

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350998

研究課題名(和文)発光でCREB活性化を計測できるマウスを用いたうつ病からの回復メカニズム解明

研究課題名(英文) Analysis of recovery mechanism from depression by in vivo imaging of CREB phosphorylation

研究代表者

石本 哲也 (Ishimoto, Tetsuya)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：40397170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB)は記憶形成に重要と考えられている転写因子である。我々はCREBの活性化を可視化できるプローブを開発し、それを発現するトランスジェニックマウスを作製した。そのマウスを用いて、抗うつ剤投与で大脳皮質全体でのCREB活性化が起きること、うつ誘導剤で大脳皮質局所でのCREB活性化が起きることを発見した。またうつ誘導剤で起きるCREBリン酸化はうつ症状の重篤度と相関することも見出した。

研究成果の概要(英文)：Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB) is a transcription factor that is considered important for memory consolidation. We generated a transgenic mouse line that expressed probe proteins that emitted light in response to CREB phosphorylation. We found increased light emission from cerebral cortex of live Tg mouse after the acute treatment of imipramine, a tricyclic antidepressant. Increase in CREB phosphorylation in cerebral cortex by the same treatment was confirmed using western blotting. These results demonstrate this Tg mouse strain can be used for the imaging of CREB phosphorylation in live mouse brain. Furthermore, we demonstrated the correlation between the change in CREB phosphorylation at a particular region in the brain and depression-like symptom induced by the administration of reserpine, a psychotropic agent. This result indicates CREB phosphorylation at selective brain region is important for the induction of depression-like symptom.

研究分野：分子神経科学

キーワード：ルシフェラーゼ うつ病 抗うつ剤 イメージング

1. 研究開始当初の背景

うつ病は日本で約100万人の患者がいるといわれている(厚生労働省統計)発生頻度の高い疾患である。うつ病の治療薬の多くは、脳内のプレシナプス終末での、セロトニン再取り込み阻害を作用機序として設計されている。ところが実際に薬を摂取すると、セロトニンの再取り込み阻害は数時間後には起きるものの、うつ病の症状の緩和には数週間かかる。このタイムラグが生じる原因は未だ解明されていないが、セロトニン再取り込み阻害の後に起きる、大脳皮質におけるCREB活性化を介した遺伝子発現誘導が症状緩和に必要であり、タイムラグが生じるのではないかと、という仮説がある。この仮説はタイムラグを説明することができ、実際に抗うつ剤を投与することで脳内のCREB活性化が誘導されるという報告がある。しかしこれだけの事実でうつ病の症状緩和にCREB活性化が必要であるとは結論できない。なぜなら症状緩和とCREB活性化が独立して起きている現象であるかもしれないからである。CREB仮説を証明するためにはCREB活性化が起きたマウスにおいて、その後症状が緩和されたか調べる必要があるが、従来法ではそれはできない。なぜなら脳内のCREBの活性化を調べることは、実験動物の死を意味し、その後うつ病の症状が緩和されたかどうか調べられないからである。

生きた動物の脳内現象を計測する方法として、fMRI、PETなどが用いられている。これらの方法は、それぞれ脳内の微小血流変化や化合物の局在が計測対象であるが、本研究では、従来技術で計測できなかった、特定の蛋白質(CREB)の活性化を計測対象としている。CREBはリン酸化に伴う活性化を介して、下流の遺伝子発現を誘導する。その活性化は記憶形成などの神経系の機能発現に重要である。つまりCREBがいつどこで活性化しているか明らかにすることは、神経系の機能解析において重要である。しかし、従来の方法でCREB活性化を解析するためには実験動物を殺し、生化学的に解析し計測するしかなかった。申請者は、ホタルの発光蛋白質を分割したスプリットルシフェラーゼを用いて、CREB活性化を計測できる新規プローブ蛋白質を開発し、その蛋白質を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このようなトランスジェニックマウスは、生きた動物の体内でのCREB活性化を、発光シグナルで検出解析できる初めての実験系となる。

2. 研究の目的

うつ病は多くの人々が罹患する精神神経疾患である。抗うつ剤によって治療を行うことが一般的に行われているが、その作用機序に

おいてCREBのリン酸化が重要であるという仮説がある。CREBのリン酸化が脳内のどの部位でいつ起きることが重要なのか解明する。またうつ病患者の脳内ではCREBリン酸化が亢進しているという報告と、減少しているという報告があり、コンセンサスが得られていない。

このような状況の中、申請者が開発したトランスジェニックマウスは、脳内のCREBの活性化を調べた後、うつ病の症状の変化を行動学的に調べることができる。この利点を利用して、トランスジェニックマウスにうつ症状を誘導したり、抗うつ剤を投与したりした後で、生きたまま脳内のCREB活性化の変化を追い、その後うつ症状の重篤度を計測するテストを行うことができる。それらの実験から得られたデータを基にして、どの時期に脳内のどの部位でCREB活性化が起きることが、うつ病発症やうつ症状緩和に連関が深いのか、統計的に解析し、検証することができる。うつ症状の改善とCREB活性化との連関が明らかになれば、CREBリン酸化を指標にした抗うつ薬や行動療法の開発など、うつ病の治療技術の向上につながると期待される。

3. 研究の方法

抗うつ剤のCREBリン酸化に対する影響を調べる実験では、マウスにイミプラミン、フロキセチンなどの抗うつ剤を投与する。その後ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔に注射し、脳から発せられる光を微量発光測定装置を用いて計測する。もし脳内でCREBがリン酸化されていれば、発光量の増大が観測されるはずである。発光計測後にそのマウスの脳を取り出し、ウエスタンブロットで解析することにより、脳内CREBのリン酸化が上昇しているか確認実験を行うことができる。これらの実験により抗うつ剤を投与した後どういったタイミングでCREBリン酸化が起きるか調べることができる。

また、うつ症状に伴うCREBリン酸化の変化を計測するためには、トランスジェニックマウスにうつ症状を誘導することが知られているレセルピンを投与する。脳からの発光を計測したのち、尾懸垂試験によって、うつ症状の重篤度を計測する。さらにうつ症状の重篤度とCREBリン酸化を示す脳からの発光のパターン変化との相関を計算し、脳内のどの部位でCREBリン酸化が起きることがうつ症状において重要か解析する。

4. 研究成果

トランスジェニックマウスにイミプラミン、フロキセチンなどの抗うつ剤を投与する

と約1時間後には脳からの発光が上昇していることが確認できた。その時マウス脳中のリン酸化 CREB の量が増加していることが、ウエスタンブロットによる解析で明らかになった。また、抗うつ剤投与後に発光上昇を呈したマウスを5日後に発光計測しなおすと、発光量が基に戻っていることがわかった。これらのことは、抗うつ剤による CREB リン酸化が一過性のものであることと、抗うつ剤の作用が CREB リン酸化を介していることを示唆するものであるが、実際にうつ病患者に抗うつ剤を投与した場合には抗うつ効果が見られるのは、投薬の数週間後であることを考えると、今回計測された短時間での CREB リン酸化の上昇の後に発現上昇する遺伝子が抗うつ効果を担っていると考えられる。その遺伝子が何であるか突き止める研究が今後必要になると考えられる。

うつ症状を誘導するレセルピンを投与したトランスジェニックマウスは、大脳皮質の前方部位で左右対称に発光が上昇した。これは抗うつ剤投与では見られない特徴的パターンであった。次にこのパターン変化とうつ症状の重篤度が相関するかマウスの使用数を増やして、統計的な解析を行った。具体的には各脳部位からの発光量の変化と、うつ病様症状を計測する尾懸垂試験の結果を用いて相関を解析した。うつ症状の重篤度と特定の部位における発光量の増減の相関が強ければ、その部位での CREB リン酸化がうつ症状の誘導に深く関わっていることが予測される。その結果、大脳皮質前方部位における波高量上昇と、うつ症状の重篤度が相関することが分かった。つまりこの部位での CREB リン酸化はうつ症状を湯どうするうえで重要である可能性がある。またこれらの結果は論文として投稿した(雑誌論文(1))。

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 5 件)

(1) In vivo imaging of CREB phosphorylation in awake-mouse brain.

*Ishimoto T., Mano H., Mori H. Scientific Reports (査読有) 5:9757, 2015

(2) Identification of a novel protein kinase A inhibitor by bioluminescence-based screening.

*Ishimoto T., Azechi K., Mori H. Biological and Pharmaceutical Bulletin(査読有) 38:1969-1974, 2015

(3) Discovery of novel adenylyl cyclase inhibitor by cell-based screening.

Mano H., *Ishimoto T., Okada T., Toyooka N., Mori H. Biological and Pharmaceutical Bulletin (査読有) 37:1689-1693, 2014

(4) In silico and pharmacological screenings identify novel serine racemase inhibitors.

*Mori H., Wada R., Li J., Ishimoto T., Mizuguchi M., Obita T., *Gouda H., Hirono S., *Toyooka N. Bioorganic and medicinal chemistry letters (査読有) 24: 3732-3735, 2014

(5) Development of a therapeutically important radiation induced promoter.

*Ogawa R., Morii A., Watanabe A., Cui Z. G., Kagiya G., Fukuda S., Kume K., Hasegawa T., Hatashita M., Izumi H., Ishimoto T., Feril L. B. Bioengineered (査読有) 4: 44-49, 2013

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 石本哲也, 眞野寛生, 森寿. ルシフェラーゼを用いたマウス脳内 CREB リン酸化のイメージング; 第 33 回日本生化学会北陸支部大会; 2015 May 23; 富山.

(2) 石本哲也, 眞野寛生, 畦地健司, 森寿. 発光蛋白質を用いた CREB リン酸化経路阻害剤の探索; 第 66 回日本薬理学会北部会; 2015 Sep 18; 富山.

(3) 石本哲也, 森寿. 発光蛋白質を用いた生体脳内 CREB リン酸化の可視化; 第 24 回日本バイオイメージング学会学術集会; 2015 Sep 27; 東京.

(4) 石本哲也, 眞野寛生, 畦地健司, 森寿. 発光プローブ蛋白質を用いた CREB リン酸化経路阻害化合物のスクリーニング; 第 38 回日本分子生物学会年会; 2015 Dec 2; 神戸.

(5) Tetsuya Ishimoto, Hisashi Mori. Correlation analysis between remote memory and CREB phosphorylation in cerebral cortex using in vivo imaging; 45th annual meeting of the Society for Neuroscience; 2015 Oct 18; Chicago.

(6) 石本哲也. 生体脳内 CREB リン酸化可視化; 第 2 回可視化マウス研究会; 2015 Dec 2; 神戸. (招待講演)

(7) 石本哲也, 眞野寛生, 森寿. スプリットルシフェラーゼを用いたマウス脳内 CREB のリン酸化イメージング; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.

(8) T Ishimoto, H Mano, H Mori. In vivo imaging of CREB phosphorylation using a novel transgenic mouse line expressing bioluminescence probes; Society For Neuroscience; 2014 Nov 15; Washington DC.

(9) 石本哲也, 眞野寛生, 森寿. 生体脳での CREB リン酸化イメージング; 日本バイオイメージング学会; 2013 Sep 16; 東京.

(10) 石本哲也, 眞野寛生, 森寿. CREB リン酸化検出プローブによるマウス生体脳イメージング; 第 36 回日本分子生物学会年会; 2013 Dec 3; 神戸.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称：神経活動を可視化するプローブ

発明者：石本哲也、森寿、和泉宏謙

権利者：富山大学

種類：特許

番号：5624469 号

取得年月日：2014 年 10 月 3 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

石本 哲也 (ISHIMOTO TETSUYA)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・

助教

研究者番号：40397170