

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31日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790166

研究課題名（和文）体内時計システムを応用した薬物誘発性うつ病を予測する評価系の構築

研究課題名（英文）Evaluation of a predict system of drug-induced depression by applying the circadian clock system

研究代表者

牛島 健太郎（USHIJIMA KENTAROU）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70448843

研究成果の概要（和文）：うつ病の発症に体内時計障害が関与することが指摘されている。本研究において、臨床うつ病の発症が問題となるインターフェロンは、培養細胞において時計遺伝子の転写活性リズムを障害することが明らかとなった。また、体内時計システムは、うつ病と関わりの深いセロトニントランスポーターや薬物の体内動態を調節するP糖タンパク質の発現リズムを制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It has been suggested that circadian clock dysfunction is involved in the onset of depression. This study revealed that interferon which frequently induces depression in clinical situation disturbed a rhythmicity of transcript activity of clock genes in cultured cells. In addition, it was revealed that circadian clock system regulates the expression rhythms of serotonin transporter which is related to depression, and of P-glycoprotein which controls pharmacokinetics of drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：体内時計、薬物有害反応、転写活性、うつ病、生体リズム

1. 研究開始当初の背景

（1）薬物による有害反応を予測することは、医薬品開発において重要な課題である。薬物誘発性うつ病は近年問題となっており、平成20年6月に厚生労働省から重篤副作用疾患別対応マニュアルが発表された。しかし、適切なバイオマーカーが無いために、基礎研究の段階で薬物誘発性うつ病の発症を予測することは困難である。これらの有害反応は中枢神経作用薬のみに認められるものではな

く、臨床において特に問題となっているのは肝炎治療薬のインターフェロン(IFN)や副腎皮質ホルモン薬である。さらに、一部のHMG-CoA還元酵素阻害薬、禁煙補助薬のバレニクリンやHIV感染症治療薬のエファビレンツと気分障害の発症の関与を示唆するメタ解析や疫学研究が相次いで報告されており、うつ病を惹起する薬物の種類は多岐にわたっている。したがって、薬物誘発性うつ病を予測し対処法を講じることは重要な課

題である。

(2) うつ病患者では、体温やホルモン分泌などの日内リズムが破綻していることは古くから指摘されており、近年、時計遺伝子の遺伝子多型がうつ病の発症リスクになることも多数報告されている。したがって、抑うつなどの気分障害の発症には、体内時計の破綻が強く関与していると考えられる。しかしながら、うつ病の発症と体内時計異常がどのようなメカニズムにより関連付けられるのかはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

(1) ①生体の各臓器には細胞レベルで「体内時計」が存在しており、体内時計の自律的な活動により様々な生体機能に約 24 時間周期の日内リズムが認められる。1997 年に哺乳動物において生体リズム制御遺伝子 (Clock) が発見された後、体内時計の制御システムに関する研究が急速に進み、体内時計は 3 つの転写制御配列 (E-box、D-box および RRE) と約 20 種類の転写因子 (時計遺伝子) による転写調節ネットワークであることが解明された。この体内時計の異常は様々な疾患を引き起こすことが指摘されており、ガンや生活習慣病だけでなくうつ病などの精神疾患についても着目されている。前述の IFN やステロイドをマウスに投与すると時計遺伝子の発現リズムが破綻することが報告されている。そこで本研究では、体内時計システムに及ぼす薬物の影響を評価することにより薬物誘発性うつ病の発症を予測できるのではないかと考え、評価系の構築を目的として研究を行った。また、他の薬物による中枢性有害反応として β 遮断薬による悪夢が知られており、近年ではインフルエンザ治療薬を服用した小児における異常行動が注目された。本研究では、時計中枢である視交叉上核 (SCN) 内の時計遺伝子発現に及ぼすこれら薬物の影響についても検討した。

② P 糖タンパク質 (P-gp) などの薬物トランスポーターは、薬物の体内動態を規定する重要な因子である。P-gp は血液能関門にも発現しており、薬物の脳内移行を制御している。本研究では、ラット P-gp の発現リズムが体内時計に制御されているか否か明らかにすることを目的として研究を行った。

(2) セロトニントランスポーター (5-HTT) は細胞外セロトニン濃度を調節する分子の 1 つであり、うつ病発症のモノアミン欠乏仮説における重要な因子である。5-HTT は、シナプス間隙からセロトニンを再取り込みする輸送担体であり、三環系抗うつ薬や選択的セ

ロトニン再取り込み阻害薬の標的因子である。過去の研究において、マウス中脳における 5-HTT の発現量および活性は、暗期の方が明期よりも大であり、この日内変動に対応してフルボキサミンの無動時間短縮効果が投与時刻により変化することを明らかにしている。本研究では、マウス中脳内 5-HTT 発現リズムの制御機構を体内時計の観点から明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ① IFN を投与されたマウスが抑うつ症状を示すか否か明らかにするため、強制水泳法を行いマウスの無動時間を測定した。IFN (100 万 U/kg) を 7 日間連日皮下投与し、8 日目に 5 分間の強制水泳を行った。薬物による体内時計障害を培養細胞において検出する系の構築では、体内時計システムのアキレス腱と言われている E-box 制御下の時計遺伝子 mPer2 に着目し、この転写活性を指標とした。時計遺伝子 mPer2 の転写開始点付近から約 3kb 上流までの領域を組み込んだ pGL4 ルシフェラーゼベクターを作成した (mPer2:LUC)。培養細胞はラットグリオーマ (C6) 細胞を使用した。mPer2-LUC を C6 細胞にトランスフェクトし、既報に従いデキサメタゾン (Dex) を 2 時間曝露した。Dex 刺激後より培養液にルシフェリンを添加し、10 分おきに化学発光量を測定した。

② β 遮断薬を用いた検討では、脂溶性薬物であるプロプラノロールの脳移行性は水溶性薬物であるアテノロールよりも 40 倍であるため、SCN 内時計遺伝子に及ぼす影響が薬物の性質により異なる可能性がある。本研究では Wistar ラットにプロプラノロールおよびアテノロールを 4 週間投与し、SCN 内の時計遺伝子発現リズムを Real-time PCR 法により測定した。

③ インフルエンザ治療薬を用いた検討では、オセルタミビル混餌食をマウスに 5 日間投与し、前述と同様の手法を用いて SCN 内の時計遺伝子発現リズムを測定した。また、培養細胞にオセルタミビルを曝露し、一定時間経過後の時計遺伝子発現量を測定した。

④ P-gp は血液脳関門だけでなく、小腸上皮細胞にも高発現している。P-gp の発現リズム形成に及ぼす体内時計の関与を検討するため、摘出腸管を用いて、P-gp の輸送活性および abcb1a や時計遺伝子の mRNA 発現量に日内リズムが認められるか否か検討した。また、体内時計の位相を操作する 1 つの手法として、特定の時間帯のみに餌を与える時間制限給餌がある。明期 (ラットの休息期にあたる)

の中期に6時間だけ給餌させる時間制限給餌を2週間施行し、P-gpの活性およびabcb1aや時計遺伝子の発現量のリズム位相がどのように変化するか検討した。さらに、副腎皮質ホルモンは末梢時計の位相に大きな影響を及ぼす因子であるため、abcb1aや時計遺伝子の発現量におよぼす副腎摘出の影響を検討した。

(2) 実験にはICR雄性(WT)マウスおよびCLOCK変異(Clk/Clk)マウスを用いた。マウス中脳内5-HTT、時計遺伝子(Per2, Cry1, Clock, Bmal1)およびTef)およびclock controlled geneであるactivating transcription factor(ATF)-4のmRNA発現リズムを測定した。また、マウス5-HTT遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポーター-アッセイにより5-HTT転写活性に重要な因子を同定した。さらに、クロマチン免疫沈降法により、5-HTTのプロモーター領域における転写因子の結合量が時刻により異なるか否か検討した。

4. 研究成果

(1) ①強制水泳法における無動時間は、IFN群において溶媒群よりも有意に増加した。培養細胞を用いた化学発光モニタリングの検討では、mPer2:LUCの転写活性はリズムカルに変化し、既報と同様に約24時間の周期性が認められた。この測定条件下でIFNを併用すると、mPer2:LUCによる発光リズムの振幅が低下した(図1)。また、このIFNの作用は濃度依存的であることも確認した。以上のように、in vivoにおいて報告されているIFNによる生体リズム障害を、培養細胞を用いた自動測定系において検出することができた。

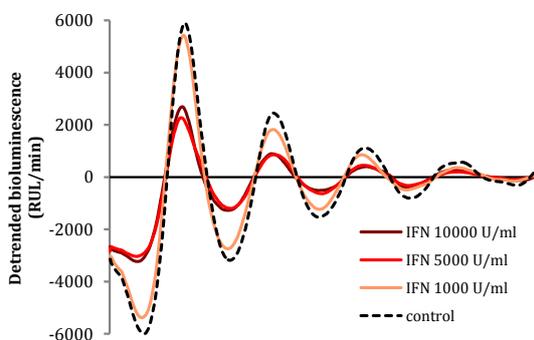


図1. IFNによるPer2:LUCのリズム障害

②ラットに脂溶性薬物のプロプラノロールおよび水溶性薬物のアテノロールを投与しても、SCN内の時計遺伝子(Per1, Per2, Rev-erba, および Bmal1)のmRNA発現量は変化しなかった。β遮断薬は高血圧や狭心症の治療薬として使用されており、心筋における酸素消費量を抑制することで治療効果を発現する。本研究において、心筋におけるBmal1 mRNAの発現量はいずれのβ遮断薬を用いても有意に低下していた。心筋内のエネルギー調節は体内時計により調節されていることが報告されており、事実、β遮断薬を投与したラットの心筋内ATP含量は増加していた。

③オセルタミビルを用いた検討では、若齢マウスではオセルタミビルによりSCNにおける時計遺伝子(Per1)の発現量が増加した。しかし一方、成熟マウスではそのような変化は認めなかった。培養細胞を用いた検討では、オセルタミビルはC6細胞においてPer1遺伝子の転写活性を増加させたが、マウス線維芽細胞(NIH3T3)においては変化させなかった。マウスの週齢や細胞の種類によりオセルタミビルの効果が異なる要因、さらにオセルタミビルによりPer1の転写活性が増加する機序について詳細な検討が必要である。

④ラット摘出腸管を用いてP-gp活性が日内リズムを示すか否か検討したところ、mRNA発現の日内リズムに対応したタンパク質活性の日内リズムが認められた。時間制限給餌を明期にのみ2週間施行したところ、abcb1a mRNA発現量およびP-gp活性は明期がピークとなる日内リズムを示し、リズムの位相が前進した。副腎摘出を施行してもabcb1a mRNA発現量は変化しなかったことから、abcb1a発現の日内リズム形成に副腎皮質ホルモンの寄与は小であると考えられた。続いて、時間制限給餌による時計遺伝子の発現量の変化を検討したところ、D-boxに作用して遺伝子の転写を促進するDbp遺伝子の発現リズムの位相が、abcb1a遺伝子の発現リズムの位相と一致していた。以上より、ラット小腸におけるP-gp活性は日内リズムを示し、そのリズムはPPAREを介した体内時計システムによる転写調節により制御されていることが示唆された。

(2) WTマウスの中脳において、5-HTT、Bmal1、Per2およびATF-4の発現は有意な日周リズムを示した。しかしながらClk/Clkマウスでは、5-HTTの発現リズムは消失していた。Reporter-assayにおいて、ATF-4は5-HTT-LUCの転写活性を上昇させたが、CLOCK/BMAL1は変化させなかった。WT

マウスの中脳において、5-HTT プロモーター領域への ATF-4 の結合量は時刻により異なり、その変化は 5-HTT の発現リズムに対応していた。しかしながら、Clk/Clk マウスでは時刻依存的な ATF-4 の結合は認められなかった。以上より、マウス中脳における 5-HTT の発現リズムは体内時計システムにより調節されているが、時計遺伝子ではなく ATF-4 により制御されていることが明らかとなった (図 2)。

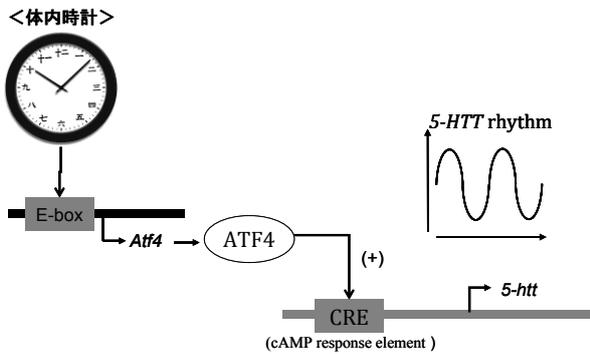


図 2. ATF4 を介した体内時計による 5-HTT 発現リズムの制御機構

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. Ushijima K, Koyanagi S, Sato Y, Ogata T, Matsunaga N, Fujimura A, Ohdo S: Role of activating transcription factor-4 in 24-hour rhythm of serotonin transporter expression in the mouse midbrain. *Mol Pharmacol*, in press, 査読有
DOI: 10.1124/mol.112.079079
2. Hayashi Y*, Ushijima K*, Ando H, Yanagihara H, Ishikawa E, Tsuruoka S, Sugimoto K, Fujimura A.: Influence of time-restricted feeding schedule on daily rhythm of abcb1a gene expression and its function in rat intestine. *J Pharmacol Exp Ther*, 335(2): 418-23, 2010 (*These authors contributed equally), 査読有
DOI: 10.1124/jpet.110.170837

[学会発表] (計 3 件)

1. 牛島健太郎: Activating transcription factor-4 によるマウスセロトニントランスポーター発現リズムの制御. 薬学会第 132 年会. 2012 年 3 月 29 日、北海道大学 (札幌)

2. 牛島 健太郎: 生体リズムと薬物の中枢神経系副作用. 第 18 回日本時間生物学会学術大会. 平成 23 年年 11 月 25 日、名古屋大学 (名古屋)
3. 牛島 健太郎: 体内時計システムを利用した薬物誘発性精神疾患予測法の構築. 第 31 回日本臨床薬理学会年会. 平成 22 年 12 月 3 日、京都国際会議場 (京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

(自治医科大学研究シーズ集)

http://rseeds.jichi.ac.jp/research_seeds/public/ResearchResultDetail.php?publicId=625d9erb5t2iyqexhohj071suronlm&resultCd=3§ionCd=

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛島 健太郎 (Ushijima Kentarou)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70448843

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: