

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：	15501
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23791336
研究課題名（和文）	ヒストン脱アセチル化酵素を標的とした新規抗うつ薬創薬研究
研究課題名（英文）	A study of new drug development of target of histone deacetylase.
研究代表者	
	大舘 孝治 (OTUKI KOUJI)
	山口大学・大学院医学系研究科・助教
	研究者番号： 10535256

研究成果の概要（和文）：研究経過からは HDAC4 の関与が判明した。HDAC4 過剰発現は抗うつ薬による GDNF 増加を抗うつ薬単独よりも有意に抑制した。また、C6 細胞、N2a 細胞とともに抗うつ薬添加によりリン酸化されることで HDAC4 が核外移行しことを確認した。動物実験では mutant HDAC4 を用いると抗うつ効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Interestingly, HDAC4 significantly inhibited the induction of GDNF mRNA by antidepressants. Therefore the level of phosphorylation of HDAC4 was increased by antidepressants. In the animal study, mutant HDAC4 was suggested that antidepressant effect.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：GDNF、HDAC4

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) エピジェネティクス、神経栄養因子群と抗うつ薬作用機構

現在、抗うつ薬の作用機序に関与するものとして最も注目され、研究が進められているものの一つにBDNFがある。しかし、BDNFの発現量は抗うつ薬に限らず、気分安定薬のバルプロ酸やリチウム投与でも増加することから、BDNFの発現変化と抗うつ効果発現との特異的関連性は疑問視されている。

一方、グリア細胞由来神経栄養因子であるGDNFについて、我々の報告も含めてうつ病患者の末梢血および死後脳での発現変化の報告が増えてきており、うつ病の病態におけるグリアの機能異常の関

与が注目されつつある。培養細胞において抗うつ薬がGDNFの発現量を増加させることも報告されている。しかし、抗うつ薬のエピジェネティクスに関連する作用については、唯一、抗うつ薬の抗うつ効果にヒストン脱アセチル化酵素HDAC5が関与するという報告はあるが、詳細な分子機構や標的分子は不明なままである(Tsankova et al., *Nat Neurosci* 9(4), 519-25, 2006)。

#### (2) これまでの我々の研究成果、着想に至った経緯

①気分障害患者においてGDNF mRNA 発現量の有意な低下を報告した(Otsuki et al., *J Psychiatr Res* 42, 1145-1153, 2008)。

②我々は BALB/c マウスが慢性ストレス負荷によりうつ様行動を呈し、そのうつ様行動がうつ薬の平行投与により抑制されることから、うつ病モデルマウスとしての妥当性を確認した。さらに、BALB/c マウスにおいて慢性ストレス負荷により GDNF の発現が線条体において低下し、抗うつ薬の平行投与によりその発現低下が抑制されることを見出した。また、側坐核に GDNF を過剰発現させることで、慢性ストレス負荷によるうつ様行動が抑制されることを見出し、側坐核の GDNF のうつ病態への関与を確認した (Uchida et al., *Neuron*, 2011)。

③申請者は若手研究 (B) (平成 21 ~ 22 年度) を受け、培養細胞を用いた以下の結果から抗うつ薬による GDNF 発現制御機構に HDAC4 が関与することを確認した。

- ・ HDAC4 の過剰発現により、抗うつ薬による GDNF 発現増加作用が抑制されることを確認した。
- ・抗うつ薬添加により、GDNF プロモーターへの HDAC4 の結合が減少することを確認した。
- ・抗うつ薬添加により、HDAC4 が核外移行することを確認した。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究結果をさらに発展させる目的で、

(1) 培養細胞を用いた実験系で、HDAC4 を介した抗うつ薬の GDNF 発現制御機構の全貌を明らかにする。

(2) うつ病モデル動物、BALB/c マウスを用い、脳内側坐核における HDAC4 を阻害し、うつ様行動への抗うつ薬の効果発現に対する影響を解析することで、抗うつ作用機構への HDAC4 の関与を確認することを目的に行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞における抗うつ薬添加時の HDAC4 細胞内局在における HDAC4 量的解析

ラット C6 細胞における抗うつ薬添加時の HDAC4 細胞内局在は視覚的評価に留まっているが、核と細胞質を分けるキットを用い、Western blot 法で定量化を行うことで、量的変化の証明を行う。さらに、全細胞 (核 + 細胞質) における HDAC4 レベルの検討も行い、HDAC4 全体量には変化のないことも確認する。

用いる予定の抗うつ薬: imipramine(三環系)、fluoxetine(SSRI)

### (2) 培養細胞における抗うつ薬添加時の HDAC4 核外移行における CaMK II $\delta$ による HDAC4 リン酸化の役割の解析

ラット C6 細胞における抗うつ薬添加時の HDAC4 細胞内局在変化に HDAC4 のリン酸化が関与しているか検討する。具体的には Western blot 法で HDAC4 の経時的なリン酸化レベルの量的変化を解析する。さらに、活性化型 CaMK II  $\delta$  である CaMK II  $\delta$ -T287D を過剰発現させた際の HDAC4 の核外移行、HDAC4 のリン酸化レベルも検討する。

用いる予定の抗うつ薬: imipramine(三環系)、fluoxetine(SSRI)

### (3) ストレス脆弱性マウス側坐核に mtHDAC4 を過剰発現させた際の抗うつ薬発現効果の解析

HDAC4 がリン酸化されると考えられる配列に mutation を加えた mtHDAC4 をマウス側坐核に過剰発現させ、させなかった群との間で抗うつ薬の効果発現に差があるかを、うつ様行動を評価する行動解析を指標として検討する。また線条体における GDNF 発現量をリアルタイム PCR 法により定量解析する。

予定している行動解析: Forced swimming test, Novelty suppressed feeding test, Sucrose preference test, Social interaction test

### (4) ストレス脆弱性マウス側坐核において siHDAC4 を用いて HDAC4 発現を低下させた際の慢性ストレスにより誘発されるうつ様行動の解析

sicontrol, siHDAC4 をマウス側坐核に投与し、siHDAC4 群でうつ様行動を呈さないかを、うつ様行動を評価する行動解析を指標として検討する。また線条体における GDNF 発現量をリアルタイム PCR 法により定量解析する。

予定している行動解析: Forced swimming test, Novelty suppressed feeding test, Sucrose preference test, Social interaction test

### (5) Mutant HDAC4 を投与した際のマウスの行動変化を行動解析にて解析する。

マウス側坐核に mutant HDAC4 を投与し、投与群でうつ様行動を呈さないかを、うつ様行動を評価する行動解析を指標として検討する。また線条体における GDNF 発現量をリアルタイム PCR 法により定量解析する。

予定している行動解析：Forced swimming test, Novelty suppressed feeding test, Sucrose preference test, Social interaction test

#### 4. 研究成果

本研究では、早期効果発現を示す抗うつ薬開発、気分障害の病態解明を目標とし、うつモデルマウスにおいて、グリア由来神経栄養因子である glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 発現量低下を認めたこと、グリア系培養細胞 (C6 細胞) における抗うつ薬投与による GDNF mRNA 発現量亢進に着目して研究を進めてきた。研究経過からはニューロン系培養細胞である N2a 細胞でも同様に抗うつ薬の添加により、GDNF mRNA 発現量の亢進を認めた。更に、研究経過中にヒストン脱アセチル化酵素である histone deacetylase 4 (HDAC4) の関与も判明してきた。HDAC4 過剰発現は抗うつ薬による GDNF mRNA 増加を抗うつ薬のみよりも有意に抑制していた。また、C6 細胞、N2a 細胞とともに抗うつ薬添加により HDAC4 が核外移行することを immunofluorescence microscopy 法により確認、更に western blot 法でも kit を用いて細胞質と核を分離した後に検討を行ったが、核から細胞質への移行が蛋白レベルで確認できた。ChIP assay 法により、双方で GDNF promoter 領域で抗うつ薬添加時に HDAC4 のリクルート量が減少していることも確認した。また、それらの変化に伴って HDAC4 のリン酸化レベルが増加していることも発見した。動物実験においては mutant HDAC4 を用いると抗うつ効果を示す可能性が示唆された。以上のことから、抗うつ薬は HDAC4 を介したヒストン修飾を介して GDNF 発現量を増加させることで、抗うつ効果を示す可能性が示唆された。

#### 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 10 件)

- ①Shibata T, Yamagata H, Uchida S, Otsuki K, Hobara T, Higuchi F, Abe N, & Watanabe Y. The alteration of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes in mood disorder patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 43, 222-229. 査読有
- ②Higuchi F, Uchida S, Otsuki K, Hobara T, Abe N, Yamagata H, Shibata T, & Watanabe Y. State-dependent changes in the expression of DNA methyltransferases in mood disorder

patients. *J Psychiatr Res*, 2012, 45, 1295-1300. 査読有

③Abe N, Uchida S, Otsuki K, Hobara T, Yamagata H, Higuchi F, Shibata T, & Watanabe Y. Altered sirtuin deacetylase gene expression in patients with a mood disorder. *J Psychiatr Res*, 2012, 45, 1106-1112. 査読有

④渡邊義文、内田周作、大舘孝治、山形弘隆、芳原輝之、阿部尚子、樋口文宏、綿貫俊夫、松原敏郎、気分障害のバイオマーカー開発、とくに白血球での遺伝子発現からみた気分障害の状態診断、亜型分類、精神神経学雑誌, 2012, 114, 812-820. 査読無

⑤大舘孝治、内田周作、芳原輝之、山形弘隆、渡邊義文. うつ病におけるエピジェネティクス, 日本神経薬理学雑誌, 2012, 32, 181-186, 査読無

⑥芳原輝之、内田周作、山形弘隆、大舘孝治、渡邊義文. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の早期抗うつ効果発現における分子機構の解析, 日本生物学的精神医学会誌, 2012, 23, 35-40. 査読無

⑦山形弘隆、内田周作、芳原輝之、大舘孝治、渡邊義文. うつ病とエピジェネティクス, 精神科, 2012, 20, 632-38. 査読無

⑧大舘孝治、内田周作、芳原輝之、渡邊義文. うつ病とエピジェネティクス, 日本生物学的精神医学会誌, 2011, 22, 89-95. 査読無

⑨Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Fujimoto M, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Abe N, Higuchi F, Shibata T, Hasegawa S, Kida S, Nakai A, & Watanabe Y. Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2011, 108, 1681-1686. 査読有

⑩Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Suzuki T, Miyata N, & Watanabe Y. Epigenetic status of *Gdnf* in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. *Neuron*, 2011, 69, 359-372. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①Koji Otsuki, Shusaku Uchida, Hirota Yamagata and Yoshifumi Watanabe. The mechanism of GDNF transcriptional regulation by antidepressants through HDAC4 第34回日本神経科学会, 2012.9. 30, 神戸国際会議場(神戸)

②Koji Otsuki, Shusaku Uchida, Teruyuki Hobara, Hirota Yamagata and Yoshifumi Watanabe. Epigenetic regulation in depression. 第41回日本

神経精神薬理学会, 2011.10. 28, 京王プラザホテル(東京)

③ Koji Otsuki, Shusaku Uchida, Teruyuki Hobara, Hirotaka Yamagata and Yoshifumi Watanabe.

Epigenetic mechanisms of GDNF expression involved in the stress vulnerability and depression.

第32回内籐財団コンファレンス, 2011.10.19,

八ヶ岳ロイヤルホテル (山梨)

〔図書〕 (計 1 件)

① 大舘孝治、内田周作、渡辺義文. 新興医学出版社. 末梢白血球に発現している遺伝子と気分障害, 精神疾患診断のための脳形態・機能検査法. 2011, 202-209.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大舘 孝治 (OTUKI KOUJI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 10535256