

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 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21680034

研究課題名（和文） うつ病におけるグルココルチコイドと脳由来神経栄養因子との相互作用の分子メカニズム

研究課題名（英文） Mechanism underlying the glucocorticoid-decreased function of neurotrophic factor in depression.

研究代表者

沼川 忠広 (NUMAKAWA TADAIRO)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第3部・室長

研究者番号：40425690

研究成果の概要（和文）：培養大脳皮質ニューロンにおいて、うつ病と関連するグルココルチコイドの曝露後、BDNF（脳由来神経栄養因子）が増強するシナプス成熟が抑制されることが明らかになった。そのメカニズムとして、BDNFの受容体である TrkB と shp2(ホスファターゼのひとつ)の結合力が弱まることに関与する可能性がある。また、うつ病のモデル動物の大脳皮質では、グルココルチコイド受容体(GR)の発現減少に起因する BDNF 機能低下を見出した。

研究成果の概要（英文）：Following glucocorticoid (stress hormone) exposure, BDNF-dependent synaptic maturation was decreased in cultured cortical neurons. We found that shp2-TrkB interaction, which is important for BDNF-mediated synaptic protein expression, was also reduced. In vivo models, we examined possible change of BDNF-related intracellular signaling in forebrain after restraint stress. We found that significant GR downregulation after restraint operation and confirmed a decrease in BDNF-stimulated neurotransmitter release.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	20,200,000	6,060,000	26,260,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療

1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病は、年間一人を越える自殺の主要因とされる罹患率の高い病気である。うつ病患者では、HPA系(視床下部-下垂体-副腎皮質)が亢進しており、ストレスホルモンであるグルココルチコイドが増加している。この増加したグルココルチコイドが脳に悪影響を与え、うつ病発症と密接に関係する可能性がある。しかし、神経細胞(ニューロン)において、グルココルチコイドの影響を細胞・分子レベルで解析した研究は少なかった。

(2) 脳に豊富に存在し、ニューロンの生存や機能調節に欠かせない分子である BDNF(脳由来神経栄養因子)の発現変化が、うつ病の病態と関わっている可能性があった。しかし、このうつ病との関連が疑われるグルココルチコイドと BDNF の相互作用についての知見はほとんどなかった。

2. 研究の目的

(1) グルココルチコイドの濃度上昇は、スト

レスに対する防御機構のひとつである。これらは抗炎症作用や血糖値の上昇などである。しかし、慢性的なストレスなどを原因として、このグルココルチコイドの濃度増加が持続する可能性がある。通常は海馬や視床下部などに発現する GR を介して、グルココルチコイドの濃度は定常状態に戻るが、このネガティブフィードバック機構の破綻により、グルココルチコイドの慢性的な濃度上昇が生じるとされる。そこで、本研究では、培養中枢ニューロンに対して長期間のグルココルチコイド曝露を行い、シナプス機能障害を詳細に解析した。

(2) BDNF は、ニューロンにおける生存維持やシナプス機能の増強などのプラスの働きをする。本研究では、グルココルチコイドがどのようなメカニズムによって、BDNF による細胞生存やシナプス機能増強を阻害するのか解析を行った。特に、BDNF には高親和性の TrkB 受容体と低親和性の p75 受容体が存在する。TrkB は、生存や神経機能の増強などのプラスの効果を発揮する。反対に、p75 は細胞死の誘導などの負の働きで知られる。本研究では、この二つの受容体のグルココルチコイドによる動態変化や、その下流の細胞内シグナル変化に注目した。

3. 研究の方法

(1) 主として大脳皮質ニューロンを用いた。深い麻酔を施した後、生後 1-2 日齢のラットの大脳皮質領域を素早く切り出し、酵素処理後、ピペッティングにより脳組織を細胞レベルまで分散させた。分散した大脳皮質ニューロンを、ポリエチレンイミンでコーティングしたプレートやディッシュにプレーティングした。その後、血清含有培地にて維持を行った。シナプス機能の評価などには、培養後 4 日目に合成グルココルチコイドである DEX (Dexamethasone) を添加し、24 時間後に BDNF を添加した。サンプル回収後、蛋白質レベルでの解析では主にウエスタンブロット法を用い、シナプス関連蛋白質や TrkB の下流シグナル分子群の活性化を測定した。また、PCR 法を用いて、シナプス機能との関連が予想される microRNA の定量を行った。

神経機能の測定には、細胞内カルシウムの濃度変化や、GFP と融合させた BDNF やその受容体などをニューロンに発現させ、その細胞内動態をリアルタイムイメージングシステムにて追跡した。また、培養ニューロンより放出されるアミノ酸神経伝達物質の量を定量した。

(2) 個体レベルでの解析のため、ラットを用いた拘束モデルを作成した。8-9 週齢のラットに対して、アクリル製のシリンダーを用いて 1 日あたり 6 時間の拘束ストレスを行い、これを 28 日間継続することで作成した。その後、うつ病様行動の測定とともに、大脳皮質における BDNF 関連分子の蛋白質レベルでの発現変化を詳細に解析した。さらに、急性の大脳スライスを作成し、BDNF が誘導する神経伝達物質放出の定量を行った。

(3) 統合失調症やうつ病などの機能性精神疾患では、発達段階におけるストレスにより、器質的および機能的な脳の障害が生じることが成人後の発症リスクを高める要因であると考えられている。そこで、妊娠期のラットの体内に、血管収縮剤を含んだ浸透圧ポンプを留置させ、低体重子仔を出産させた。そして、出生ラットから培養ニューロンを作成し、BDNF、TrkB、および p75 などの発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質ニューロンを 4-5 日間培養し、その後 DEX (1.0 μ M) を 24 時間投与した。その後さらに BDNF で刺激を行い、細胞内シグナルやシナプス関連蛋白質の発現を解析した。BDNF には、グルタミン酸受容体や、synapsin I などのシナプス関連蛋白質を増加させる働きがある。しかし、DEX が前処理されているニューロンではこのシナプス増加が阻害された。BDNF に依存したシナプス増加には、ERK シグナルの活性化が必要であったが、DEX はこの ERK の活性化を低下させることが明らかになった。そこで、ERK シグナルの活性レベルを調節することで知られるホスファターゼ shp2 の関与の可能性を考えた。BDNF の添加後、数分で TrkB と shp2 の相互作用が増加したが、DEX はこの相互作用を阻害した。一方で、shp2 のリン酸化には DEX による影響は観察されなかった。すなわち、TrkB-shp2 の相互作用は、TrkB の下流で働く ERK の活性化を維持する働きを持っている可能性がある。次に、shp2 の阻害剤を投与した場合、DEX と同様に ERK の活性化の低下が観察された。また、シナプス蛋白質の低下が、shp2 の阻害剤の存在下で確認された。さらに、shp2 の関与の可能性を精査するため、外来の shp2 遺伝子をニューロンに導入し、強制発現系における実験を行った。予想通り、shp2 が過剰発現したニューロンでは、DEX による BDNF 効果の阻害が観察されず、シナ

プス関連蛋白質発現の低下からのレスキュー効果が確認された(Kumamaru, Numakawa et al., *FEBS Lett.* 2011)。

BDNF やその受容体の細胞内移動の変化は、神経機能の変化として表れる可能性がある。これは、BDNF は神経活動依存的に発現が調節されており、さらに細胞外放出されてから機能する分泌性の蛋白質だからである。そこで、十分に成熟した培養ニューロンに、BDNF と GFP (緑色蛍光蛋白質)を融合させた蛋白質などを強制発現させ、細胞内移動を可視化し、グルココルチコイド曝露などで変化がみられるか、解析を行った。さらに、p75などをニューロンに発現させて、BDNF と同様に細胞内移動を可視化する実験系を確立した。これら BDNF 関連分子は、軸索や樹状突起などを一見不規則に移動している。しかし、細胞の部位をわけて細かく観察していくと、比較的規則正しく移動している可能性もあった。そこで、うつ病と関連が深いグルココルチコイドの添加により、移動の速度、局在、およびシナプス部位と位置関係などに変化がないか、詳しく解析中である。さらに、p75や TrkB の細胞内における位置関係にも注目している。

(2) ERK シグナルは、BDNF 依存的なシナプス蛋白質の発現維持に重要であるが(Numakawa et al., *Histol Histopathol.* 2010)、この ERK と脳に特異的な microRNA である miR-132 の関係を調べた。BDNF は培養大脳皮質ニューロンにおいて、顕著な miR-132 の発現を誘導するが、これには ERK の活性化が必要であった。そして、この BDNF に依存した miR-132 の発現は DEX で抑制され、その抑制メカニズムとして ERK の活性化の阻害が考えられた(Numakawa et al., *Neurchem.Int.* 2011)。この miR-132 の強制発現を行うと、予想通りグルタミン酸受容体などのシナプス関連蛋白質が増加した。すなわち、miR-132 は BDNF 刺激によるシナプス増加に重要な働きがあり、うつ病と関連するグルココルチコイドはこの miR-132 を低下させ、ニューロンの機能を阻害する可能性がある。また、別の神経栄養因子である bFGF (塩基性繊維芽細胞増殖因子)が、miR-132 を増加させることを見出した。この bFGF による効果は、グリア細胞であるアストロサイトでも発揮された。bFGF にはシナプス蛋白質を増加させる働きは観察されず、アストロサイトにおける作用を考慮すると、bFGF に依存した miR-132 の機能は興味深い。このような、うつ病と関連が深い BDNF やグルココルチコイ

ドで変化する miR-132 が、病態を知るうえで重要な疾患マーカーとなりうる可能性がある(Numakawa et al., *Neurosci Lett.* 2011)。

(3) ラットを 1 日に約 6 時間狭いアクリル製のシリンダーに保持し、これを 4 週間行った。この拘束ストレスにより、動物が強制水泳テストなどで無動時間が増加し、うつ様行動が観察されるようになった。そこで、大脳皮質における BDNF 関連分子の発現を解析した。BDNF やその受容体である TrkB および p75 の顕著な発現変動は観察されなかったが、GR 発現の有意な低下が観察された。以前に我々は、GR と TrkB は相互作用をしており、この分子間相互作用が BDNF が誘導する神経伝達物質であるグルタミン酸放出に重要であることを報告している(Numakawa et al., *PNAS*, 2009)。そこで、拘束を受けた動物の大脳皮質より急性のスライスを作成し、BDNF によるグルタミン酸放出量を測定した。その結果、グルタミン酸放出量が低下していた。このモデル動物では、血中のグルココルチコイド(コルチコステロン)が増加した。また動物に DEX をインジェクションした場合、GR の発現低下を確認した。以上のことを考え合わせると、ストレスによりグルココルチコイドが増加するが、これが GR の発現低下を引き起こし、TrkB-GR 相互作用の減少により BDNF による神経機能調節作用がうまく働かなくなる可能性がある。GR の発現低下による BDNF 機能低下はうつ病の病態を考えるうえで重要なターゲットとなる可能性がある。

(4) 脳の発達段階におけるストレスの曝露は、その後の脳の成熟に影響を与え、器質的および機能的な障害が生じるかもしれない。この発達段階での要因で、成人後、統合失調症など精神疾患発症のリスクが高まる可能性、いわゆる発達障害仮説がある。我々は、妊娠期にストレスを与え、低体重の出生仔を作成し、通常の体重の動物との脳の性質の違いを調べた。その結果、低体重仔の大脳皮質では、TrkB が著しく発現低下していた。一方で、p75 受容体や、BDNF に顕著な変化はみられなかった。低体重の出生仔および対照群から大脳皮質ニューロンの培養を行い、BDNF による細胞応答を解析した。その結果、ERK だけでなく、別の細胞内シグナルである Akt シグナリングも低下していた。さらに、培養細胞を用いて血清除去によるアポトーシスを誘導させたところ、低体重の出生仔由来のニューロンは脆弱で、BDNF による保護効果が十分に発揮できなかった(Ninomiya, Numakawa et

al., *Neurosci Lett.* 2010).

Phencyclidine(PCP)は、動物を用いた統合失調症のモデル作成によく用いられる。統合失調症では前述のように発達障害仮説が存在するが、PCP曝露などでニューロンの障害がどのようなメカニズムで生じるのかよくわかっていない。我々は、培養大脳皮質ニューロンにPCPを投与した場合、著しいシナプス関連蛋白質の発現低下を観察した。これは、電気生理学的手法によるシナプス活動にても裏付けられ、PCPはシナプス機能を阻害することを確認した。興味深いことに、PCPはニューロンにおける細胞内カルシウム動態を抑制する。BDNFは、細胞内カルシウム上昇を含む神経活動に依存して、細胞外放出される分泌性の蛋白質である。そこで、PCP存在下において細胞外に放出されたBDNF量を測定したところ、BDNF放出量が低下していた。さらに、PCPによるシナプスの低下は、外からBDNFを添加することで回復した。これらの結果は、PCPがカルシウム動態を阻害し、BDNFの細胞外放出を抑制し、その結果シナプス減少が生じている可能性を示唆している (Adachi, Numakawa et al., *Cereb Cortex*, 2012)。BDNFの発現のみならず、BDNFの放出の増強も、ニューロンの機能回復（可能性として病態からの回復）を考えるうえで、重要なターゲットとなる可能性がある。

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 14 件)

1. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards M, Wakabayashi C, Kunugi H
Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex"
査読有
Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 2012 in press
2. Adachi N, Numakawa T, Kumamaru E, Itami C, Chiba S, Iijima Y, Richards M, Katoh-Semba R, Kunugi H.
Phencyclidine-Induced Decrease of Synaptic Connectivity via Inhibition of BDNF Secretion in Cultured Cortical Neurons.
査読有
Cereb Cortex. 2012 In press
3. Wakabayashi C, Numakawa T, Ninomiya M, Chiba S, Kunugi H.
Behavioral and molecular evidence for psychotropic effects in L-theanine.
査読有
Psychopharmacology (Berl). 219 2012 1099-1109
doi: 10.1007/s00213-011-2440-z
4. Numakawa T, Yamamoto N, Chiba S, Richards M, Ooshima Y, Kishi S, Hashido K, Adachi N, Kunugi H.
Growth factors stimulate expression of neuronal and glial miR-132.
査読有
Neurosci. Lett. 505 2011 242-247
doi: 10.1016/j.neulet.2011.10.025
5. Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, Kunugi H.
Glucocorticoid suppresses BDNF-stimulated MAPK/ERK pathway via inhibiting interaction of Shp2 with TrkB.
査読有
FEBS Lett. 585 2011 3224-3228
doi: 10.1016/j.febslet.2011.09.010
6. Numakawa T, Richards M, Adachi N, Kishi S, Kunugi H, Hashido K.
MicroRNA function and neurotrophin BDNF.
査読有
Neurochem. Int. 59 2011 551-558
doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.009
7. Numakawa T, Matsumoto T, Numakawa Y, Richards M, Yamawaki S, Kunugi H.
Protective action of neurotrophic factors and estrogen against oxidative stress-mediated neurodegeneration.
査読有
J. Toxicol. 2011 2011 2011:405194
doi: 10.1155/2011/405194
8. Ninomiya M, Numakawa T, Adachi N, Furuta M, Chiba S, Richards M, Shibata S, Kunugi H.
Cortical neurons from intrauterine growth retardation rats exhibit lower response to neurotrophin BDNF.
査読有
Neurosci Lett. 476 2010 104-109
doi:10.1016/j.neulet.2010.03.082
9. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Yoon HS, Kunugi H.

- Cabergoline, a dopamine receptor agonist, has an antidepressant-like property and enhances brain-derived neurotrophic factor signaling.
 査読有
Psychopharmacology **211** 2010 291-301
 doi: 10.1007/s00213-010-1894-8
10. Numakawa T, Yokomaku D, Richards M, Hori H, Adachi N, Kunugi H.
 Functional interactions between steroid hormones and neurotrophin BDNF.
 査読有
World J. Biol. Chem. **1** 2010 133-143
 doi: 10.4331/wjbc.v1.i5.133
11. Kunugi H, Hori H, Adachi N, Numakawa T.
 Interface between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression.
 査読有
Psychiatry Clin. Neurosci. **64**
 2010 447-459
 doi: 10.1111/j.1440-1819.2010.02135.x
12. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H.
 BDNF function and intracellular signaling in neurons.
 査読有
Histology and Histopathology **25**
 2010 237-258.
13. Tuerxun T, Numakawa T, Adachi N, Kumamaru E, Kitazawa H, Kudo M, Kunugi H.
 SA4503, a sigma-1 receptor agonist, prevents cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death via suppression of MAPK pathway activation and glutamate receptor expression.
 査読有
Neuroscience Letters **469**
 2010 303-308.
 doi:10.1016/j.neulet.2009.12.013
14. Kitazawa H, Numakawa T, Adachi N, Kumamaru E, Tuerxun T, Kudo M, Kunugi H.
 Cyclophosphamide promotes the cell survival via activation of intracellular signaling in cultured cortical neurons.
 査読有
Neuroscience Letters **470**
 2010 139-144.
 doi:10.1016/j.neulet.2009.12.073
- 〔学会発表〕
 ○国際学会（国際学会 8 件のみ記載、その他国内学会 27 件 内招待講演 5 件）
1. Numakawa T (他5名)
 Negative Effect of Glucocorticoids on Neuronal Function of Brain-derived Neurotrophic Factor.
 BIT's 5th Anniversary of PepCon-2012
 2012年 3月23-25日
 Beijing International Convention Center, Beijing, China
 2. Adachi N, Numakawa T (他7名)
 Phencyclidine-Induced Synaptic Loss via Inhibition of BDNF Secretion in Cultured Cortical Neurons.
 BIT's 5th Anniversary of PepCon-2012
 2012年 3月23-25日
 Beijing International Convention Center, Beijing, China
 3. Kishi S, Numakawa T, Adachi N, Kunugi H, Hashido K.
 Possible Involvement of miRNA-132 in Neuronal Function of Brain-derived Neurotrophic Factor.
 BIT's 5th Anniversary of PepCon-2012
 2012年 3月23-25日
 Beijing International Convention Center, Beijing, China
 4. Furuta M, Numakawa T (他6名)
 Estrogen receptor α -and BDNF-mediated intracellular signaling in anxiety- and depression-like behaviors in postpartum rats.
 Society for Neuroscience 2011
 2011年 11月12-16日
 Walter E. Washington Convention Center, Washington D.C., USA
 5. Numakawa T, Adachi N, Kumamaru E, Kunugi H.
 Interactions between Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids.
 BIT Life Sciences' 4th Annual Protein and Peptide Conference
 2011年 3月23-25日
 Beijing, China National Convention Center
 6. Adachi N, Numakawa T (他6名)
 Possible involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) dysfunction in synaptic loss caused by phencyclidine.
 BIT Life Sciences' 4th Annual Protein and Peptide Conference
 2011年 3月23-25日

Beijing, China National
Convention Center

7. Adachi, N., Numakawa, T. (他 6 名)
PHENCYCLIDINE DECREASES
EXCITATORY SYNAPSES: POSSIBLE
INVOLVEMENT OF DYSFUNCTION
OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC
FACTOR

The Asian-Pacific Society for
Neurochemistry
2010 年 10 月 17-20 日
Phuket Island, Thailand,
Phuket Graceland Resort and Spa

8. Numakawa, T. (他 5 名)
GLUCOCORTICOID SUPPRESSES BDNF-
TRIGGERED GLUTAMATE RELEASE VIA
DECREASING INTERACTION BETWEEN
GLUCOCORTICOID RECEPTOR AND TRKB

The Asian-Pacific Society for
Neurochemistry
2010 年 10 月 17-20 日
Phuket Island, Thailand,
Phuket Graceland Resort and Spa

〔図書〕 (計 5 件)

1. 沼川忠広, 岸宗一郎, 橋戸和夫
神経特異的 microRNA と神経伝達
Function of brain specific microRNA
and neurotransmission
細胞工学, 31, p683-686, 学研メディカル
秀潤社 (2012).

2. 沼川忠広, 功刀浩
相互作用するストレスホルモン (グルコ
コルチコイド) と BDNF 機能
生化学, 82, p419-422, 社団法人日本
生化学会 (2010).

3. 功刀 浩、千葉秀一、堀 弘明、沼川忠
広
治療抵抗性うつ病に対するドパミン受
容体作動薬の有用性に関する検討
(Depression Frontier) 8, p85-90, 医薬
ジャーナル社 (2010).

4. 沼川忠広, 功刀浩
脳由来神経栄養因子(BDNF)の機能を抑
制するストレスホルモン.
医学のあゆみ 231, p1015-1018, 医歯薬
出版株式会社 (2009).

5. 沼川忠広
グルココルチコイド受容体および

BDNF 受容体の相互作用に制御される
グルタミン酸放出. (Glucocorticoid
receptor interaction with TrkB
promotes BDNF-triggered glutamate
release.)
神経化学, 48, p301-307, 神経化学会
(2009).

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r3/staff/numakawa.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
沼川 忠広 (NUMAKAWA TADAHIRO)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究セン
ター 神経研究所 疾病研究第 3 部・室長
研究者番号: 40425690

(2) 研究分担者
ありません

(3) 連携研究者
ありません