

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 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591259

研究課題名（和文） In vivo cross-link 法による治療抵抗性うつ病関連蛋白質の検索

研究課題名（英文） Comprehensive search of Treatment-resistant depression associated protein by time-controlled transcardiac perfusion cross-linking technique

研究代表者

大城 将也 (OHSHIRO MASAYA)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：40567880

研究成果の概要（和文）：

セロトニン・トランスポーター（SERT）機能の変化は治療抵抗性うつ病の病態に関与しているかもしれない。抗うつ薬である serotonin selective reuptake inhibitor（SSRI）は細胞膜表面にある SERT に作用するが、その機能は他のタンパク質との相互作用によって調節されている。本研究では治療抵抗性うつ病関連との関連を調べる目的で、Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking 法（tcTPC 法：通称 In vivo cross-link 法）および Pull down 法により SERT に結合して SSRI のセロトニン神経への作用を阻害する原因タンパク質を検索した。

Pull down 法で新しく見出された NSF（N-ethylmaleimidesensitive factor）は、HEC293 細胞でノックダウン実験を行った結果、細胞膜上の SERT の発現と機能に影響があると確認された。SERT を抗原とする高力価抗体による In vivo cross-link 法で得られた 85 種類の候補タンパク質から、ショットガン解析によりスコアおよび分子の機能などを参考に 14 分子が絞りこまれた。NSF および syntaxin 1A を加えて 16 分子のセロトニン神経での発現を確認するため、マウス脳縫線核由来の primary culture neuron の作製を行い、全分子の発現をこの神経細胞で確認した。治療抵抗性うつ病との関連を見るための評価は、研究費の交付期間内には行われなかった。

研究成果の概要（英文）：

Change in serotonin transporter (SERT) function may be implicated in treatment-resistant depression. Anti-depressant, serotonin selective reuptake inhibitor (SSRI) is acting on SERT present at the cell surface, which is regulated by various cellular mechanisms including interactions with other proteins. In this study, we have searched for novel SERT-binding proteins by time-controlled transcardiac perfusion cross-linking and a pull-down system, and investigated whether the expression of one such protein inhibited the effect of SSRI on serotonergic neuron.

N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) was identified by a pull-down system as a novel SERT-binding protein. Alterations of SERT function and membrane expression upon knockdown of the novel SERT-binding protein were studied in HEK293-hSERT cells. NSF co-localized with SERT at the plasma membrane, and NSF knockdown resulted in decreased SERT expression at the cell membranes and its uptake function. NSF endogenously co-localized with SERT and interacted with SERT. Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking technique has screened 85 candidate proteins. Then, 14 proteins have identified from the candidates by shot-gun analysis score. Endogenous interaction of SERT with 14 proteins, NSF and Syntaxin 1A were evaluated in mouse primary cultured raphe neurons. The association between proteins and treatment-resistant depression have not evaluated within this term of grant-in-aid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：(1) うつ病 (2) セロトニン・トランスポーター (3) 治療抵抗性 (4) 中枢神経系 (5) In vivo cross-link 法

1. 研究開始当初の背景

SSRI のうつ病治療への有効性は広く確立され、同疾患の治療の第一選択薬となっている。しかし、近年、Fava らは 4000 名のうつ病患者を対象にした調査を行ない、SSRI の治療で寛解に至る割合は約 30%にすぎない (Trivedi et al 2006) ことを明らかにした。臨床の現場では薬物治療に反応しないうつ病が依然として多く存在し、これを治療抵抗性うつ病 (Treatment-resistant depression) という (Thase & Rush 1995)。治療抵抗性うつ病の治療戦略に関しては電気けいれん療法、増強療法等があるが、そのメカニズムの解明には至っていない。前帯状回の機能不全や視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系 (HPA 系) の機能亢進、脳由来神経栄養因子の減少が関与すると指摘されているが、現時点でまとまった見解は得られていない (Souery et al 2006, Fava 2003, Rush et al 2003)。

近年の脳 PET 画像研究は、うつ病発症時に視床の SERT 密度増大が起きることを明らかにした (Ichimiya et al 2002, Meyer et al 2004, Cannon et al 2006) (図 1)。また、治療目的で投与した SSRI によって PET 画像上の SERT 占拠率は低下する (Meyer et al 2001) (図 2)。さらに遺伝子研究によって、その遺伝子多型とうつ病の発症脆弱性に関連 (Hariri et al 2005, Heinz et al 2005, Pezawas et al 2005) が報告されるなど、うつ病の発症機構において SERT は重要な役割を占めている。しかし SERT の密度変化と抗うつ薬の治療反応性の関連については見解がない。

SSRI の SERT への作用を阻害するタンパク質が存在すれば、治療抵抗性うつ病を治療する際の補助標的になる可能性がある。我々は「SERT の密度調節が抗うつ薬の作用点である」との仮説のもと「治療抵抗性うつ病発症時における SSRI の SERT への作用阻害をもたらすものは何か」という命題に論点を移す。そして Time-controlled transcardiac

perfusion cross-linking 法 (tcTPC 法：通称 In vivo cross-link 法) という新しい方法で、生体脳内で SERT に直接結合して、SSRI の作用に影響を及ぼすタンパク質の網羅的検索を行う。さらに検索された分子を通して治療抵抗性うつ病の病態機序を探る。

2. 研究の目的

うつ病の治療薬として SSRI (serotonin selective reuptake inhibitor) の有効性は広く確立されている。一方、薬物療法に抵抗性を示す難治性のうつ病患者も多い。治療抵抗性の解釈には諸説があるが、現在一定した見解はない。我々は解釈の新しい観点として、SERT に結合して、競合的に SSRI の作用を阻害するタンパク質の存在を想定した。本研究計画は、治療抵抗性うつ病患者と治療反応性患者の血液を用い、Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking 法 (tcTPC 法：通称 In vivo cross-link 法) により SSRI の脳内 SERT への作用を阻害する原因タンパク質分子を検索し、治療抵抗性うつ病の病態解明を目指すものである。

3. 研究の方法

初年度は、まずマウスを用いて In vivo cross-link 法による SERT 結合タンパク質の検索を行い、これらのヒトホモログについて治療抵抗性うつ病患者の血液サンプル中での動態を測定して疾患関連タンパク質候補を選ぶ。ついで、次年度にこの候補タンパク質について形態学的評価・機能評価を行い、当該タンパク質と抗うつ薬治療抵抗性との生物学的関連を精査する。

平成 22 年度

① In vivo cross-link 法による候補分子検索 (担当：岩田圭子、連携：片山)

マウスを厳密な時間管理下、経心臓的にクロスリンカーで灌流固定し、すみやかに脳を摘出後、その組織をすりつぶしてホモジネートを作る。この脳ホモジネートを用いて SERT

特異的抗体による免疫沈降を行い、得られた複合体を高親和性アフィゲルで精製する（この段階で得られた複合体に Syntaxin 1A や 14-3-3 が含まれるかウエスタンブロット法で調べ、免疫沈降の成功の可否を確認する）。この複合体を二次元電気泳動法で分子レベルに展開して、特異的に SERT に結合する分子群を検索する。これらの分子の配列を質量分析装置により確定したのち、この配列についてホモロジーサーチを行い、ヒトでの同分子の遺伝子配列、アミノ酸配列、遺伝子座、モチーフ検索等の基本的情報を得る。

② 候補分子の治療抵抗性関連の評価（担当：大城・岩田泰秀、連携：松崎）

上記検索の結果から細胞外に分泌されるタンパク質を選び、特異的抗体を作製したうえで ELISA 法によるうつ病患者血清中の定量検査を行なう。特に治療抵抗性うつ病患者と治療反応性うつ病患者の血清を用いた両血清での濃度の比較を目的とし、治療抵抗性うつ病患者血清に有意な増加が検出されるタンパク質に注目する。

今回、治療抵抗性の定義は Thase と Rush の基準に沿って行ない、複数の SSRI に反応しないレベル（Stage 2）とする。なお、この中の“十分な抗うつ薬治療の定義”として、「imipramine 換算で 150mg/日以上を 4 週間以上」という基準を採用する。成人・治療抵抗性うつ病患者（20 例）と SSRI によく反応したうつ病患者群（20 例）が既に申請者らのこれまでの研究で選定され、末梢血から分離された血清が浜松医科大学精神神経医学講座の研究室に -80°C で冷凍保存されている。本研究グループは患者サンプルを用いた解析に習熟しており、この評価法は既に確立されている。

平成 23 年度以降

③ 中枢神経系における治療抵抗性関連分子の生理的機能の解析

昨年度に同定した治療抵抗性関連分子（以下、分子 X とする）の生理的機能を以下の方法で解析する。

a) 分子 X の脳内の分布（担当：鈴木）

in situ hybridization 法および免疫組織化学により、分子 X のマウス脳内組織発現パターン（分子 X の細胞内発現レベル、細胞内器官局在のプロフィールを含む）を検証する。とくに視床・縫線核における mRNA・タンパク質発現を評価する。

（in situ hybridization 法）生後 12 週のマウスを断頭し、速やかに摘出した脳を氷上で厚さ 3~4 mm の冠状断片に分割する。粉碎したドライアイスで凍結後、クリオスタットで 20 μm 厚の切片を作製し、シランコーティングされたスライドガラスに貼付する。分子 X の cDNA 配列を基に合成したプローブを用いて、中枢神経系の mRNA 発現を評価する。

（免疫組織化学染色法）生後 12 週のマウス脳を灌流固定したのち冠状断連続切片を作製する。ELISA 法に用いた分子 X の特異的抗体で染色し蛍光顕微鏡下でのタンパク質発現を評価する。

b) In vitro での分子 X の投与による機能評価（担当：須田）

i) 分子 X の分子間相互作用の解析：1C11 細胞から完全に分化したセロトニン産生神経細胞を作製し、分子 X を投与して SERT との結合を免疫沈降法で確認する。

ii) 分子 X の投与が与える SERT への影響：SSRI は SERT の細胞内移動 (internalization) を誘導する (Lau et al 2008)。セロトニン産生神経細胞に合成した分子 X を投与し、SSRI 投与前後で生じる SERT の細胞内移動 (internalization) の変化を免疫組織化学染色法で観察する。

c) In vivo での分子 X の投与による機能評価（担当：鈴木、中村）

分子 X について、動物（マウス）でのタンパク質脳内投与実験を行い、同マウスで PET 評価を行って、SERT の競合阻害を再現できるかどうか検討する。トレーサーには 3-amino-4-(2-[^{11}C]methylaminomethylphenylsulfanyl) benzonitrile (C-11 DASB) を用いる。分子 X が、SSRI 投与前後で SERT の PET 画像をどれほど変化させることができるかについて検証する。

4. 研究成果

本研究は Time-controlled transcatheter perfusion cross-linking 法 (tcTPC 法：通称 In vivo cross-link 法) により SSRI の脳内 SERT への作用を阻害する原因タンパク質分子を検索し、治療抵抗性うつ病の病態解明を目指すものである。

初年度より In vivo cross-link 法による候補分子検索を開始し、灌流固定後のマウス脳ホモジネートから SERT 特異的抗体による免疫沈降を行って、得られた複合体を質量分析装置により分析した。当初この段階で得られた複合体に SERT に結合する既知の分子が含まれず、用いた SERT 抗体の力価に問題があると考えられた。そこで SERT に対応する力価の高いモノクローナル抗体を作製しなおす作業に入り、初年度終盤に至って、候補となる抗体（エピトープは N 末端）が得られた。この抗体を使って予備実験を行ったところ、検索の結果から細胞内小胞輸送タンパク質 N-ethylmaleimidesensitive factor (NSF) を含む数種類の候補分子が見出された。

次年度はまず初年度に得られた SERT に対応する力価の高いモノクローナル抗体を大量生産した。これを用いて、灌流固定後のマウス脳ホモジネートから SERT 特異的な抗体による免疫沈降を行い、得られた複合体を質

量分析装置により分析したところ、サンプル中に SERT を含め 85 種類のタンパク質が同定された。しかし、予備実験結果の段階で見出された NSF および syntaxin 1A はこの中に入っていないかった。このモノクローナル抗体のエピトープは N 末端であるため、N 末端に結合する NSF および syntaxin 1A は、この方法では得られない可能性が考えられた。次に HEK293 細胞により SERT と NSF を共発現させた培養細胞系を作製して、NSF を阻害する RNAi を投与したところ、細胞内へのセロトニンの再取り込みが減少し、SERT の機能を抑制することが示唆された。また、このとき細胞内の SERTmRNA が代償性に増加していることも確認された。

最終年度は NSF を含む複合体の精製をさらに行い、SERT の機能との関連についても精査した。次年度に In vivo cross-link 法で得られた 85 種類のタンパク質から、ショットガン解析によりスコアおよび分子の機能などを参考に 14 分子が絞りこまれた。Pull down 法で見出された NSF および syntaxin 1A を加えて 16 分子のセロトニン神経での発現を確認するため、マウス脳縫線核由来の primary culture neuron の作製を行い、16 分子全ての発現をこの神経細胞で確認した。さらに、これら SERT binding proteins について primer を作成し、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR の予備実験を行ったところ、上記のうち 14 分子についてヒトリンパ球での発現が確認された。治療抵抗性うつ病との関連を見るための評価は、研究費の交付期間内には行われなかった。

平成 24 年度内に論文投稿には至らず、この研究課題での助成は終了するが、今後はこの primer を用いて治療抵抗性うつ病等疾患サンプルでのリンパ球発現を TaqMan assay を用いたリアルタイム PCR で評価し、治療抵抗性うつ病の病態解明につなげる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

浜松医科大学・精神医学講座

<http://hmup.jp/org/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大城 将也 (OHSHIRO MASAYA)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号 : 40567880

(2)研究分担者

鈴木 勝昭 (SUZUKI KATSUAKI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 00285040

岩田圭子 (IWATA KEIKO)

福井大学・子どものこころの発達研究セン

ター・助教

研究者番号 : 30415088

立花太郎 (TACHIBANA TARO)

大阪市立大学・工学研究科・准教授

研究者番号 : 80311752