

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591735

研究課題名(和文)何故うつ状態になると依存症になりやすいのか？その分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Functional role of the N-terminal domain of DFosB in response to stress and drugs of abuse.

研究代表者

大西 克典(OHNISHI, Yoshinori)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10626865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：DFosBは、脳内において繰り返し刺激により徐々に蓄積する珍しい転写因子(遺伝子発現を誘導する分子)です。蓄積するということは何らかの記憶に関係していると期待できます。コカインなど依存性薬物で増加し、ストレスでは増加する場合と減少する場合がありますが、増加することで抗うつの働くことが分かっています。しかし、DFosBはmRNAから、DFosBとN末を欠損したD2DFosBの二つを発現し、また、過剰発現の実験ではほぼ同程度発現するためどちらの機能が重要か分かりませんでした。本研究ではその二つを分けて発現させ、DFosBがストレス後の依存症を悪化させる因子であることを同定しました。

研究成果の概要(英文)：DFosB is transcriptional factor, which is accumulated in specific brain regions by chronic or repeated stimulation of stress or addictive drugs. We have reported DFosB makes a role for anti-depressant. However, overexpressed DFosB mRNA codes DFosB and N-terminal lacking D2DFosB, and expresses at similar level. We tried to reveal which one has more important role for depression and cocaine addiction by respective expression using AAV in nucleus accumbens. In results, DFosB enhanced cocaine addiction after social defeat stress, and works as anti-depressant, but, D2DFosB inhibit such type of cocaine addiction and does not work as anti-depressant.

研究分野：分子神経科学

キーワード：うつ病 コカイン依存症 FosB 転写因子 行動実験 側坐核 AP-1

1. 研究開始当初の背景

(1) ストレスを感じているとき、チョコレート、たばこ、大食いなど快楽情動の欲動に抵抗しにくくことを我々は日常的に経験しています。この状態が病的になると、ストレスはうつ病に、依存性は薬物依存に発展します。

うつ病の発症を契機とした自殺も年々上昇しており、その数は交通事故死より多い状態です。また、日本は全世界の自殺率で第6位、先進国の中では最悪の状況であり、その解決は早急な課題といえます。特に依存症を併発したうつ病は難治性であり、時に図1の死に至る負のスパイラルにおちいり、より深刻な問題と言えます。

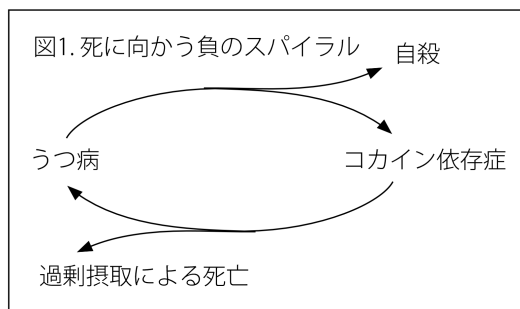
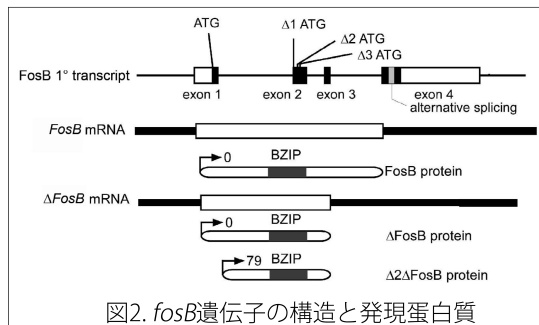


図1のようにストレスと薬物依存は、非常に密接した関係性を持っており (Saal, Neuron 2003, Covington, Neuron 2011)、互いに状態を悪化させる関係にあります。つまり、前者は自殺、後者は過剰摂取による死亡と死に向かう負のスパイラルの関係にあるわけです。しかしながら、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていません。

我々は AP-1 転写因子の一つである Δ FosB が、それらを制御する Key molecule であることを見出し、その分子メカニズムを明らかにしようとしています。 Δ FosB は *fosB* 遺伝子産物で、択一的スプライシングで exon4 を一部欠損した Δ FosB mRNA から Δ 2 Δ FosB とともに発現し、欠損がない全長タイプが FosB mRNA から FosB を発現します (図2)。



FosB は最も有名な転写因子である c-Fos の相同蛋白質で、c-Fos 同様一過性にしか発現しませんが、 Δ FosB は分解されるドメインを欠損しており、繰り返し刺激により蓄積することが知られています。つまり、なんらかの刺激を受け続けると、その証左として核内に

存在し続け、転写調節に影響することが予想されるわけです。これはある種の細胞内記憶に関係するのではないかと期待されているわけです。 Δ FosB が蓄積する刺激としては、ストレス、依存性薬物などが知られています。

(2) 病態と分子レベルの関係性を調べるために、うつ病モデルとしてマウスを使った社会的敗北モデル (Social defeat) の系を使い、自然な報酬効果として砂糖水の飲水量を、薬物依存モデルとしてコカインを利用し、実験を行っています。

(3) まず、我々はヒトのうつ病で側座核の Δ FosB は減少することを見出しました (Vialou, Nature Neuroscience 2010)。また、マウスモデルにおいても側座核の Δ FosB mRNA が減少することを見出しています (Ohnishi, 未発表データ)。そのほかのストレスでは蓄積することも見出しているのと、鬱になるようなストレスに抵抗性を獲得したマウスや抗うつ薬を投与したマウスでは Δ FosB が蓄積している (Vialou, Nature Neuroscience 2010) ので、 Δ FosB の側座核における存在量がストレス抵抗性と相関している可能性が高いです。

(4) また、我々は *fosB* ノックアウトマウスがうつ症状を示し、抗うつ薬が部分的にしか効かないことを明らかにしています (Ohnishi, Biological Psychiatry 2011) から、やはり、*fosB* 遺伝子産物は抗うつ効果において必須の役割を担っていると考えられます (図3)。

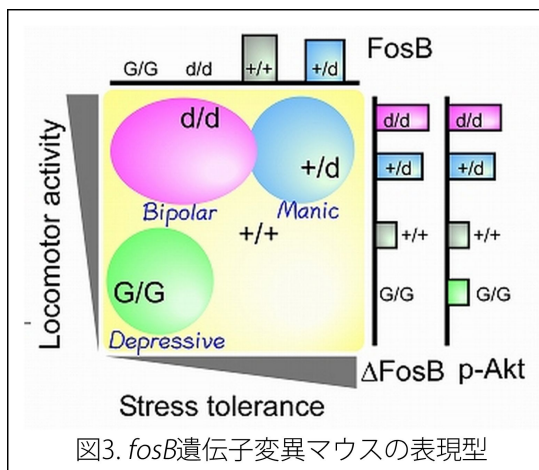


図3. *fosB* 遺伝子変異マウスの表現型

(5) 逆に Δ FosB を過剰に発現し、FosB がやや少ない *fosB*^{+/-} マウスと、 Δ FosB を過剰に発現し、FosB を発現しない *fosB*^{d/d} マウスを作製し、抗うつ能を調べたところ、*fosB*^{+/-} マウスは躁病的に、*fosB*^{d/d} マウスは躁うつ病的な表現型を示しました。ベースのロコモーションが高いのに、ストレス感受性が高いマウスは現在の所、この *fosB*^{d/d} マウスしか存在しないことから、*fosB* 遺伝子が気分障害に深く

関わっていることがわかります (図 3)。

2. 研究の目的

(1) Δ FosB mRNA からは Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB の二つの蛋白質が翻訳されるため、どちらがより重要かわかっていませんでした (図 2)。そこで、私はそれらの発現を二つに分けて効果を検討した。

(2) Δ FosB がうつ病や依存症で重要な働きをしていることが分かったので、同時に働く蛋白質を明らかにし、その機能を調べるために Yeast two hybrid 法により結合蛋白質を同定し、それぞれの個別の機能を同様の手法で明らかにすることを目的とした。

<引用文献>

FosB is essential for the enhancement of stress tolerance and antagonizes locomotor sensitization by Δ FosB. Ohnishi YN, Ohnishi YH, Hokama M, Nomaru H, Yamazaki K, Tominaga Y, Sakumi K, Nestler EJ, Nakabeppu Y. *Biol Psychiatry*. 2011 Sep 1;70(5):487-95

DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. Vialou V, Robison AJ, Laplant QC, Covington HE 3rd, Dietz DM, Ohnishi YN, Mouzon E, Rush AJ 3rd, Watts EL, Wallace DL, Iñiguez SD, Ohnishi YH, Steiner MA, Warren BL, Krishnan V, Bolaños CA, Neve RL, Ghose S, Berton O, Tamminga CA, Nestler EJ. *Nat Neurosci*. 2010 Jun;13(6):745-52

A role for repressive histone methylation in cocaine-induced vulnerability to stress. Covington HE 3rd, Maze I, Sun H, Bomze HM, DeMaio KD, Wu EY, Dietz DM, Lobo MK, Ghose S, Mouzon E, Neve RL, Tamminga CA, Nestler EJ. *Neuron*. 2011 Aug 25;71(4):656-70

Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC. *Neuron*. 2003 Feb 20;37(4):577-82

3. 研究の方法

(1) AAV (アデノ随伴ウイルス)

脳神経の特定の領域の遺伝子機能を調べるため、アデノ随伴ウイルス、もしくは単純ヘルペスウイルスをマウス脳内に注入し、特定領域の神経細胞に感染させて、ウイルスの中に仕込んだ遺伝子を発現させる方法を使います。ウイルスは、本来、感染後自己増殖して、自己複製したものが増えていくようになっていますが、実験で使うウイルスは、自己

増殖に必要な遺伝子を別のベクターに分けており、ウイルスを増やしたいときだけそれらの遺伝子が発現する仕組みを使っています。パッケージングされてウイルス粒子となったものは、その骨組みとなる遺伝子を含まず、代わりに任意に設定した遺伝子、つまり、機能をみたい遺伝子が発現するようになっています。今回の場合、*fosB* 遺伝子産物である。FosB, Δ FosB, $\Delta 2\Delta$ FosB およびコントロールとして何も発現しないウイルスを用意した。 $\Delta 2\Delta$ FosB は Δ FosB mRNA の途中から翻訳された産物であるため、 Δ FosB だけが発現させるために Δ FosB 内のスタートコдонは変異を入れることでそこから $\Delta 2\Delta$ FosB が発現できないようにしている。本研究計画ではドーパミンシグナルを受ける報酬系において最も重要な部位と考えられている側坐核を標的として調べている。

(2) Social defeat model

うつ病のモデルとして、Social defeat ストレスを用いた。Social defeat ストレスは、自分より大きくて凶暴な CD1 マウスと柵で居住空間が分離された同一のケージ内に小さい C57/BL6 マウスをいれて、毎日、異なる CD1 マウスと 5 分間同一空間に入れていじめられたあと、そのまま同じケージ内で透明の柵に分けられた状態で 24 時間飼育するのを 10 日間繰り返し、11 日目に別の箱にいれて、CD1 マウスをどれだけ避けるようになるかをカメラを用いて 2 分半評価する方法です。この実験のメリットは、抗うつ薬が最低 2 週間投与しないとその効果が出ない実験系であることです。これまでのその他のうつ病モデルは抗うつ薬の一日投与でその効果が現れるものでした。しかし、ヒトにおいても、抗うつ薬がその効用を発揮するには最低 2 週間が必要で、その意味でもこのモデルがもっとも人間のうつに近いものと評価されています。また、同系統のマウスを用いた場合、うつになるマウスとそうでないマウスが現れるという意味においてもヒトに近いと考えられています。つまり、同じストレスに対してマウスによってその感受性が違い、それが実験の結果に現れるということです。この違いに関しても、我々のグループはいくつかの分子生理学的な反応性の違いをすでに明らかにしています。

Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression.

Bagot RC, Parise EM, Peña CJ, Zhang HX, Maze I, Chaudhury D, Persaud B, Cachope R, Bolaños-Guzmán CA, Cheer J, Deisseroth K, Han MH, Nestler EJ. *Nat Commun*. 2015

Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of Δ FosB.

Vialou V, Bagot RC, Cahill ME, Ferguson D,

Robison AJ, Dietz DM, Fallon B, Mazei-Robison M, Ku SM, Harrigan E, Winstanley CA, Joshi T, Feng J, Berton O, Nestler EJ.

J Neurosci. 2014 Mar 12;34(11):3878-87

Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience.

Friedman AK, Walsh JJ, Juarez B, Ku SM, Chaudhury D, Wang J, Li X, Dietz DM, Pan N, Vialou VF, Neve RL, Yue Z, Han MH.

Science. 2014 Apr 18;344(6181):313-9.

Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons.

Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, Juarez B, Ku SM, Koo JW, Ferguson D, Tsai HC, Pomeranz L, Christoffel DJ, Nectow AR, Ekstrand M, Domingos A, Mazei-Robison MS, Mouzon E, Lobo MK, Neve RL, Friedman JM, Russo SJ, Deisseroth K, Nestler EJ, Han MH.

Nature. 2013 Jan 24;493(7433):532-6

(3) cocaine CPP

依存症のモデルとして、マウスを使った条件付け場所嗜好性試験を利用した。灰色と縞々模様で床の編み目の太さを変えて、嗜好性に差が付かない二つの行き来できる箱を用意して、二日間、午前中は生理食塩水を注射して片側に 30 分間、午後はもう片方にコカインを 7.5mg/kg 注射して 30 分間入れて、三日目にコカイン側をどれだけ好むか、二つの箱の滞在時間の時間差を測定する。尚、どちらのスペースを好むか間に白色の領域を設けて、悩んでいる時間はカットしている。

(4) sucrose preference

コカインは刺激が強すぎて、脳の神経細胞の機能そのものを変化させてしまうため、刺激の弱い自然な報酬を求める行動を測定するために、砂糖水をどれだけ好むか調べる実験である。ストレス時は通常甘いものをほしがらる傾向があるが、social defeat のように強いストレスの場合は快情動を感じなくなり、砂糖水への嗜好性が減少する。

(5) elevated plus maze

高架式十字迷路。高さ 65cm で幅 6cm の十字の形をした通路での自由行動をみる。壁のある安心な通路と壁がない通路が交差しており、不安が少ないと壁がない通路の滞在時間が伸びる。だいたい 10%以下程度が平均である。不安の強さを測定したいときに使う。

(6) Yeast two hybrid method

Δ FosB が、抗ストレス、および依存症において重要な働きをしていることが分かったため、結合する蛋白質を同定して、その蛋白質

機能をより詳細に明らかにするために行った実験。実験方法は古典的で、 Δ FosB を三つのパーツに分けて、それぞれに結合する蛋白質が発現するクローンだけが生き残るシステムで、3 万近くある遺伝子から結合蛋白質をスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) コントロール、FosB、 Δ FosB、 $\Delta 2\Delta$ FosB を側坐核に発現させて、網羅的行動実験をしたところ、 Δ FosB の抗うつ効果は Δ FosB 特異的であり、 $\Delta 2\Delta$ FosB には認められなかった (図 4)。

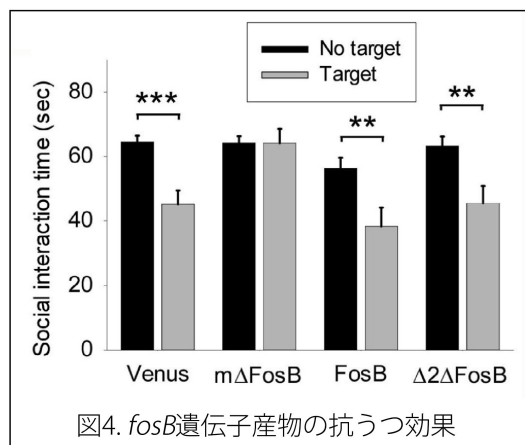


図4. fosB遺伝子産物の抗うつ効果

(2) また、ストレス後のコカイン依存性を調べた結果、 Δ FosB はストレス後のコカイン依存性を上昇させ、 $\Delta 2\Delta$ FosB がそれを抑制する事がわかりました (図 5)。 Δ FosB には抗不安

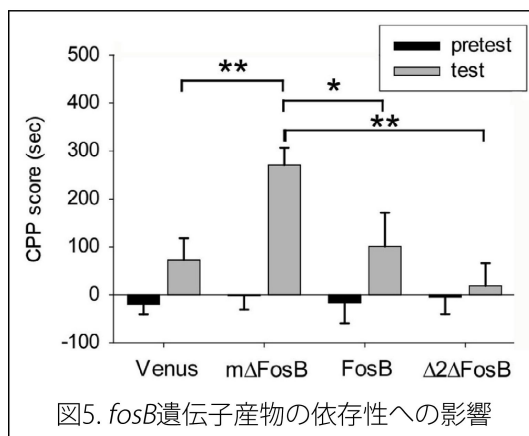


図5. fosB遺伝子産物の依存性への影響

効果はありませんでしたが、FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB には高架式十字迷路で不安低下を認めました。

(3) Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB の違いは N 末端の有無であるため、うつ状態においてコカイン摂取で誘導される Δ FosB 蛋白質の N 末端に結合・関係する蛋白質群が依存症を悪化させることがわかりました。そこで、Yeast two hybrid 法を用いて、N 末端に結合する蛋白質をいくつか同定し、それらの機能欠損蛋白質を側坐核に発現させることでストレス後の

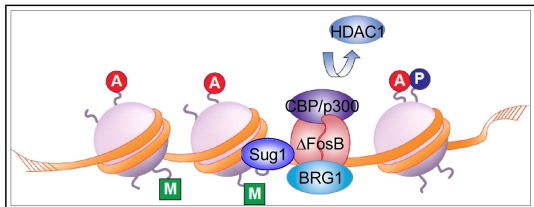


図6. Sug1と Δ FosBの転写活性化複合体のモデル

コカイン依存性を下げることがわかりましたが、そのメカニズムについて現在詳細に検討中です。

(4) それとは別にダイマー形成のためのロイシンジッパー部分と DNA に結合するための塩基性領域を含む Δ FosB と $\Delta 2\Delta$ FosB、および全長タイプの FosB に共通する部分に結合する蛋白質もいくつか同定しました。

そのうちのひとつにプロテアソーム複合体の構成因子である Sug1 (PSMC5)があり、 Δ FosB と Sug1 の結合が転写を活性化し、コカイン連続投与時の行動量上昇を引き起こすことを明らかにし、論文として発表しました(図6)。

具体的には、DNA をほどく役割の Brg1 と Δ FosB の leucine zipper と Sug1 の coiled coil region が結合し、さらにそれにヒストンをアセチル化させる CBP/p300 が結合する複合体を形成することを明らかにしました。そして、その複合体が *fosB* 遺伝子そのものの転写も調節していることも明らかにしました。また、Sug1 の変異体ではコカイン連続投与による行動量上昇を認めませんでした(図7)。

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

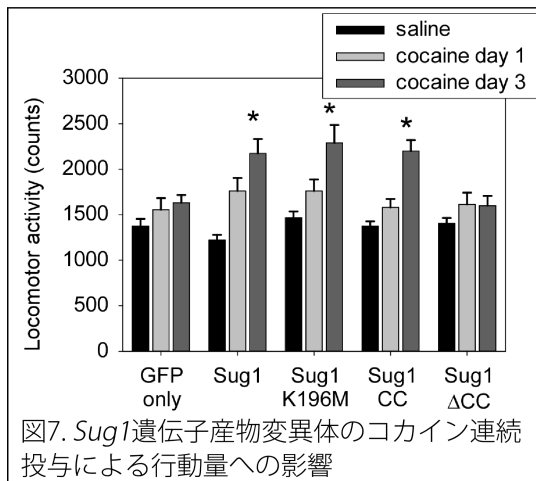


図7. *Sug1*遺伝子産物変異体のコカイン連続投与による行動量への影響

は下線)

[雑誌論文](計19件)

PSMC5, a 19S Proteasomal ATPase, Regulates Cocaine Action in the Nucleus Accumbens. Ohnishi YH,

Ohnishi YN, Nakamura T, Ohno M, Kennedy PJ, Yasuyuki O, Nishi A, Neve R, Tsuzuki T, Nestler EJ. PLoS One. 2015 May 11;10(5):e0126710 doi: 10.1371 (査読あり)

Ohnishi YN, Ohnishi YH, Vialou V, Mouzon E, LaPlant Q, Nishi A, Nestler EJ. Functional role of the N-terminal domain of Δ FosB in response to stress and drugs of abuse. Neuroscience. 2015 Jan 22;284:165-70 (査読あり)

Nomaru H, Sakumi K, Katogi A, Ohnishi YN, Kajitani K, Tsuchimoto D, Nestler EJ, Nakabeppu Y. Fosb gene products contribute to excitotoxic microglial activation by regulating the expression of complement C5a receptors in microglia. Glia. 2014. 62(8):1284-98, (査読あり)

Yutsudo N, Kamada T, Kajitani K, Nomaru H, Katogi A, Ohnishi YH, Ohnishi YN, Takase K, Sakumi K, Shigeto H, Nakabeppu Y. FosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. Neuropsychopharmacology. 2013 38(5):895-906. (査読あり)

Koo JW, Mazei-Robison MS, Chaudhury D, Juarez B, LaPlant Q, Ferguson D, Feng J, Sun H, Scobie KN, Damez-Werno D, Crumiller M, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Mouzon E, Dietz DM, Lobo MK, Neve RL, Russo SJ, Han MH, Nestler EJ. BDNF is a negative modulator of morphine action. Science (New York, N.Y.) 2012 338:124-128 Oct (査読あり)

[学会発表](計16件)

Ohnishi YN, Ohnishi YH, Vialou V,

Mouzon E, Laplant Q, Nishi A, Nestler EJ.: Functional role of the N-terminal domain of Δ FosB in responses to stress and drugs of abuse. Neuroscience 2013 2013.11.9-13 (San Diego, USA)

大西克典、大西陽子、Mouzon E、Vialou VF、Laplant Q、西昭徳、Nestler EJ. : 社会的ストレスとコカイン依存症における Δ FosB 蛋白質の N 末ドメインの機能解析 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21-23 日 (福岡)

Ohnishi YN, Ohnishi YH, Mouzon E, Vialou V, Laplant Q, Nishi A, Nestler EJ.: Functional role of the N-terminal domain of deltaFosB in response to stress and drugs of abuse. 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11-14 日(福岡)

Ohnishi YN, Ohnishi YH, Mouzon E, Vialou V, Laplant Q, Nishi A, Nestler EJ.: Functional role of the N-terminal domain of deltaFosB in response to stress and drugs of abuse. Society for Neuroscience 2012, Oct 13 -17 2012, New Orleans (USA)

大西陽子、大西克典、中村崇規、Eric J. Nestler : プロテオソーム ATPaseSug1 と Δ FosB の結合はコカインにより誘発される自発運動を調節する。第 14 回ブレインサイエンス研究会 2012 年 6 月 2-3 日 (霧島)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/pharm/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大西 克典 (OHNISHI, Yoshinori)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10626865

(2)研究分担者

西 昭徳 (NISHI, Akinori)

久留米大学・医学部・教授