

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790074

研究課題名(和文) 抗うつ治療モデルにおける脳部位特異的な遺伝子ネットワークのシステム解析

研究課題名(英文) The effect of physiological antidepressant treatments on the gene expression pattern in hypothalamic nuclei

研究代表者

瀬木 恵里 (SEGI ERI)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：70378628

研究成果の概要(和文)：

抗うつ薬治療の作用機序については未だ不明な点が多いのが現状である。本研究ではうつ病治療モデルを用いて、脳内での遺伝子発現変化の同定を目的とした。特に、ストレス反応を制御する部位(視床下部・室傍核)に注目した。その結果、抗うつ治療により特に精神疾患との関連が示唆されるプロテインキナーゼCやニューロペプチドYの発現が減弱することが明らかとなり、抗うつ治療によりこれまで知られていなかった視床下部室傍核での新たな遺伝子発現変化が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：

The exact mechanisms underlying the actions of physiological antidepressant treatment (electroconvulsive therapy) are not yet understood. To identify the gene expression changes by antidepressant treatments in the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), microarray analysis was performed. I identified several genes as differentially regulated in PVN by electroconvulsive therapy. Although the involvement of the identified gene products in antidepressant effects still remains unknown, some of down-regulated genes, such as protein kinase C and neuropeptide Y, have been reported their relevance to psychological disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：精神分子薬理学、抗うつ治療、遺伝子発現、視床下部

1. 研究開始当初の背景

うつ病の発症機序や抗うつ薬治療の作用機序については未だ不明な点が多いのが現状である。うつ病態・抗うつ治療における分子的なメカニズムについては、近年海馬・前頭前野での解析に焦点が当てられている。しか

しながら、臨床的には視床下部・扁桃体など情動を制御する領域の関与も強く示唆されていることから、本領域の関与について分子メカニズムでの解析を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、うつ病治療モデルにおいて、脳内の細胞レベル・分子レベルでどのような変化が起きているかを同定することである。本研究で明らかにしようとする内容は、(1) 抗うつ治療により活性化される視床下部や扁桃体の神経核を特定し、(2)そこでの網羅的な遺伝子発現変化を捉えることで、(3) 脳部位特異的な遺伝子ネットワークのシステム解析を行い、抗うつ治療プロセスの領域特異的な働きを同定することである。

3. 研究の方法

上記に記した研究目的を達成するために、以下の3点に関する研究を計画した。

(1) 抗うつ治療モデルにおいて活性化される視床下部や扁桃体の神経核の同定。

抗うつ治療モデルとして、マウスに対し電気けいれんショック法を用いた。電気けいれん法は、既存の抗うつ薬に効果を示さない重度の患者に対して用いられる治療であり、現在最も有効な治療法として確立されている。近年は、ラット本モデルで、視床下部や扁桃体の一部の神経核で、細胞増殖反応や c-fos の発現を指標とした神経の活性化が起きていることが見だされている (Jansson *et al.* Biol. Psychiatry 2006) ため、本研究ではマウスに本モデルを適応し、細胞増殖反応や c-fos の発現を指標として活性化された視床下部や扁桃体の神経核の同定を行った。

(2) 脳切片からのマイクロダイセクション法を用いた組織片単離・微量 RNA 抽出法の確立。マウス脳切片からマイクロダイセクション法を用い切片からの組織片単離を行った。過去にラット海馬を用いた電気けいれん法で遺伝子の発現変化が検討されていることから、ポジティブコントロールとしてマウス海馬の歯状回を用いた。脳組織片から RNA を抽出し、逆転写後に網羅的な遺伝子発現解析のため cDNA の増幅を行い、マイクロアレイ解析を行った。本項目では脳組織に適した切片厚・固定法・染色法の確立と回収 RNA 量に見合った cDNA の増幅法の確立が主たる目的とした。

(3) 抗うつ治療モデルで活性化される視床下

部や扁桃体の神経核網羅的な遺伝子発現変化の同定・確認とその遺伝子ネットワークのシステム解析・生物学的寄与の検討。

電気けいれん法で活性化が確認された視床下部や扁桃体の神経核に対して、マイクロアレイ解析を行い、網羅的な遺伝子発現変化の同定を行った。単回刺激の時間経過と複数回刺激の時間経過を追い、同一組織内における遺伝子発現変化を同定し、時間経過による発現クラスターの変化とシグナルネットワークの変化を解析した。

4. 研究成果

H21 年度の成果

(1) 抗うつ治療モデルにおいて活性化される視床下部や扁桃体の神経核の同定。

抗うつ治療モデルとして、マウスに対し電気けいれんショック法を用い、c-fos の免疫染色を指標として活性化された視床下部の神経核の同定を行った。その結果、視床下部のうち、特に腹内側核と室傍核において、c-fos の発現が上昇しており、神経核の活性化が起こっていることが明らかとなった。

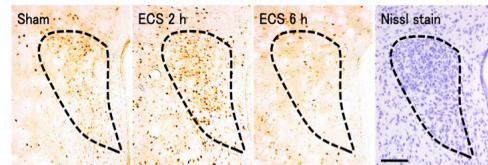


図1. 抗うつ治療による視床下部室傍核での神経活性化

(2) マイクロダイセクション法を用いた、脳切片からの組織片単離と微量 RNA 抽出法の確立。

マウス脳切片からマイクロダイセクション法を用い切片からの組織片単離を行った。脳組織に適した切片厚・固定法・染色法の確立を行い、RNA の分解を最小限にとどめ、1 匹の視床下部神経核から約 1ng 程度の RNA 単離に成功した。この後、回収 RNA 量に見合った cDNA の増幅法の確立のため、RNA 量を 1-100ng でスタートした場合で逆転写・増幅・ラベリングを行い、マイクロアレイ解析の信頼性を検討した。その結果 2 ng RNA スタートで再現性が高いことを確認した。



図2. マイクロダイセクション法を用いた、脳切片からの組織片単離

H22年度の成果

(3) 抗うつ治療モデルによる視床下部室傍核での網羅的発現変化の同定

抗うつ治療モデルとして、マウスに対し電気けいれんショックを用い、電気けいれん刺激後の脳切片から視床下部室傍核のRNA抽出を行い、マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現の同定を行った。

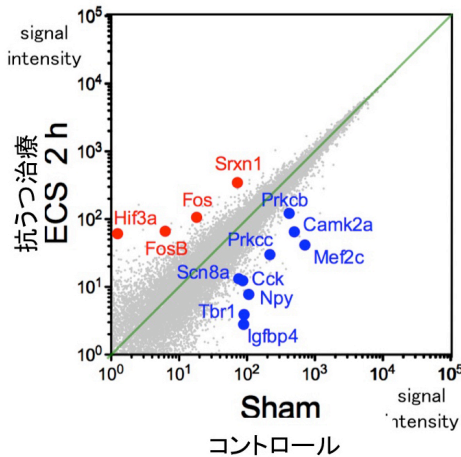


図3. 抗うつ治療モデルによる視床下部室傍核での網羅的発現変化の同定

(4) 視床下部室傍核での遺伝子変化の解析
発現変化に基づく遺伝子のクラスタリングを行った後、室傍核における遺伝子ネットワーク変化の解析を行ったところ、変化した遺伝子群の内、これまで精神疾患との関連が報告されている遺伝子群との相関が最も高かったのは電気けいれん刺激によって発現が減少する群であることが明らかとなった。

(5) 定量的PCR法を用いた遺伝子発現の時間経過変化

発現が減少する遺伝子群について、特に精神疾患との関連が示唆されるコレシストキニン・ニューロペプチドY等の室傍核における発現を定量的PCR法にて時間的経過を追って検討した。これらの検討により、抗うつ治療によりこれまで知られていなかった視床下部室傍核での新たな遺伝子発現変化が見いだされた。今後、これら因子が抗うつ治療の効果発現にどのような役割を果たすか検討することが課題である。

Gene symbol	Gene name	Average log ₂ (fold change)
(a) up-regulated genes		
V1ra3 / V1ra4	vomeronal 1 receptor, A3 / vomeronasal 1 receptor, A4	6.0
Hif3a	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	5.6
Gadd45b	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	4.6
Hspg2	perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)	3.5
Spry2	sprouty homolog 2 (Drosophila)	3.5
Fosb	FBJ osteosarcoma oncogene B	3.4
Strbp	spermatid perinuclear RNA binding protein	3.2
Tnfrsf12a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	3.2
Dsp	desmoplakin	2.8
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	2.5
Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	2.3
(b) down-regulated genes		
Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	-5.0
Tbr1	T-box brain gene 1	-4.5
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	-4.1
Bche	butyrylcholinesterase	-4.1
Fbxo22	F-box protein 22	-4.1
Cck	cholecystokinin	-3.8
Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	-2.9
Prkcc	protein kinase C, gamma	-2.9
Npy	neuropeptide Y	-2.8
Scn8a	sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha	-2.5
Prkcb	protein kinase C, beta	-1.8

表1. 抗うつ治療によって発現変化した代表的な遺伝子

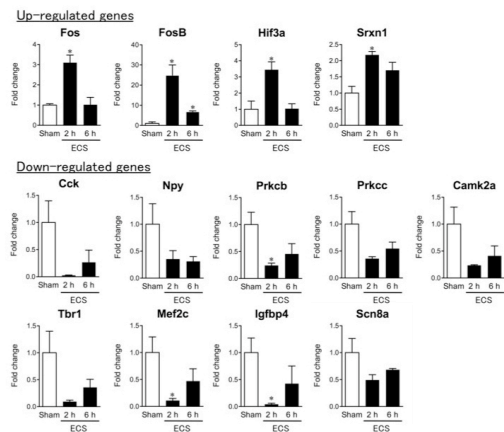


図4. 抗うつ治療によって発現変化した遺伝子の定量的PCRによる確認

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6件)

1. Segi-Nishida E. Exploration of new molecular mechanisms for antidepressant actions of electroconvulsive seizure. Biol. Pharm. Bull. in press, 査読有り

2. Esaki Y, Li Y, Sakata D, Yao C, Segi-Nishida E., Matsuoka T, Fukuda K, Narumiya S. Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(27): 12233-12238. 2010, 査読有り

3. Tamba S, Yodoi R, Morimoto K, Inazumi T, Sukeno M, Segi-Nishida E., Okuno Y, Tsujimoto G, Narumiya S, Sugimoto Y. Expression profiling of cumulus cells reveals functional changes during ovulation and central roles of prostaglandin EP2 receptor in cAMP signaling. Biochimie. 665-675. 2010, 査読有り

4. Yamaoka K, Yano A, Kuroiwa K, Morimoto K, Inazumi T, Hatae N, Tabata H, Segi-Nishida E., Tanaka S, Ichikawa A, Sugimoto Y. Prostaglandin EP3 receptor superactivates adenylyl cyclase via the Gq/PLC/Ca²⁺ pathway in a lipid raft-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun. 389(4):678-682. 2009, 査読有り

5. Yodoi R, Tamba S, Morimoto K, Segi-Nishida E., Nishihara M, Ichikawa A, Narumiya S, Sugimoto Y. RhoA/Rho kinase signaling in the cumulus mediates extracellular matrix assembly. Endocrinology. 3345-3352. 2009, 査読有り

6. Tsuchiya S, Tachida Y, Segi-Nishida E., Okuno Y, Tamba S, Tsujimoto G, Tanaka S, Sugimoto Y. Characterization of gene expression profiles for different types of mast cells pooled from mouse stomach subregions by an RNA amplification method. BMC Genomics. 10:35. 2009, 査読有

り

〔学会発表〕(計2件)

1. 瀬木(西田)恵里 (発表者) 他、Gene profile of electroconvulsive seizures of the paraventricular nucleus of hypothalamus、第33回日本神経科学大会、2010年9月3日、神戸コンベンションセンター (兵庫県)

2. 瀬木(西田)恵里 (発表者)、アレルギー性喘息・うつ病を中心とする病態・治療基盤の分子メカニズム研究、日本薬学会・第130年会、2010年3月29日、岡山コンベンションセンター (岡山県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://pharminfo.pharm.kyoto-u.ac.jp/kadail.html>

本研究内容について平成22年10月奈良県西大和学園高等学校(スーパーサイエンスハイスクール指定)で高校1年生向け講義。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬木 恵里 (SEGI ERI)

京都大学 薬学研究科 准教授

研究者番号: 70378628

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

杉本幸彦 (SUGIMOTO YUKIHIKO)

熊本大学 薬学研究科 教授

奥野恭史 (OKUNO YASUSHI)

京都大学 薬学研究科 教授