

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890154

研究課題名（和文）うつ病における pro-domain BDNF の役割の生化学的解析

研究課題名（英文）The role of pro-domain BDNF in depression

研究代表者

松本 知也 (MATSUMOTO TOMOYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究員

研究者番号：30552567

研究成果の概要（和文）：

脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）は、脳の高次機能に重要な分泌性蛋白質である。一方、pro-domain BDNF については、これまで機能はおろか、その存在さえ確認されていなかった。本研究では、pro-domain BDNF が脳神経細胞に安定して存在すること、およびBDNFと複合体を形成することを初めて明らかにした。現在、うつ病における役割について解析中である。

研究成果の概要（英文）：

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a secreted protein that plays a key role in brain function, while the function of pro-domain BDNF was unknown. In this study, pro-domain BDNF was detected in brain neurons for the first time. It might exist as a complex with BDNF. The role of pro-domain BDNF in depression is being examined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：神経生化学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：うつ病、BDNF、pro-domain

## 1. 研究開始当初の背景

脳は、ヒトの豊かな精神活動を支える器官である。ストレス、老化、あるいは遺伝子変異により脳の機能が障害されると、神経変性疾患や精神疾患に陥り、その後の生活の質（QOL）の低下につながる。従って、脳メカニズムの解明が不可欠である。

脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）は、中枢神経細胞の分化促進、シナプス可塑性の制御、お

よび神経保護に重要なニューロトロフィンファミリーの一員である（Bibel and Barde, Genes and Development, 2000）。最近、ヒトの記憶形成過程に BDNF が関与することが報告され（Egan et al., Cell, 2003）、脳メカニズムに迫るツールとして、BDNF はますます注目されている。実際、BDNF は、成熟脳、特に脳の高次機能に重要な海馬・大脳皮質において発現が高く、これらの領域でシナプス伝達を制御する（Poo, Nature Reviews

Neuroscience, 2001)。さらにBDNFは、神経活動依存的に発現し、分泌することが知られており、神経活動とBDNFが互いに正のフィードバック制御を受けることにより、脳機能に寄与していると考えられている (Matsumoto et al., Molecular and Cellular Neuroscience, 2006)。

BDNF蛋白質は、多くの分泌性蛋白質で見られるように、まず前駆体 (pro-BDNF) として作られる。その後、翻訳後切断により成熟体 mature BDNF (BDNF) となる。研究代表者は、最近、pro-BDNF から BDNF となる生合成およびプロセッシング過程を詳細に解析し、このプロセッシングが神経細胞内で行われることを明らかにした (Matsumoto et al., Nature Neuroscience, 2008)。しかしながら、もう片側の pro-BDNF 切断産物である pro-domain BDNF については、これまでほとんど研究されていなかった。

一方、BDNF のうつ病への関与が指摘されている (Duman and Mantegia, Biological Psychiatry, 2006)。例えば、うつ病を引き起こすストレスを受けると脳内 BDNF のレベルが低下することや、逆に抗うつ薬によってそのレベルが増加することが報告されている (Nibuya et al., Journal of Neuroscience, 1995)。さらに、うつ病患者の血清 BDNF 濃度は健常者に比べ低く、治療により寛解すると BDNF 濃度が回復する (Shimizu et al., Biological Psychiatry, 2003) など、うつ病の BDNF 異常仮説を支持する研究成果が数多く発表されている。興味深いことに、最近、BDNF の生合成、細胞内輸送、切断および分泌過程の障害がうつ病発症に関与する仮説が提唱された (Martinowich et al., Nature Neuroscience, 2007)。しかしながら、pro-domain BDNF とうつ病との関連については明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで機能はおろか、その存在さえ確認されていなかった pro-domain BDNF に着目し、脳機能における役割の解明、およびうつ病の病態解明を目的に、以下のことに取り組んだ。

### (1) 基礎知見の収集

- ① pro-BDNF 切断産物として、pro-domain BDNF が実際に神経細胞に安定して存在しているのか？それとも pro-BDNF 切断後、速やかに分解されてしまうのか？
- ② 安定して存在しているとすれば、pro-domain BDNF は神経細胞のどこに局在しているのか？BDNF と共局在しているのか？
- ③ BDNF と pro-domain BDNF は複合体を形成するのか？
- ④ BDNF と同様に、pro-domain BDNF もまた細胞外へ分泌されるのか？

### (2) 脳における役割

pro-BDNF 切断後、BDNF と同様に pro-domain BDNF もまた安定して存在し、細胞外へ分泌されるならば、その作用は何であろうか？

- ① リコンビナント pro-domain BDNF の添加による、マウス培養神経細胞の形態への影響。
- ② BDNF と pro-domain BDNF が共に分泌するならば、BDNF の作用に対して pro-domain BDNF はどのような影響を及ぼすのか？
- ③ BDNF は、TrkB や p75 受容体を介して細胞内シグナルを活性化させることによりその作用を発揮する。それでは、pro-domain BDNF はどのような受容体を介した細胞内シグナルを活性化させるのか？

### (3) うつ病との関連

- ① うつ病モデル動物を作製し、脳内 pro-domain BDNF 量が増加するか調べる。
- ② 抗うつ薬を動物に投与することにより、pro-domain BDNF 量が増加するか？
- ③ うつ病患者の血清中の pro-domain BDNF 量は、健常者に比べ変化するか？

## 3. 研究の方法

本研究では、(1) pro-domain BDNF の特異的な検出システムを確立し、(2) 脳組織および培養神経細胞を用いて内在性 pro-domain BDNF に関する基礎知見を集め、(3) うつ病モデル動物脳組織やうつ病患者血清を用いて、うつ病との関連について解析を行った。以下、それぞれについて、方法を説明する。

### (1) pro-domain BDNF の特異的な検出システムの確立

- ① 抗 pro-domain BDNF 抗体の開発。市販の抗 pro-domain BDNF 抗体の検討に加え、pro-domain BDNF を認識するラビットポリクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体の開発を試みた。抗体の評価は、主にリコンビナント pro-domain BDNF を用いたウエスタンブロット法により行った。
- ② ①で評価された抗 pro-domain BDNF 抗体を用いて、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、免疫組織染色法に応用し、マウス脳組織を用いて、内在性 pro-domain BDNF を検出するシステムの確立を目指した。特異性の確認は、主に conditional BDNF ノックアウトマウス (Matsumoto et al., Nature Neuroscience, 2008) の脳組織を用いて行った。

### (2) リコンビナント pro-domain BDNF、脳組織および培養神経細胞を用いた内在性 pro-domain BDNF に関する基礎知見の解析

- ① (1) ②で確立した pro-domain BDNF の特異的な検出システムを用いて、マウスあるいはラット脳の蛋白質抽出液において pro-domain BDNF が安定して存在するか調べた。また、脳組織免疫染色により、pro-domain BDNF の細胞内局在について調べた。
- ② マウスおよびラット培養神経細胞を用い

て、pro-domain BDNF が細胞外へ分泌されるか調べた。

③リコンビナント pro-domain BDNF および BDNF を培養神経細胞に添加することにより、細胞の形態が変化するか調べた。

④リコンビナント pro-domain BDNF および BDNF を用いて、両者が複合体を形成するか調べた。

(3) うつ病との関連について

①うつ病モデル動物、例えば母子分離ラットモデルを用いて、pro-domain BDNF の脳内量が変動するか解析した。

②ヒト血清中の pro-domain BDNF を検出するシステムを確立し、うつ病患者の血清中 pro-domain BDNF 量が変動するか解析した。

#### 4. 研究成果

##### 【研究成果】

(1) 産業技術総合研究所、小島正己研究室との共同研究により、pro-domain BDNF を特異的に認識するラビットポリクローナル抗体の開発に成功した。さらに安定した抗体供給を目指し、北里大学、高橋正身研究室との共同研究により、同マウスモノクローナル抗体の開発に取り組んでいる。

(2) (1) で開発したラビットポリクローナル抗体と市販の抗 pro-domain BDNF 抗体を用いて、免疫沈降法およびウエスタンブロット法により、リコンビナント pro-domain BDNF の検出に成功した。

(3) マウス脳蛋白質抽出液より内在性 pro-domain BDNF の検出に成功した。得られたシグナルの特異性は、conditional BDNF ノックアウトマウスの脳蛋白質抽出液を用いて確認した。さらに、pro-domain BDNF は、BDNF とほぼ同じ量で安定して存在していることが分かった。脳内 pro-BDNF:BDNF : pro-domain BDNF 比は、およそ 1:9:9 であった。

(4) リコンビナント pro-domain BDNF および BDNF を用いて、抗 pro-domain BDNF 抗体および抗 BDNF 抗体による共免疫沈降法およびウエスタンブロット法により、これらが複合体を形成することを見出した。

(5) 脳組織免疫組織染色を行い、pro-domain BDNF と BDNF は pro-BDNF の切断後、共に神経末端に運ばれることを見出した。

(6) 産業技術総合研究所、小島研究室との共同研究により、マウスおよびラット培養神経細胞を用いて、pro-domain BDNF が BDNF と同様に神経活動依存的に細胞外へ分泌されることを見出した。

(7) 産業技術総合研究所、小島研究室との共同研究により、pro-domain BDNF による培養神経細胞の形態への影響、およびそのシグナル経路に関して現在解析中である。

(8) 母子分離ラットから脳組織蛋白質抽出

液を調製し、脳内 BDNF 量を測定した結果、BDNF 量の減少が確認された。現在、pro-domain BDNF 量が同様に減少しているか解析中である。

(9) 健常者から調製したヒト血清を用いて、BDNF の特異的な検出システムを確立した。現在、pro-domain BDNF 検出システムの確立を試みている。今後、うつ病患者の血清を集め、BDNF および pro-domain BDNF レベルに変化が見られるか解析したい。

##### 【まとめと今後の展望】

これまでその存在さえ確認されていなかった pro-domain BDNF に関して、本研究によりその基礎知見がかなり明らかになった。pro-BDNF 切断産物として pro-domain BDNF は、BDNF と同じく比較的安定して存在し、神経末端まで運ばれ、共に分泌される。また、pro-domain BDNF と BDNF は複合体として分泌されている可能性が示唆された。pro-domain BDNF の作用については現在解析中であるが、BDNF の作用に対する影響も考慮しながら、今後、慎重に解析を進める必要がある。pro-domain BDNF の作用が詳細に明らかになれば、うつ病モデル動物を用いた解析が進み、うつ病病態を新たな切り口で研究していくことができるが、本研究により少なくともその礎を築くことができた。この成果を基に、今後、さらに精力的に解析を進めていきたい。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松本 知也 (MATSUMOTO TOMOYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究員

研究者番号：30552567

##### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

##### (4) 研究協力者

山脇 成人 (YAMAWAKI SHIGETO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40230601

森信 繁 (MORINOBU SHIGERU)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准  
教授

研究者番号：30191042

小島 正己 (KOJIMA MASAMI)  
産業技術総合研究所・セルエンジニアリン  
グ研究部門・グループ長

研究者番号：40344171

高橋 正身 (TAKAHASHI MASAMI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10318826