

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791215

研究課題名(和文)うつ病患者とうつ病モデルマウス双方から同定されたNoxaのうつ行動に対する役割

研究課題名(英文)The role of Noxa in depression-like behavior

研究代表者

山形 弘隆(YAMAGATA, Hirotaka)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10549934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Bcl-2ファミリーはアポトーシスを制御する主要タンパク群で、神経可塑性や抗うつ薬の作用への関与が示唆されている。しかし、これらの詳しいメカニズムは未だ不明なままである。本研究では、Bcl-2ファミリーの中でもNoxaに着目した。うつ病モデルマウスの海馬におけるNoxaの発現を調べたところ、増加していることが分かった。Noxaノックアウトマウスは野生型マウスに比べて社交性が増加していた。また、社会敗北ストレス負荷による社交性低下に抵抗性を示した。以上の結果から、Noxaがストレス負荷によるマウスのうつ様行動に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Bcl-2 family members have essential roles in apoptosis. It is reported that Bcl-2 family contribute to stress-induced depression-like behavior. In this study, we investigated the expression of BH3-only protein mRNA in the brain of the animal model for depression. The expression of Noxa in the hippocampus was significantly increased. In non-stressed condition, Noxa KO mice showed longer time of social interaction compared to wild-type mice. With social defeat stress, wild-type mice showed a reduced social interaction time, whereas Noxa KO mice did not show such reduction of social interaction time. These results suggested that Noxa might relate to the stress vulnerability.

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：うつ様行動 神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の発表によると、うつ病等の気分障害患者は平成 20 年には 104.1 万人と 12 年で 2.4 倍に増加している。また、平成 21 年度の自殺者は 3 万人を超え、交通事故死の実に 6.7 倍となっている。自殺やうつ病による経済的損失は年間 2.7 兆円に上ると推定されており、早急かつ効果的な対策が必要とされている。うつ病治療のためには抗うつ薬が使用されるが、その詳細な薬理作用は未だ不明であるため、現在はモノアミンを介した抗うつ薬しか存在していない。新規抗うつ薬開発のためには、うつ病の詳細な病態解明が急務である。

うつ病発症仮説の一つとして、ストレス脆弱性仮説がある。これは、ストレスに脆弱性が低い人は、高いストレスに対して適応できるが、脆弱性の高い人は弱いストレスでもうつ病を発症してしまう、という仮説である。この仮説を支持する動物研究を当研究室から発表した (Neuron 2011;69, 359-372)。これは C57/B6 マウスは、慢性的でマイルドなストレス負荷に適応できるのに対し、BALB/c マウスは同じような慢性ストレスでもうつ行動を示す、というものである。このうつ様行動は抗うつ薬で回復することから、ストレス負荷した BALB/c マウスはストレス脆弱性仮説に基づいたうつ病モデルマウスと考えている。

我々は、神経細胞障害が神経可塑性異常やストレス脆弱性を引き起こすと仮定し、アポトーシスシグナル伝達の本幹を担う Bcl-2 ファミリーに注目した。

Bcl-2 ファミリーはアポトーシスを制御する主要タンパク群で、神経可塑性に関与していることが報告されている (J Neurosci. 2004;24:843-52、Mol Cell Biol 2007;27:4293-305)。また、抗うつ薬の作用や不安行動においても、Bcl-2 ファミリーの関与が示唆されている

(Neuropsychopharmacology 2008;33:1545-1558、Molecular Psychiatry 2009;14:959-967)。しかし、これらの詳しいメカニズムは未だ不明なままである。本研究では、Bcl-2 ファミリーの中でも特に BH3-only protein に着目した。BH3-only protein は細胞生存と細胞死のバランスとして機能しており、細胞死刺激の種類によって、その使い分けがなされていると考えられている (Current Opinion in Cell Biology 2005;17:617-625)。この BH3-only protein が神経可塑性を低下させ、うつ状態を起こすと仮定した。

2. 研究の目的

Noxa を中心に、BH3-only protein とその転写因子が神経可塑性に与える影響を、培養細胞を用いて調べる。また、Noxa がストレス脆弱性やうつ様行動に与える影響を、Noxa ノックアウトマウスを用いて調べる。BH3-only protein とその転写因子が、うつ病のバイオマーカーとなり得るかどうかを検討する。

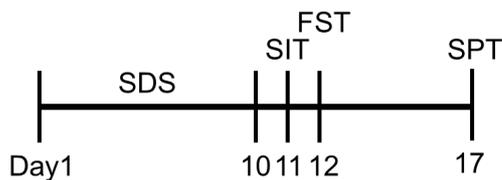
3. 研究の方法

(1) 細胞培養と神経突起伸展の解析

Neuro2A (N2A) は 10% 仔牛血清 (FBS) を含む DMEM メディウムを用い、37 °C、5 % CO₂ で培養した。Flag タグを付加した FoxO3 の発現には、pcDNA-zeo3.1 (+) 発現ベクターを用いた。すべての siRNA は株式会社 RNAi より購入した。N2A (1 × 10⁴) を 12 well プレートに播種し、24 時間後に 40 pmol の siRNA または 1 μg のプラスミドを Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。同時に 200 ng の GFP expression vector も合わせてトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後に 1 % FBS メディウムで培養した。神経突起伸展は細胞体の 2 倍以上 (N2A) の神経突起をもつ細胞を数えた。

(2) うつ様行動実験

Noxa ノックアウト (KO) マウスを、東京大学の谷口維紹先生よりご供与いただいた。山口大学の動物使用ガイドラインに従って適切に使用した。研究プロトコールについては、山口大学の動物使用委員会の承認を得た。成獣オス Noxa KO、ヘテロ (HT)、野生型 (WT) マウスのうつ様行動を、砂糖水嗜好性テスト (SPT)、強制水泳テスト (FST)、社交性テスト (SIT) を用いて解析した。攻撃性の高い CD1 マウスに 5 分間攻撃させ、その後仕切りのある同一ケージで 24 時間飼育する社会的敗北ストレス (Social Defeat Stress: SDS) (Science 2006; 311, 864-868) を 10 日間負荷し、うつ様行動を調べた。



Noxa KO マウスに BrdU 取り込みをさせ、脳神経細胞の増殖能を調べた。

(3) 定量的リアルタイム PCR (Q-PCR)

ストレス脆弱性が報告されている成獣オス BALB/c マウス (Charles River Japan) を、山口大学の動物使用ガイドラインに従って適切に使用した。研究プロトコールについては、山口大学の動物使用委員会の承認を得た。慢性軽微ストレスを 6 週間負荷した後、海馬を摘出した。RNA 抽出には TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いた。

細胞からの RNA 抽出には RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いた。100 ng のトータル RNA を鋳型にして QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) を用いて cDNA を作成した。Q-PCR は Applied Biosystems StepOne™ Fast Real-Time PCR System を使用し、増幅の検出には SYBR green PCR

master mix (Applied Biosystems) を用いた。内部コントロールには GAPDH mRNA を用いた。プライマーの配列は以下の通りである。

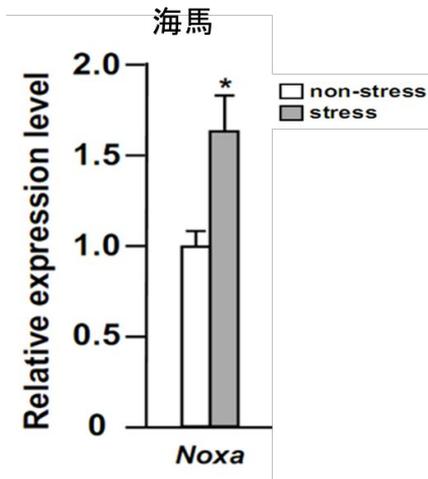
GAPDH:	Forward	Primer
AGGTCGGTGTGAACGGATTTG、Reverse		
primer TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA、		
Noxa:	Forward	Primer
GGAGTGCACCCGGACATAACT、 Reverse		
primer TGAGCACACTCGTCCTTCAA、		
FoxO3:	Forward	Primer
ACAAACGGCTCACTTTGTCC、 Reverse		
primer CTGTGCAGGGACAGGTTGT		

(4) ウェスタンブロット

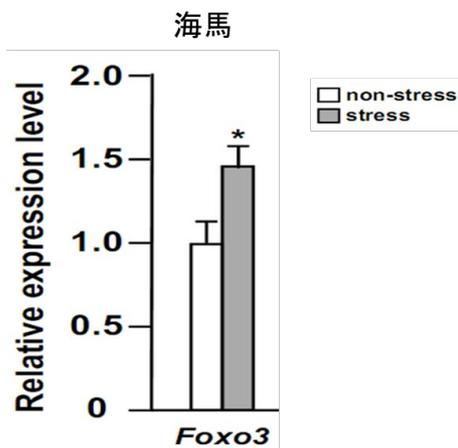
細胞は遠心回収後に RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1 % SDS, 1 % NP40, 0.5 % deoxycholate [sodium salt], and 150 mM NaCl) で溶解したのち、サンプルバッファでボイルして、一般的なプロトコールでウェスタンブロットを行った。FoxO3 の抗体は Cell Signaling Technology 社の抗体を用いた。

4. 研究成果

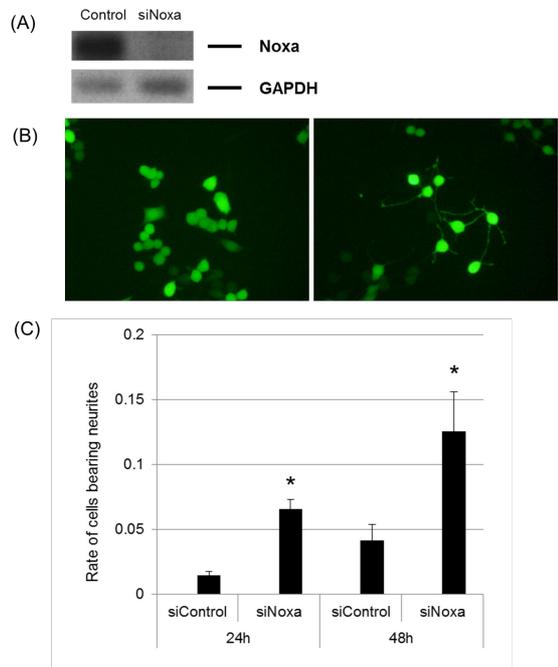
うつ病モデルマウスとして報告した慢性ストレス負荷 BALB/c マウスの海馬で、BH3-only protein の mRNA を定量的リアルタイム PCR 法で定量したところ、Noxa がストレス負荷群で増加していることが分かった。



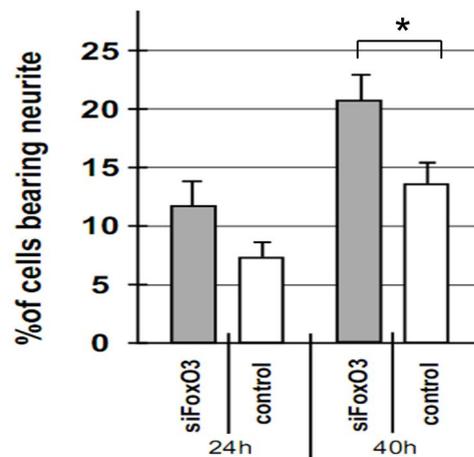
同様に、Noxa の転写因子の mRNA 発現を調べたところ、FoxO3 の発現がストレス依存的に増加していることが分かった。



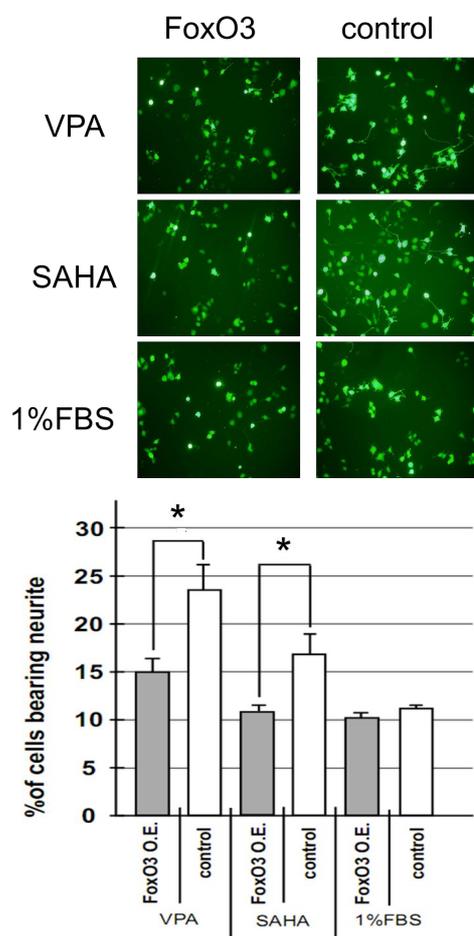
Noxa や FoxO3 が神経可塑性に影響するかどうかを確かめるため、神経由来細胞である Neuro2a 細胞を用いた。Noxa を siRNA を用いてノックダウンさせた後、Low serum medium 下で培養したところ、コントロール群に比べて siNoxa 群の神経突起伸展が増加した。この結果から Noxa は神経突起伸展を負に制御していることが示唆された。



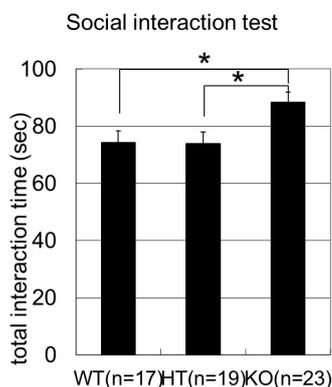
同様に FoxO3 を siRNA でノックダウンさせた後、Low serum medium 下で培養したところ、コントロール群に比べて siFoxO3 群の神経突起伸展が増加した。



Neuro2a 細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) や Vorinostat (SAHA) を添加すると、神経突起伸展を起こすが、FoxO3 を過剰発現させると、この突起伸展が抑制された。これらの結果から FoxO3 も神経突起伸展を負に制御していることが示唆された。

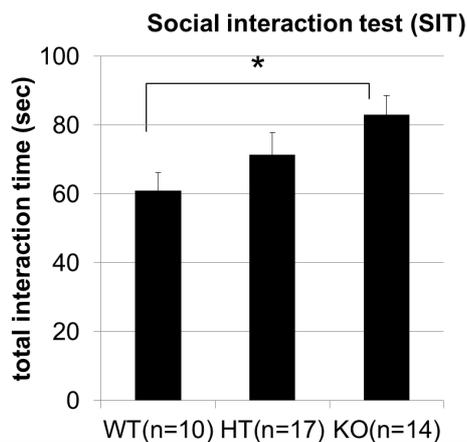


神経可塑性を制御する可能性が示唆された Noxa がマウスのうつ様行動に与える影響を調べるため、Noxa KO マウスのうつ様行動を調べたところ、Noxa KO マウスは HT マウスや WT マウスと比べて、社交性が向上していることが分かった。FST や SPT など、他のうつ様行動解析については有意な差が認められなかった。



SIT は SDS を負荷した後のうつ様行動評価

として用いられている。そこで、SDS に対して Noxa KO マウスが抵抗性を示すかどうかを調べたところ、予想通り Noxa KO マウスは WT マウスに比べて SDS 負荷後の社交時間が有意に多かった。このことから、Noxa KO マウスはうつ様行動を起こしにくいことが示唆された。



以上の結果から、Noxa が神経可塑性を負に制御し、ストレス負荷後の社交性低下に重要な役割を担っていることが示唆された。

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 1 件)

Tomohiko Shibata, Hiroataka Yamagata, Shusaku Uchida, Koji Otsuki, Teruyuki Hobara, Fumihiko Higuchi, Naoko Abe, Yoshifumi Watanabe, The alteration of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes in mood disorder patients. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 43: 222-229, 2013 (査読有) DOI:10.1016/j.pnpbp.2013.01.003.

〔学会発表〕(計 14 件)

Hiroataka Yamagata, Tomohiko Shibata, Shusaku Uchida, Koji Otsuki, Teruyuki Hobara, Fumihiko Higuchi, Naoko Abe, Yoshifumi Watanabe: The role of noxa in depression-like behavior. 11th World Congress of Biological Psychiatry, 2013/06/26, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan

Teruyuki Hobara, Shusaku Uchida, Fumihiko Higuchi, Naoko Abe, Tomohiko Shibata, Hiroataka Yamagata, Koji Otsuki, Yoshifumi Watanabe: Induction of CaMKII β by HDAC inhibitors might be

involved in structural plasticity and subsequent behavioral responses to chronic stress. 11th World Congress of Biological Psychiatry, 2013/06/26, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan

大舘孝治, 内田周作, 山形弘隆, 芳原輝之, 渡邊義文, C6 細胞における抗うつ薬により HDAC4 を介した GDNF 遺伝子の制御機構, Neuro2013, 2013/06/22, 国立京都国際会館, 京都市

樋口文宏, 内田周作, 山形弘隆, 大舘孝治, 芳原輝之, 阿部尚子, 柴田朋彦, 渡邊義文, うつ様行動と神経可塑性における microRNA-124 と HDAC7 の役割の解析, Neuro2013, 2013/06/21, 国立京都国際会館, 京都市

阿部尚子, 内田周作, 山形弘隆, 大舘孝治, 芳原輝之, 柴田朋彦, 樋口文宏, 渡邊義文, 神経可塑性とうつ様行動におけるヒストン脱アセチル化酵素 Sirtuins の役割の検討, Neuro2013, 2013/06/21, 国立京都国際会館, 京都市

Teruyuki Hobara, Shusaku Uchida, Hiroataka Yamagata, Fumihiko Higuchi, Naoko Abe, Tomohiko Shibata, Koji Otsuki, Yoshifumi Watanabe: Molecular mechanisms of rapid antidepressant action by suberoylanilide hydroxamic acid. Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, 2012/10/17, New Orleans, USA

Tomohiko Shibata, Hiroataka Yamagata, Shusaku Uchida, Koji Otsuki, Teruyuki Hobara, Fumihiko Higuchi, Naoko Abe, Yoshifumi Watanabe: The alteration of Hypoxia Inducible Factor 1(HIF1) gene expression in mood disorder patients. Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, 2012/10/14, New Orleans, USA

Hiroataka Yamagata, Shusaku Uchida, Tomohiko Shibata, Teruyuki Hobara, Koji Otsuki, Yoshifumi Watanabe: The role of Noxa in neural plasticity and major depression. Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, 2012/10/14, New Orleans, USA

山形弘隆, 内田周作, 柴田朋彦, 樋口文宏, 阿部尚子, 芳原輝之, 大舘孝治, 渡邊義文: 神経可塑性とうつ病に対する Noxa の関与. 第 34 回日本生物学的精神医学会, 2012/09/30, 神戸国際会議場, 神戸市

大舘孝治, 内田周作, 山形弘隆, 芳原輝之, 渡邊義文: 抗うつ薬による HDAC4 を介した GDNF 発現制御機構. 第 34 回日本生物学的精神医学会, 2012/09/30, 神戸国際会議場, 神戸市

樋口文宏, 内田周作, 山形弘隆, 大舘孝治, 芳原輝之, 阿部尚子, 柴田朋彦, 渡邊義文: うつ様行動と神経可塑性におけるマイクロ RNA-124 の役割の解析, 第 34 回日本生物学

的精神医学会, 2012/09/29, 神戸国際会議場, 神戸市

阿部尚子, 内田周作, 山形弘隆, 大舘孝治, 芳原輝之, 樋口文宏, 渡邊義文: 神経可塑性とうつ様行動へのヒストン脱アセチル化酵素 Sirtuins の関与. 第 34 回日本生物学的精神医学会, 2012/09/29, 神戸国際会議場, 神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 弘隆 (YAMAGATA, Hiroataka)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10549934