

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500306

研究課題名（和文）成長因子が情動に作用する分子メカニズムと神経新生との関わり

研究課題名（英文）Analysis of the growth factor-mediated affective behavior and the correlation with adult neurogenesis.

研究代表者

有働 洋 (UDO HIROSHI)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70363322

研究成果の概要（和文）：

本研究では、成長因子として血管内皮細胞増殖因子と線維芽細胞増殖因子に注目し、それらが神経新生と情動に与える影響について解析した。血管内皮細胞増殖因子は、神経新生を増加させ抗うつ・不安作用を示したが、これは脳内モノアミンの調節によるものと考えられた。一方、線維芽細胞増殖因子には記憶を向上させる傾向が見られたが、情動や神経新生に影響はなかった。共に神経幹細胞の増殖や分化に関わる因子であるが、成体脳的作用には差異があることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We have characterized the effect of growth factors on affective behaviors and adult neurogenesis using mouse models. We showed that VEGF has antidepressant- and anxiolytic-like effects as well as the ability to enhance adult neurogenesis, which were found to involve monoaminergic modulation. In contrast, although bFGF tended to enhance memory, it did not influence affective behaviors as well as the level of adult neurogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：マウス、脳、成長因子、神経新生、情動、うつ、気分障害

1. 研究開始当初の背景

1990年代に成体における神経新生が広く認められるようになって以来、近年の研究は、神経新生の役割について注目されていた。神経新生は脳の基本単位である神経細胞を作り出す現象であることから、神経変性疾患

（アルツハイマー病など）で失われた神経細胞を補充して症状を軽減できる可能性があるほか、健常人においても脳機能の維持や活性化に関与している可能性があると考えられた。成体脳において神経新生が特に盛んな領域は2箇所あることが判明した。その一つ

である海馬は、以前より記憶や情動に関わっていることが知られていたため、神経新生の生物学的意義を探る上で特に関心が寄せられた。実際、神経新生が海馬依存性の記憶に寄与しているという報告や、神経新生と抗うつ作用との関係を示唆する報告も出始めた。

神経新生とうつ症状との関係性については、例えば、幾つかの抗うつ剤に神経新生を促進させる効果があること、抗うつ患者における海馬の委縮が神経新生の減少と相関していること、抗うつ剤の薬効が表われるまで数週間を必要とするが、新生神経細胞の成熟期間とほぼ同じであること、などの観測がある。さらに、この仮説を支持するように、近年、神経幹細胞の増殖や分化に関わる成長因子に抗うつ作用を示すものが見つかった（脳由来神経栄養因子とインスリン様成長因子）。

一方、我々は成長因子が記憶や情動などの脳機能に対してどのような作用があるのか解析を進めていた。中でも、神経幹細胞の増殖や分化に関わる成長因子、血管内皮増殖因子（VEGF）と塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を調べていた。これらの因子は、培養細胞を用いた実験で、神経幹細胞の増殖を促進させたり神経細胞への分化を促進させたりする事が知られている。我々は、それらのcDNAをCaMKIIプロモータの下流に挿入し、これをマウス受精卵に顕微注入することで、VEGFやbFGFを前脳で発現するトランスジェニックマウスを作製した。解析の結果、VEGFを発現するマウスでは神経新生の大幅な増加と共に、抗うつ作用等の情動が著しく変化していることを見出した（Udo, 2008）。当時、神経新生と抗うつ作用の相関が取りざたされていたこともあり、我々の結果は重要な示唆を与えた。更に、我々は、VEGFには抗うつ作用だけでなく、不安、恐怖、攻撃性を抑えるなど複数の情動を制御していることを初めて示した。この結果は、うつ病患者ではしばしば不安感や衝動性が同時に現れるといった臨床事例とよく一致している。すなわち、異なる種類の情動行動にも何らかの共通するメカニズムがあることが予想された。しかし、VEGFを含めて成長因子がどのようなメカニズムで情動を制御しているのか、ほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

上記のような背景から、我々は「成長因子が情動を制御するメカニズムを解析し、情動に対する神経新生の役割を明らかにすること」を目標とした。本研究で「情動」に焦点を当てた。その一つの理由としては、今日のようなストレス社会では、うつ病に代表される情動の異常（気分障害）が増加傾向にあり、社会問題化していることがある。例えば、うつ病は生涯有病率が2割にも及び、自殺者の

7割がうつ様であったと考えられている。そのため、気分障害の克服は、将来の健康的な社会を築いてゆく上で重要である。

気分障害のメカニズムは、1960年代にモノアミン仮説が提唱されて以来、盛んに研究が進められてきた。しかし、そのような努力にもかかわらず、未だに詳細なメカニズムが分かっていない。そんななか、神経新生とうつ病の仮説が提唱され注目を集めることとなったが、この仮説も十分に検証されていない。我々は、成長因子と脳機能に当てているが、本研究では、うつ病と神経新生について詳しくメカニズムを追求したい。このような研究は、将来、気分障害の克服において有用な知見を得られると考えられる。

我々は研究期間3年間の内容として、次の2つの目標を設定した。

(1) 成長因子による情動の制御には、どのようなシグナル系や脳領域が関わっているのか、明らかにすること

(2) 成長因子の抗うつ作用には神経新生が必須なのか、明らかにすること

以下に、研究の手法と成果を説明したい。

3. 研究の方法

主な実験手法を以下に示した。

(1) 実験動物

実験動物の飼育および実験は、九州大学の動物実験規則に従った。動物は、CaMKIIプロモーターの制御によりVEGFもしくはbFGFを前脳領域で発現するトランスジェニックマウス（TGマウス）である。これらのマウスは、ヘテロ接合体（+/-）として維持され、野生型マウス（WTマウス：C57BL6系統）と交配することで、1:1の割合でTGとWTマウスが得られる。実験では、交配で得られた同腹のWTマウスをコントロールとして、TGマウスとの差異を調べた（実験に応じて6-30週齢のマウスを使用した）。

(2) 分裂細胞の検出

マウスに核酸類似物質であるBrdUを腹腔投与し、DNA複製中の分裂細胞（神経幹細胞を含む）に取り込ませて標識を行う。その後、マウスから脳を取り出し、組織切片を作製し、BrdUに特異的な抗体を加えて反応をさせる。次に、蛍光物質が結合した2次抗体と反応させることで、BrdUで標識された分裂細胞が蛍光顕微鏡による観察で検出できるようになる。一方、BrdU陽性細胞の種類を特定する場合、細胞種に特異的なタンパク質に対する抗体を同時に反応させ、顕微鏡観察による共染色の有無によって識別した。

(3) モノアミン神経細胞の検出

モノアミン作動性神経は、組織切片を細胞種特異的な抗体で免疫染色することにより同定した。カテコールアミン（ドーパミンやノルアドレナリン等）作動性神経細胞の場合

はチロシン水酸化酵素に対する抗体を用い、セロトニン作動性神経細胞の場合はトリプトファン水酸化酵素に対する抗体を用いた。特定の脳領域を含む連続した脳切片を観察し、モノアミン作動性神経細胞の投射パターンや神経核を調べた。

(4) 脳内モノアミン量の測定

氷上で大脳皮質、線条体、海馬、脳幹を迅速に摘出し、組織の湿重量を測定した後、過塩素酸溶液でホモジナイズした。その後、可溶性画分をHPLCで分離し、電気化学的手法により脳内モノアミン(セロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミン)とそれらの代謝産物(5HIAA, MHPG, DOPAC)を検出した。モノアミン量はng/mg組織で示した。(研究協力:九州大学農学研究院の古瀬教授)

(5) 行動実験

10、30週齢の雄マウス(各群約10~20匹)を用いて学習・記憶および情動(うつ、不安、恐怖等)に関わる行動について解析を行った。学習・記憶に関しては、バーズ迷路を用いた空間記憶のテストや、恐怖条件付け装置を用いた恐怖記憶のテストを行った。情動については、強制水泳テストによりうつ様行動を、オープンフィールドテストおよび高架式十字迷路により不安様行動を解析した。薬理行動解析においては、セロトニン選択的抗うつ剤(シタロプラム:20 mg/kg体重、30分前に投与)、ノルアドレナリン選択的抗うつ剤(デシプラミン:20 mg/kg体重、30分前に投与)。また、カテコールアミン枯渇剤(AMPT:400 mg/kg体重、4時間前に投与)、セロトニン枯渇剤(PCPA:300mg/kg体重、3日前より12時間毎に投与)を用いた。

(6) 血管新生の解析

マウス脳切片を作製し、ビオチン付加したトマト由来レクチンと反応させた後(毛細血管の内壁に結合する)、蛍光物質を付加したアビジンと反応させ、蛍光顕微鏡を用いて血管系を可視化した。

(7) 電気生理学的解析

VEGFマウスを用い、記憶や情動に関わる海馬領域を調査した。氷冷下で400 μ m厚の海馬切片を調製した。酸素炭素混合ガスで飽和させた人工脳脊髄液に組織切片を浸し、一定時間安定化させた後、刺激電極と記録電極を刺入し、細胞外記録法を用いて海馬神経細胞の集合電位をモニターした。解析方法は、刺激強度に応じた応答の変化(入出力応答テスト)、一定間隔で同じ刺激を2回与えた場合の応答の変化(ペアードパルス増強)、高頻度刺激を与えた後の応答の経時変化(長期増強)、低頻度刺激を与えた後の応答の経時変化(長期抑圧)について調べた。(研究協力:九州大学理学研究院の伊藤功准教授)

(8) 血中コルチゾールの測定

一定時間にマウスより採血し、血漿成分を

ELISA法(酵素結合免疫吸着法)で分析することで、血中コルチゾール量を定量した。時間ポイントとしては、平常時(ストレス前)、1時間の拘束ストレス後、ストレス解放1時間後、の3点を用いた。

(9) 統計解析

統計解析は、2群間の比較にはStudent, Welchらのt検定、多群間の比較には1要因/2要因の分散分析を用い、多重比較検定にはTukey, Fisherらの方法を用いた。データは、平均値 \pm 標準誤差として表記し、有意差の判定基準はP値が0.05以下とした。

4. 研究成果

(1) 神経新生に対する成長因子の作用

まず、成体マウスにおける神経新生の程度を調査した。成体脳で神経新生が最も盛んな領域は、海馬歯状回と側脳室壁である。我々はまず、VEGFマウスを用い、海馬歯状回の顆粒細胞層下層(SGZ)での神経新生のレベルを調べた(図1)。その結果、生後6週齢のマウスにおいて、TGではWTの2倍の神経新生レベルの増加がみられた。この結果は、VEGFが成体での神経新生を促進させることを示し、他のグループの報告と一致していた。しかし、20週齢のVEGFマウスでは、神経新生レベルが減少し、WTマウスとほぼ同様であった。以前の調査より、TGマウスにおけるVEGFの脳内発現は、週齢によらず一定であることが分っている。すなわち、マウスの週齢によりVEGFの効果が異なる事実は、神経幹細胞の性質が変わっている可能性を示唆する。実際、VEGFマウスでは、神経幹細胞の数は20週齢以上であってもコントロールと比べて顕著に多かったことから、高週齢の神経新生には、VEGF以外の因子が共に作用する必要があると考えられる。

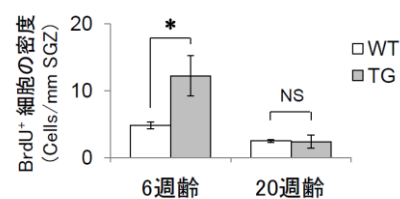


図1. VEGFによる神経新生の促進

一方、bFGFマウスにおいては、6週齢および30週齢のマウスにおいて、海馬歯状回と側脳室壁ともに、神経新生のレベルがWTマウスと変わらない事が判明した。報告によると、bFGFは培養神経幹細胞の増殖を促進させ、また、胎児に投与すると、生後の神経細胞の数を顕著に増加させる事が知られており、今回の結果とは対照的である。我々は、少なくとも、bFGFマウスの前脳におけるbFGFタンパク質の発現とその生理的活性(血管新生作用、下記)は確認できている。すなわち、bFGF

マウスの解析においても、成体における神経幹細胞に何らかの特性の変化が起きている可能性を示唆する結果を得た。

(2) 成長因子による血管新生作用

脳組織の神経幹細胞は毛細血管に隣接している場合が多く、血管系と神経系には何らかの相互作用があると思われる。実際、VEGF と bFGF とともに神経新生だけでなく血管新生を促進させる作用が報告されていた。そこで、トランスジェニックマウスにおいて、毛細血管の形成が見られるのかを調べ、それによって、脳内で発現させた VEGF や bFGF の生理学的な活性を検証することができる。VEGF マウスでは、その発現箇所である前脳において顕著な毛細血管の新生が確認された。同様に、bFGF マウスについても、海馬で有意な血管形成が観察された。bFGF が過剰発現していない小脳では変化が見られなかったことから、bFGF 特異的に血管新生が起きていた。これは、我々の予想した結果であり、遺伝子改変動物において発現した成長因子の生理作用が確かであることを示す。

(3) 成長因子による情動の変化

VEGF マウスにおいては、強制水泳実験（うつ様行動を解析）、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト（不安様行動を解析）の結果から、抗うつ様作用と抗不安様作用があることを報告した。また、レジデント・インテグレーションテストにより、VEGF マウスは攻撃性が顕著に低下していることが判明し、また、恐怖条件付けテストにより恐怖感が低下している結果を得た。行動実験は、10 と 30 週齢のマウスについて行われ、同様な結果を得ている。ここで、VEGF による神経新生の促進効果は一時的で、3-6 週齢をピークとして促進効果は激減したが、行動においては週齢にともなう変化は見られなかった（10 週齢と 30 週齢で比較）。

一方、bFGF マウスについては、うつ様行動、不安様行動、攻撃性、恐怖感等の情動行動について、コントロールと比べて顕著な変化はみられなかった。行動実験は、10 と 30 週齢のマウスについて調べたが、同様な結果が得られた。

(4) VEGF マウスの電気生理学的解析

VEGF マウスの海馬神経細胞について電気生理学的性質を解析した。海馬は記憶のほか情動にも関わっており、更に神経新生が盛んな場所であることから、この脳領域に注目することにした。検査項目としては、基礎的な神経伝達応答および長期可塑性である。入出力応答テストにより、海馬神経細胞における応答を見たところ応答（集合 EPSP）が上昇したが、これはコントロールと同程度であった。短期的な可塑性として、ペアードパルス刺激を行ったところ、VEGF マウスではコントロールと比べ僅かではあるが有意に上昇し

ていた。これは、シナプス前領域の応答性が上昇していることを示す。また、長期的な可塑性性質として、1 回の高頻度刺激で誘導される長期増強および 10 分間の低頻度刺激で誘導される長期抑制を観察したところ、VEGF および WT マウス間で有意な変化はみられなかった。すなわち、VEGF マウスで見出された情動行動の変化には、海馬の長期可塑性は余り関与していないことが推察された。

(5) 内分泌系ストレス応答の変化

視床下部-脳下垂体-副腎皮質軸（HPA 軸）は、内分泌調節系の一つであり、動物のストレス応答と深く関わっている。ストレスを受けると血中コルチゾールの濃度が上昇し、これが一過性の抗ストレス応答（血糖上昇、抗炎症作用等）を引き起こす。うつ病患者は、コルチゾール濃度が慢性的に高い傾向にあり、海馬をはじめとする脳領域で神経細胞の脆弱化が起きることが知られている。そこで、マウスに拘束ストレスを与え、平常時、1 時間の拘束後、回復 1 時間後において、血中コルチゾール濃度の変化を ELISA 法により解析した。すると、VEGF、bFGF マウスの両者において、コントロールと同様な変化を示した。つまり、コルチゾールの値が、平常時、ストレス負荷時、回復後の全てにおいて差がなかったことから、ストレスに対する内分泌系の応答は正常であることがわかった。すなわち、VEGF マウスの抗うつ・抗不安様行動は、下垂体-視床下部-副腎系を介したメカニズムによるものではない事が判明した。

(6) VEGF による脳内モノアミンの調節

脳内モノアミンは、動機、覚醒、注意、うつ、不安、快楽、苦痛など、様々な脳機能に関与している。ここでは、顕著な抗うつ様行動がみられた VEGF マウスについて、調査を行った。まず、免疫染色法を用いて脳組織のカテコールアミンおよびセロトニン作動性神経についておこなった（図 2）。しかし、脳幹に存在する神経核や神経投射に顕著な変化は見られなかった。

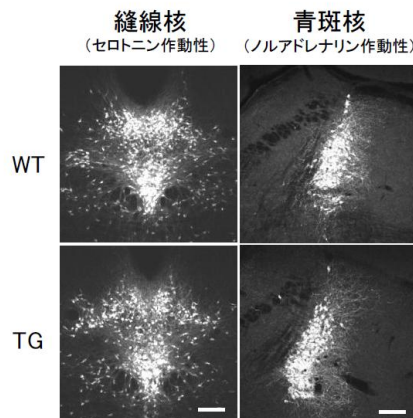


図2. 脳幹のモノアミン神経核

次に、脳内モノアミンとその代謝産物について調査を行った。大脳 (Ct)、線条体 (St)、海馬 (Hp)、脳幹 (Bs) の 4 領域について、モノアミンの分布を調べたところ、VEGF マウスでは、VEGF の発現がみられる前脳領域 (大脳、線条体、海馬を含む) においてノルアドレナリン (NE) とセロトニン (5HT) が有意に減少していた。しかし、VEGF が発現していない脳幹では有意差は見られなかった。すなわち、VEGF 特異的にモノアミン量が変化していることが分かった。一方、ドーパミンについては差はみられなかった。

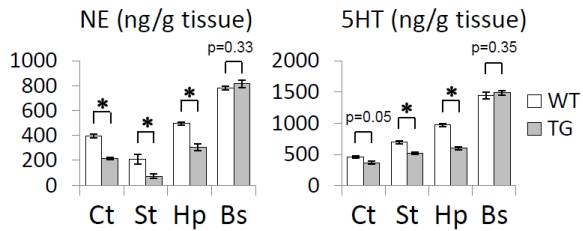


図3. 脳内モノアミン量の変化

また、モノアミンの代謝回転を調べるために、各モノアミンの代謝産物の比について調べたところ、ノルアドレナリンの代謝が顕著に上昇していた (MHPG/NE 比で 4 倍強増加)。一方、セロトニン代謝 (5HIAA/5HT) は若干減少したが、ドーパミン代謝 (DOPAC/DA) には変化はみられなかった。これらの解析により、VEGF マウスでは特にノルアドレナリンの脳内濃度の変化が顕著であることが考えられた。一般に、うつ病ではセロトニンやノルアドレナリンの脳内濃度の減少が関係していると考えられている。我々の結果は、確かにセロトニンとノルアドレナリンの関与が示唆するものであるが、脳内濃度の減少においては一般的な見解と異なっている。実際のところ、うつ病におけるモノアミンの役割はまだ不明な部分も多く、異なる実験結果も存在している。例えば、抗うつ剤の長期投与により脳内ノルアドレナリンが減少して代謝回転が上昇したという報告もあり、我々の結果と一致している。

(7) モノアミン合成の律速酵素

チロシン水酸化酵素とトリプトファン水酸化酵素は、それぞれカテコールアミンとセロトニンの合成に関わる律速酵素であり、この存在量がモノアミンの合成量を左右することが知られている。そこで、特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法で、それらの酵素の存在量を比較した。しかしながら、VEGF マウスとコントロールマウスにおいてタンパク質量には変化が見られなかった。すなわち、モノアミン解析で見出されたセロトニンやノルアドレナリンの減少は、モノアミン合成以外の要因 (例えば、モノアミン合成ではなく代謝) に起因していると考えられる。

(8) モノアミン受容体の脳内発現量

うつ病患者の病理学的や抗うつ剤投与により、ある種のモノアミン受容体の発現量が減少する現象 (ダウンレギュレーション) が報告されている。そのため、抗うつ様行動を示す VEGF マウスについて、セロトニンおよびアドレナリンの受容体の mRNA 発現量を RT-PCR 法により調査した (それぞれ 12、9 種類の受容体について検査)。その結果、ADRA1 のみにおいて有意差が見られたが (約 2 割の減少)、全体的としてコントロールと大差は無かった。すなわち、VEGF マウスの抗うつ様行動は、モノアミン受容体の発現量の変化に起因するものではない事が考えられた。

(9) VEGF マウスの行動薬理的解析

VEGF マウスの抗うつ行動に関して、モノアミン系が関与しているかどうかを調査するために、行動薬理の実験を行った。モノアミン代謝に影響を与える薬剤として、抗うつ剤 (選択的セロトニン・ノルアドレナリン取り込み阻害剤) や、モノアミン枯渇剤 (カテコールアミン系もしくはセロトニン系に対するもの) を投与して、強制水泳テストによる抗うつ様行動を観察した (図 4)。まず、コントロールとして生理食塩水を投与したグループでは、以前の結果と同様、VEGF マウスは WT マウスに比べて不動時間の割合が有意に減少しており、VEGF による抗うつ様作用が確認された。そこで、選択的ノルアドレナリン取り込み阻害剤であるデシプラミンを投与すると、WT マウスで有意に不動時間が減少し、抗うつ様効果がみられた。しかし、VEGF マウスにデシプラミンを投与しても、更なる抗うつ様行動の促進は見られなかった。次に、カテコールアミン枯渇剤である AMPT を投与したところ、WT マウスでは変化が見られなかったが、VEGF マウスでは不動時間の割合が有意に増加し、VEGF による抗うつ作用を低減させた。

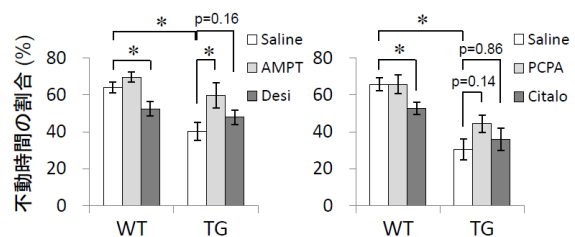


図4. 抗うつ作用のモノアミン依存性

一方、セロトニンに対する実験でも同様な結果が得られた。選択的セロトニン取り込み阻害剤であるシタロプラムの投与により、WT マウスでは不動時間が減少したが、VEGF マウスでは変化は見られなかった。反対に、セロトニン枯渇剤である PCPA を投与したところ、WT マウスでは変化が見られなかったが、VEGF マウスでは不動時間の割合が有意に増加し

ており、VEGF 依存性の抗うつ作用を低減させることがわかった。すなわち、VEGF による抗うつ作用には、ノルアドレナリンやセロトニンが関わっていることが判明した。これは、脳内モノアミンの解析結果と一致していた。

(10) まとめ

本研究では、成長因子として VEGF と bFGF に注目し、マウスモデルを用いて、それらの神経新生と情動に与える影響を解析した。その結果、VEGF の抗うつ作用は脳内モノアミンの調節によるものであることが分った。また、VEGF マウスの解析から、抗うつ作用のメカニズムには、神経新生に依存したものとそうでないものがある可能性が出てきた。さらに、神経幹細胞の性質は、少なくとも成長因子への感受性に関して、成長過程（胎児期、弱齢期、高齢期等）で異なることが推察された。VEGF と bFGF は共に神経幹細胞の増殖・分化に関わる因子であるが、成体脳的作用には差異があることが判明した。

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2件)

- ① Jin I, Udo H, Hawkins RD. Rapid increase in clusters of synaptophysin at onset of homosynaptic potentiation in Aplysia. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有 108:11656-61 (2011)
- ② Antonova I, Lu FM, Zablow L, Udo H, Hawkins RD. Rapid and long-lasting increase in sites for synapse assembly during late-phase potentiation in rat hippocampal neurons. PLoS One. 査読有 4:e7690 (2009)

[学会発表] (計2件)

- ① Udo H, Yoshida Y, Ohnuki K, Sugiyama H. A potential role of vascular endothelial growth factor in modulation of serotonergic and noradrenergic systems for antidepressant- and anxiolytic-like behaviors. Neuroscience 2010 (Society for Neuroscience)
平成22年11月16日 米国サンディエゴ
- ② Udo H, Hamasu K, Furuse M, Ohnuki K, Sugiyama H. Altered affective behavior in mice overexpressing vascular endothelial growth factor 120. 第32回日本神経科学大会
平成21年9月18日 名古屋

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：神経細胞分化促進剤

発明者：松川、有働、他

権利者：ユーハ味覚糖

種類：特許

番号：特願 2009-272229

出願年月日：2009年11月30日

国内外の別：国内

6. 研究組織

研究代表者

有働 洋 (UDO HIROSHI)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70363322