

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16679

研究課題名（和文）ユビキチン化関連酵素Nedd4Lに着目したうつ病の発症機構の解明

研究課題名（英文）The role of ubiquitin-related enzyme Nedd4L in major depressive disorder

研究代表者

國澤 和生（Kunisawa, Kazuo）

藤田医科大学・保健学研究科・講師

研究者番号：60780773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、慢性ストレス負荷(CSDS)により作製したうつ病モデルマウスを用い、グルタミン酸トランスポーター1(GLT-1)のユビキチン化がうつ病の病態機構に関与するか検討を行った。CSDS負荷後の社会性行動試験において社会性の有意な低下が認められ、CSDSマウスの前頭前皮質（PFC）においてGLT-1のユビキチン化の有意な低下、GLT-1ユビキチン化関連酵素であるNedd4Lの有意な発現低下が認められた。さらに、前頭前皮質特異的Nedd4Lの遺伝子操作が、CSDS負荷時における社会性を制御したことから、Nedd4Lに起因するGLT-1ユビキチン化制御がうつ様行動に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、うつ病の新しい病態解明に関するものである。うつ病患者においてグルタミン酸神経シグナル伝達調節タンパクの遺伝子異常が報告されるなど、うつ病の発症及び病態機構にグルタミン酸神経系が関与することが示唆されている。しかし、うつ病の発症及び病態機構にグルタミン酸神経系がどのように関与するのことは未だ不明であった。本研究は慢性社会的敗北ストレス負荷により作製したうつ病モデルマウスを用い、うつ病の発症及び病態機構におけるグルタミン酸神経系の関与について、グルタミン酸トランスポーター1(GLT-1)のユビキチン化による代謝制御が関与することを世界で初めて発見しており、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the involvement of ubiquitination system in chronic social defeat stress (CSDS)-induced social impairment and glutamatergic dysfunction. CSDS induces social impairment in the social interaction test 1 day after the last stress exposure. The expression of ubiquitinated but not total GLT-1 was decreased in the PFC of mice exposed to CSDS. The expression of neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like (Nedd4L: E3 ligase for GLT-1) was also reduced in CSDS mice. Infusion of adeno-associated virus (AAV)-mediated overexpression and knockdown of Nedd4L into PFC regulate social behavior in the mice. These results suggest that CSDS induces social impairment and glutamatergic dysfunction, which may be caused by the decrease of GLT-1 ubiquitination through down-regulation of Nedd4L pathway.

研究分野：精神神経科学

キーワード：うつ病 Nedd4L GLT-1 ユビキチン修飾系 アデノ随伴ウイルス 前頭前皮質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病の病態にはノルアドレナリンやセロトニン作動性神経系の伝達低下が関与しているというモノアミン仮説が提唱されている。しかし、現在うつ病治療の第一選択薬であり、セロトニン神経系に作用する **SSRI(selective serotonin reuptake inhibitor)** を処方されたうつ病患者の約 **30%** が症状再発を経験する(**Thomas et al., Br J Gen Pract, 2013**)。つまり、うつ病の病態はセロトニン神経系のみに着目した検討では説明困難である。

ユビキチン修飾系は標的タンパクを基質特異的に認識、ユビキチン化することで蛋白分解・局在変化を担うなど多様な生命現象に関与する。申請者らは以前に、うつ病患者においてユビキチン化が低下していることを明らかにした(**Mouri et al., Neurosci lett, 2016**)。従って、ユビキチン修飾系がうつ病の発症機構に関与している可能性がある。申請者は、慢性ストレス負荷により作製したうつ病モデル動物において、ユビキチン化関連酵素群の網羅的解析を行なった。その結果、前頭前皮質においてユビキチン化酵素 **Nedd4L(Neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like)** が発現低下することを見出した。さらに、**Nedd4L** のユビキチン化標的蛋白としてグルタミン酸トランスポーター(**GLT-1**)を同定し、ストレス負荷により **GLT-1** のユビキチン化が著しく低下していることを見出した。膜上に存在する **GLT-1** は、ユビキチン化されることで細胞質内に移行する(**Martínez-Villarreal et al, Glia, 2012**)。従って、**GLT-1** のユビキチン化低下により細胞膜上の **GLT-1** が増加し、グルタミン酸神経系の機能低下が生じることでうつ病が発症する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、うつ病における **Nedd4L-GLT-1** の異常が当疾患の病態形成に寄与するか明らかにした。本研究より、うつ病発症におけるユビキチン修飾系の関与が明らかになれば、従来の抗うつ薬とは全く異なる作用機序を有する新規治療薬開発に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究においては、慢性社会的敗北ストレス負荷(CSDS)により作製したうつ病モデルマウスを用いて、GLT-1のユビキチン化による代謝制御を中心に、うつ病の発症及び病態機構におけるグルタミン酸神経系の関与について検討を行った。

(1) CSDS 後の社会性行動の評価

7週齢 C57BL/6J マウスに対し、攻撃性を示す ICR マウスを 10日間暴露させることにより CSDS マウスを作製した。ストレス負荷 1日後、社会性行動試験により社会性を評価した。さらに CSDS 後のグルタミン酸作動性神経系の活動を評価するために、社会性行動試験 2時間後に免疫組織学的解析により c-fos/CaMK の評価を行った。

(2) CSDS 後の脳内グルタミン酸神経系の変化ならびにグルタミン酸関連蛋白質の評価

脳内グルタミン酸組織含有量の測定及びマイクロダイアリシス法により、グルタミン酸作動性神経系の機能評価を行った。GLT-1 に着目し、発現変化及びユビキチン化をウエスタンブロット(WB)法により評価した。加えて、GLT-1 ユビキチン化関連酵素である Nedd4L の発現変化を WB により解析した。

(3) ユビキチン化関連酵素 Nedd4L のノックダウンあるいは過剰発現が社会性行動に与える影響の評価

部位特異的に Nedd4L のノックダウンあるいは過剰発現が可能となるよう設計したアデノ随伴ウイルスを作製した。当該ウイルスを前頭前皮質に特異的に注入し、CSDS 負荷前ならびに負荷後に社会性試験を行うことで、Nedd4L 発現変化に伴う社会性行動を評価した。

4. 研究成果

(1) CSDS 後の社会性行動の評価

CSDS 負荷 1 日後に社会性行動試験により社会性を評価した。対照群と比較して、CSDS 群では社会性行動の有意な低下が認められた。また、社会性行動の低下に伴うグルタミン酸神経系の変化を観察した結果、CSDS 群の前頭前皮質において c-fos/CaMK 陽性細胞数の有意な低下が認められた。このことから、CSDS が前頭前皮質のグルタミン酸作動性神経系の機能低下を惹起し、社会性の低下を惹き起こしている可能性が示唆された。

(2) CSDS 後の脳内グルタミン酸神経系の変化ならびにグルタミン酸関連蛋白質の評価

CSDS が前頭前皮質のグルタミン酸作動性神経系に与える影響をさらに探索するため、CSDS 後に HPLC 及びマイクロダイアリシス法によりグルタミン酸組織含有量、細胞外グルタミン酸遊離量に変化があるか探索した。その結果、CSDS 群では前頭前皮質のグルタミン酸組織含有量に変化は認められなかったものの、細胞外グルタミン酸遊離量の有意な減少が認められた。さらに、GLT-1 の発現変化及びユビキチン化を評価した結果、CSDS 負荷により前頭前皮質における total の GLT-1 には変化が認められなかったものの、ユビキチン化 GLT-1 の有意な減少が認められた。加えて、GLT-1 のユビキチン化に関与するユビキチン化酵素 Nedd4L においても著しい発現低下が認められた。以上の結果から、CSDS により Nedd4L 発現低下に伴うユビキチン化 GLT-1 低下により、細胞膜に存在する GLT-1 が増加し、細胞外グルタミン酸遊離量の減少が認められている可能性が示唆された。

(3) ユビキチン化関連酵素 Nedd4L のノックダウンあるいは過剰発現が社会性行動に

与える影響の評価

これまでの結果より、CSDS は Nedd4L-GLT-1 の異常を招き、前頭前皮質のグルタミン酸作動神経系の機能低下が生じることで、社会性低下を惹き起こしている可能性が示唆された。そこで、Nedd4L が社会性行動を制御する重要な因子であるか検証するため、アデノ随伴ウイルスを用いて前頭前皮質特異的に Nedd4L を過剰発現あるいはノックダウンした。興味深いことに、CSDS を負荷を行わない場合であっても、Nedd4L を過剰発現あるいはノックダウンすることで社会性の有意な変化が認められた。このことから、Nedd4L が社会性行動に重要な因子の一つである可能性が示唆された。さらに、あらかじめ Nedd4L を過剰発現あるいはノックダウンをしたマウスに対し CSDS を負荷した結果、Nedd4L 過剰発現では社会性低下の有意な緩解が認められ、ノックダウンでは社会性低下の更なる増悪が認められた。以上のことから、CSDS による社会性低下には Nedd4L の発現変化が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suento Willy Jaya, Kunisawa Kazuo, Wulaer Bolati, Kosuge Aika, Iida Tsubasa, Fujigaki Suwako, Fujigaki Hidetsugu, Yamamoto Yasuko, Tanra Andi Jayalangkara, Saito Kuniaki, Mouri Akihiro, Nabeshima Toshitaka	4. 巻 157
2. 論文標題 Prefrontal cortex miR 874 3p prevents lipopolysaccharide induced depression like behavior through inhibition of indoleamine 2,3 dioxygenase 1 expression in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 1963 ~ 1978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15222	査読の有無 有
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 Li Jiayi, Durose Wilaiwan Wisessmith, Ito Junko, Kakita Akiyoshi, Iguchi Yohei, Katsuno Masahisa, Kunisawa Kazuo, Shimizu Takeshi, Ikenaka Kazuhiro	4. 巻 157
2. 論文標題 Exploring the factors underlying remyelination arrest by studying the post transcriptional regulatory mechanisms of cystatin F gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 2070 ~ 2090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15190	査読の有無 有
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 Wulaer Bolati, Kunisawa Kazuo, Hada Kazuhiro, Jaya Suento Willy, Kubota Hisayoshi, Iida Tsubasa, Kosuge Aika, Nagai Taku, Yamada Kiyofumi, Nitta Atsumi, Yamamoto Yasuko, Saito Kuniaki, Mouri Akihiro, Nabeshima Toshitaka	4. 巻 157
2. 論文標題 Shati/Nat8l deficiency disrupts adult neurogenesis and causes attentional impairment through dopaminergic neuronal dysfunction in the dentate gyrus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 642 ~ 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15022	査読の有無 有
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 Wulaer Bolati, Kunisawa Kazuo, Kubota Hisayoshi, Suento Willy Jaya, Saito Kuniaki, Mouri Akihiro, Nabeshima Toshitaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Prefrontal cortex, dorsomedial striatum, and dentate gyrus are necessary in the object-based attention test in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00711-4	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 Kunisawa Kazuo, Hatanaka Nobuhiko, Shimizu Takeshi, Kobayashi Kenta, Osanai Yasuyuki, Mouri Akihiro, Shi Qian, Bhat Manzoor A., Nambu Atsushi, Ikenaka Kazuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Focal loss of the paranodal domain protein Neurofascin155 in the internal capsule impairs cortically induced muscle activity in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00698-y	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 Mori Yuko, Mouri Akihiro, Kunisawa Kazuo, Hirakawa Mami, Kubota Hisayoshi, Kosuge Aika, Niiijima Moe, Hasegawa Masaya, Kurahashi Hitomi, Murakami Reiko, Hoshi Masato, Nakano Takashi, Fujigaki Suwako, Fujigaki Hidetsugu, Yamamoto Yasuko, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 405
2. 論文標題 Kynurenine 3-monooxygenase deficiency induces depression-like behavior via enhanced antagonism of 7 nicotinic acetylcholine receptors by kynurenic acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113191 ~ 113191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2021.113191	査読の有無 有
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 Wulaer Bolati, Kunisawa Kazuo, Tanabe Moeka, Yanagawa Aika, Saito Kuniaki, Mouri Akihiro, Nabeshima Toshitaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Pharmacological blockade of dopamine D1- or D2-receptor in the prefrontal cortex induces attentional impairment in the object-based attention test through different neuronal circuits in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00760-3	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 Kosuge Aika, Kunisawa Kazuo, Arai Satoshi, Sugawara Yumika, Shinohara Katsuki, Iida Tsubasa, Wulaer Bolati, Kawai Tomoki, Fujigaki Hidetsugu, Yamamoto Yasuko, Saito Kuniaki, Nabeshima Toshitaka, Mouri Akihiro	4. 巻 96
2. 論文標題 Heat-sterilized Bifidobacterium breve prevents depression-like behavior and interleukin-1 expression in mice exposed to chronic social defeat stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 200 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2021.05.028	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 國澤 和生, 飯田 翼, 齋藤 成, 小菅 愛加, Bolati Wulaer, Willy Jaya Suento, 山本 康子, 齋藤 邦明, 毛利 彰宏, 鍋島 俊隆
2. 発表標題 うつ病モデル動物における脳白質の異常
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuo Kunisawa, Bolati Wulaer, Kazuhiro Hada, Hisayoshi Kubota, Aika Kosuge, Tubasa Iida, Taku Nagai, Kiyofumi Yamada, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima, Akihiro Mouri
2. 発表標題 Shati/Nat8l deficiency disrupts adult neurogenesis and causes attentional impairment through dopaminergic neuronal dysfunction in the dentate gyrus.
3. 学会等名 Asian Conference on Clinical Pharmacy 2022 (ACCP2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國澤和生、小菅愛加、飯田翼、山本康子、齋藤邦明、鍋島俊隆、毛利彰宏
2. 発表標題 前頭前皮質におけるIDO1は社会的敗北ストレスによるうつ様行動を制御する。
3. 学会等名 第43回生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会合同年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuo Kunisawa, Aika Kosuge, Yumika Sugawara, Katsuki Shinohara, Tsubasa Iida, Bolati Wulaer, Tomoki Kawai, Hidetsugu Fujigaki, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima, Akihiro Mouri.
2. 発表標題 Heat-sterilized Bifidobacterium breve prevents depression-like behavior and interleukin-1 expression in mice exposed to chronic social defeat stress.
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuo Kunisawa, Bolati Wulaer, Aika Kosuge, Moeka Tanabe, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima, Akihiro Mouri
2. 発表標題 Shati/Nat8l deficiency impairs attention by disrupting dopaminergic projections of the ventral tegmental area-prefrontal cortex in mice.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------