCT-KO, AD, Iba1-EGFP (ミクログリア特異的に蛍光タンパクを発現) 各マウスを所有しており、適宜交配 (例: xCT-KO × Iba1-EGFP) により複合遺伝子改変マウスとした上で、下記疾患モデルとの組み合わせにより比較検討を行う。

ミクログリア xCT-KO マウスの作製: ミクログリアの xc-系こそが重要であるとの仮説のもと、証明のためにミクログリア特異的 xCT-KO マウスを作製する。

(b) 疾患モデル

(b-1) 認知障害モデル (ビタミン E 欠乏マウス: 老化モデル, AD 関連分子-Tg マウスとの交配; A が蓄積して AD 様症状, 病理を示す)。

(b-2) 全身疾患モデル・その他のモデルとして、一過性全脳虚血 (蘇生後脳症モデル), MPTP 投与 (PD モデル) を検討する。

(c) フェノタイプ解析 (行動解析)

自発運動測定 (WRA), ウォリス水迷路, Y 字迷路, ロータロッド試験, 摂食行動 (体重変化) を **DCD** の指標とする。

(d) ミクログリアの活性化状況の検討

xc-系活性化によりグルタミン酸以外の因子も **DCD** に影響する可能性があるため、野生型マウス, xCT-KO マウス, Iba1-EGFP マウスを用いた疾患モデル (b) により、ミクログリア活性化を確認する。評価は、ミクログリア形態および表面マーカーによる評価 (保護性: M1 タイプ vs 傷害性: M2 タイプ)。免疫染色による局在の検討, フローサイトメトリーを用いた M1/M2 比率の確認を行う。

<<病理切片（剖検脳）を用いた xc-系/xCT と活性化ミクログリアの検討>>

マウスでの現象がヒトでも起きていることを確認するため、AD 等の認知症疾患、脳梗塞、内臓疾患（癌など）患者脳を用いた xCT/Iba-1（ミクログリアマーカー）の免疫染色を施行する。

(2) xc-系/xCT 抑制物質（DCD 治療候補物質）の探索

仮説が正しければ、xc-系/xCT の阻害が、DCD に対して有効であると予想される。

(a) 候補物質探索のためのスクリーニング細胞の構築

(a-1) 株化ミクログリア 6-3 細胞を用い、シスチン取り込みアッセイ、細胞外グルタミン酸測定、による xc-系機能の判定を行う。

(a-2) xCT のプロモーター配列とルシフェラーゼ遺伝子の組み合わせによる、レポーター細胞の構築。転写抑制物質のスクリーニングに使用する。

(b) 将来的な臨床応用も想定したミクログリア xc-系/xCT 阻害物質の探索

(a) で確立したスクリーニング細胞を用い、AMED-BINDs から提供される化合物ライブラリーの中で xc-系/xCT 抑制効果があるものを探索・同定する。

(3) xc-系/xCT 抑制物質による DCD 治療効果の検討

既存 xCT 阻害薬およびスクリーニングにより得られた化合物による症状軽減効果の検討。

(a) 細胞レベルでの xc-系/xCT 抑制効果

既存薬（エラスチン、スルファサラジン）および新規候補化合物添加による、細胞内シスチン取り込み、および培養上清中に放出されるグルタミン酸量を測定。また、転写レベルでの xCT 発現抑制効果はウエスタンブロットで検討する。

(b) 動物モデルにおける DCD 治療効果の検討

(1) で用いた各種動物モデルに対して、xCT 阻害剤によるフェノタイプや病理所見の改善効果を明らかにする。

4. 研究成果

<細胞実験> 培養ミクログリアを用い、アミロイド (A), MPTP, ビタミン E 欠乏などの刺激による xCT の発現量の変化を検討した。その結果、ミクログリアが活性化される条件では xCT 発現量が増加することが明らかになった。xCT 発現量はウエスタンブロットにより検討した。

また、細胞外メディウム中に放出されるグルタミン酸量を測定した結果、xCT 発現量が上昇する環境下において上昇すること、xCT 阻害剤添加によりグルタミン酸上昇が抑制されることを明らかにした。図 2 にビタミン E 欠乏環境下におけるミクログリア xCT 発現と細胞外グルタミン酸増加の結果を示す。

<動物実験および治療実験>

動物モデルとして、ビタミン E 欠乏モデルマウス、MPTP 投与パーキンソン病モデルマウス、アルツハイマー病モデルマウスにおいて、xCT の関与を検討した。

ビタミン E 欠乏モデルマウスに関しては、長期ビタミン E 欠乏による認知機能低下、自発活動性低下は、xCT 欠失マウスでは生じにくいことを明らかにした。また、ビタミン E 欠乏のマウス脳では、主にミクログリア、一部アストロサイトに xCT の発現を認め、単なる酸化ストレスだけではなく、xCT から放出されるグルタミン酸も病態に重要であることが示唆された。

MPTP 投与パーキンソン病モデルマウスについては、MPTP 投与により、脳内ミクログリアに xCT が発現することをフローサイトメトリー、免疫染色で明らかにした。また、

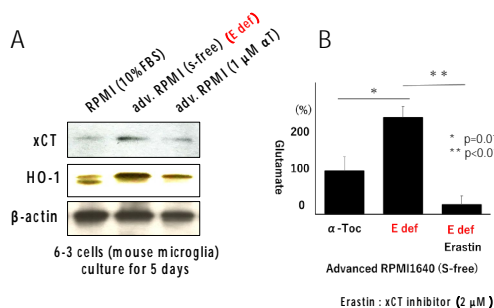


図2: ビタミンE欠乏とミクログリアxCT発現が誘導される。(A) 培養条件からビタミンEを欠失させることで、ミクログリアのxCT発現量が増加する。(B) ビタミンE欠乏状態では培養上清に放出されるグルタミン酸が増加し、xCT阻害剤Erastin添加によりグルタミン酸増加が抑制される。

図3

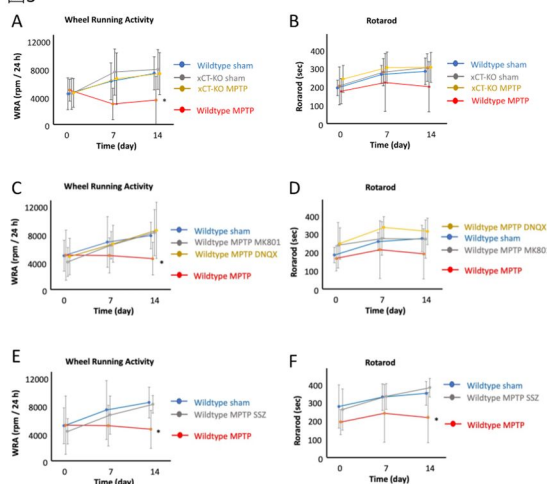


図3: MPTP投与パーキンソンモデルにおけるxCTの関与

(A,B) A: 自発運動検査 (WRA) および B: ロータロッド試験において MPTP投与マウスでは活動性低下が認められるが、MPTP投与xCT-KOマウスでは症状が軽度である。(C,D) NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニスト MK801およびAMPA型グルタミン酸受容体アンタゴニスト DNQXは MPTP投与による症状を軽減する。(E,F) xCT阻害剤スルファサラジン (SSZ) は MPTP投与による症状を軽減する。

自発性低下が xCT 欠失マウスでは軽減されることを見出した。野生型と xCT 欠失マウスを比較した際、ドパミン神経脱落の程度には差がないことから、MPTP による症状（特に自発性低下）には、脳全体のミクログリアの xCT も関与していることを示した。治療実験として、xCT 阻害剤、グルタミン酸受容体（NMDA 型、AMPA 型）アンタゴニスト投与を行い、症状軽減効果を確認した（図 3）。

アルツハイマー病マウスについては、遺伝子改変によるアルツハイマー病マウスと xCT 欠失マウスの交配により、xCT の関与を検討した。その結果、xCT 欠失アルツハイマー病マウスでは、認知機能低下が軽減されることを明らかにした。脳内のアミロイドプラーク周辺に集簇したミクログリアに xCT 発現が認められた。また、xCT 阻害剤であるスルファサラジン投与により認知機能低下が抑制されることを明らかにした（図 4）。

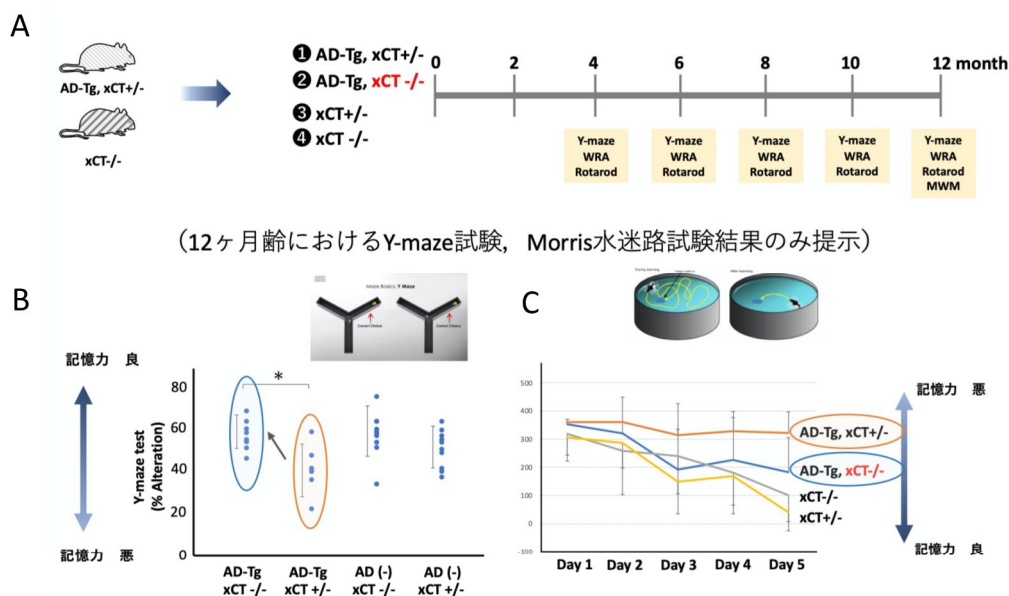


図4: ADマウスをxCT-KOマウスと交配すると記憶力の低下が軽減される

(A) マウス交配および全体の実験プロトコール。(B) 12ヶ月時点でのY字迷路テスト。アルツハイマー病マウスではスコアが低下するが、xCT遺伝子欠失によりスコア低下が見られなくなる。

(C) 12ヶ月時点でのモリス水迷路試験。アルツハイマー病マウスではスコアが悪化するが、xCT遺伝子欠失によりスコア悪化が抑制される。

< 新規 xCT 阻害剤の探索 >

株化ミクログリア 6-3 細胞を用い、シスチン取り込みアッセイ、細胞外グルタミン酸を測定し、化合物ライブラリー（AMED-BINDs より提供）から、候補となる化合物をスクリーニングした結果、候補化合物を数種得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kurashiki T, Horikoshi Y, Kamizaki K, Sunaguchi T, Hara K, Morimoto M, Kitagawa Y, Nakaso K, Otsuki A, Matura T.	4. 巻 70
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying the promotion of wound repair by coenzyme Q10: PI3K/Akt signal activation via alterations to cell membrane domains.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 222-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbr.21-141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kazushi Hara, Yosuke Horikoshi, Masaki Morimoto, Kazuhiro Nakaso, Teppei Sunaguchi, Tatsuyuki Kurashiki, Yuji Nakayama, Takehiko Hanaki, Manabu Yamamoto, Teruhisa Sakamoto, Yoshiyuki Fujiwara, Tatsuya Matura.	4. 巻 28
2. 論文標題 TYR03 promotes chemoresistance via increased LC3 expression in pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakaso K	4. 巻 67
2. 論文標題 Roles of Microglia in Neurodegenerative Diseases.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Yonago Acta Medica	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33160/yam.2024.02.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matura T, Nakaso K, Horikoshi Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Tocotrienols and Parkinson's disease: in vitro and in vivo modeling.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vitamins and Minerals in Neurological Disorders	6. 最初と最後の頁 513-525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-323-89835-5.00002-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirayama Y, Iwata M, Miyano K, Hirose Y, Oda Y, Fujita Y, Hashimoto K.	4. 巻 1821
2. 論文標題 Infusions of beta-hydroxybutyrate, an endogenous NLRP3 inflammasome inhibitor, produce antidepressant-like effects on learned helplessness rats through BDNF-TrkB signaling and AMPA receptor activation, and strengthen learning ability.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 148567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2023.148567.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金谷優広, 加藤 優吾, 長嶺 秀俊, 堀越 洋輔, 中曾 一裕
2. 発表標題 ミクログリアxCTはMPTP誘発パーキンソン病モデルにおける活動性低下の増悪因子である
3. 学会等名 第76回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 優吾, 長嶺 秀俊, 堀越 洋輔, 中曾 一裕
2. 発表標題 ミクログリアxCTはアルツハイマー病モデルマウスの病態を増悪化する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長嶺 秀俊, 加藤 優吾, 堀越 洋輔, 中曾 一裕
2. 発表標題 ビタミンE欠乏マウスの精神神経症状におけるミクログリアxCTの関与
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiro Kanatani, Tadashi Adachi, Ritsuko Hanajima, Kazuhiro Nakaso
2. 発表標題 Microglial xCT is an aggravating factor in MPTP-induced Parkinson's disease model
3. 学会等名 第65回日本神経学会学術大会 (発表予定)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長嶺秀俊, 堀越洋輔, 中曾一裕
2. 発表標題 ビタミンE欠乏マウスの精神神経症状におけるミクログリアxCTの関与
3. 学会等名 第32回ビタミンE研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中曾一裕
2. 発表標題 認知症治療標的候補としてのミクログリアxCT
3. 学会等名 Tottori Basic Research Forum (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中曾一裕, 大端周, 北川良憲, 堀越洋輔, 倉敷達之, 松浦達也
2. 発表標題 MPTP誘発パーキンソン病モデルにおける活動性低下は ミクログリアxCT/xc- 系と関係している
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岩田 正明 (IWATA Masaaki) (40346367)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------