

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430079

研究課題名(和文) 脳白質におけるリン酸化とメチル化をキーとしたうつ病発症機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the onset of major depressive disorder by regulating both phosphorylation and protein methylation in the white matter of brain

研究代表者

宮田 信吾 (MIYATA, Shingo)

近畿大学・東洋医学研究所・准教授

研究者番号：70403194

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)：本研究は、オリゴデンドロサイト特異的なストレス応答機構を明らかにする上で、リン酸化及びメチル化シグナル変化による器質的変化の制御機構を解明し、白質機能維持によるうつ病の治療応用へと展開する為の研究基盤を確立することを目的とした。

本研究課題では、まず脳梁オリゴデンドロサイト特異的に、慢性ストレスによりPI3Kリン酸化シグナルが活性化することを見出すと共にタンパクメチル化酵素PRMT1の発現を確認すると共に、これら両者のストレス応答時の相互作用の可能性を見出した。さらに、ランビエ絞輪部の慢性ストレスによる構造変化と髄鞘-軸索間の情報伝達レベルの低下の可能性についても見出すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Although dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by chronic stress is indicative of major depression, the molecular mechanisms and functional changes in the brain underlying depression are largely unknown. In this study, by using chronic stress for mice, we attempted to elucidate the molecular pathway induced by elevated plasma corticosterone levels. We observed the following effects both, in vivo and in vitro: (1) repeated exposure to stress activates the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK1)-serum glucocorticoid regulated kinase (SGK1)-N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1)-adhesion molecule stabilization pathway via an increase in plasma corticosterone levels; and (2) the activation of this signaling pathway induces morphological changes in oligodendrocytes. Our data strongly suggest that these abnormalities of oligodendrocytes are possibly related to depression-like symptoms.

研究分野：神経化学

キーワード：うつ病 脳白質 髄鞘 オリゴデンドロサイト 慢性ストレス リン酸化 タンパクメチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病は様々な環境の変化、すなわち環境要因の影響が大きい疾患であり、慢性的なストレス暴露はうつ病発症の最大の原因とされている。これまでに申請者らは、慢性ストレス暴露によるうつ病モデルマウスを用いて脳の特定の細胞 OLs での PDK1 を介した SGK1 (Serum/glucocorticoid regulated kinase 1)のリン酸化シグナルの変化および脳白質の器質的変化が起きている事など、うつ病などの精神疾患発症の分子機序の解明を行ってきた (Yachi et al., Bra. Res. 1159, 141-147, 2007; Kubota et al., J. Neurochem. 110, 496-508, 2009; Miyata et al., PLoS One. 6, e19859, 2011)。

(2) また、これとは別にドーパミンやセロトニンなどの合成に必要な葉酸やメチル基のドナーである S-Adenosylmethionine (SAM-e) 投与によるうつ病治療の有効性が報告された (Nahas and Sheikh, Can Fam Physician, Vol.57, 659-63, 2011)。これらの因子は身体が環境の変化に適応する際の非常に重要な応答機構のひとつ Methylation cycle の主要構成因子であり、うつ病患者では血清及び脳脊髄液中での SAM-e 濃度が低下し、代償性に脳内で高値を示すという報告もある。

(3) 最近になり、注目され始めたこのメチル化シグナルについて、タンパク質アルギニン残基に対するメチル基転移酵素 Protein Arginine N-methyltransferases (PRMTs)の機能解析を中心に申請者らは脳におけるメチル化の意義についても精力的に解析を続けている。これまでに神経回路形成機構や神経突起伸展機構 (Ikenaka et al., Neuroscience, 141, 1971-1982, 2006; Miyata et al., Neurosci. Lett. 445, 162-165, 2008)、神経分化機構 (Fujiwara et al., Mol. Cell Biol. 26, 2273-2285, 2006)、損傷時の応答機構 (Taneda et al., Bra. Res. 1155, 1-9, 2007; Kousaka et al., Neuroscience, 163, 1146-1157, 2009) 等に関する研究成果を継続的に報告してきた。さらに、最近になり慢性ストレス暴露により脳白質において PRMT1 が発現上昇することを見出した。この PRMT1 発現量は PI3K シグナルに影響を与えたとの報告があり、両者の関係に非常に興味を持たれた。

2. 研究の目的

本研究計画では、うつ病発症におけるこれまでのリン酸化シグナルだけの検討に加えて、Methylation cycle (PRMTs, SAM-e 等)の機能変化 (メチル化シグナル経路) をリン酸化シグナル経路と協調的に捉えることにより、うつ病と OLs の構造異常に関する基礎研究を完成し、白質における協調的シグナル伝達制御という全く新しい概念を利用した確定的診断方法や根本的うつ病治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

研究期間内には以下のことを明らかにする。
(1) 慢性ストレス暴露による HPAaxis の活性亢進による血中コルチゾール (GC) の上昇が、何故、脳内では白質 OLs 特異的に SGK1 を活性化するのか。グルココルチコイド受容体 (GR) を介した OLs 特異的 GC 応答に関わる因子の同定・機能解析を行う。

(2) うつ病患者脳における SAM-e 濃度上昇の意義は? 神経細胞においては、コリンやカテコールアミンなどへのメチル基のドナーであり、白質においてはミエリン蛋白へのメチル基のドナーでもある。これらのメチル化レベルの変化がうつ病状態で観察されるのか、明らかにする。

(3) 申請者らがこれまでに見出している PDK1-SGK1-NDRG1 カスケードのリン酸化亢進による活性化経路に、PRMTs ファミリーによるメチル化亢進が関与しているのかについて、アルギニン残基のメチル化レベルの変化の有無とリン酸化レベルの関連性を明らかにする。

(4) うつ病状態における OLs の構造変化がランビエ絞輪の構造 (Nav, Kv, Caspr, ankyrinG, NF) にどのように影響するのか免疫染色や電子顕微鏡を用いて明らかにする。更にこの時、神経活動に影響があるのか、伝導速度の測定や Na-K ATPase 活性の測定などを行う。

(5) リン酸化・メチル化両シグナルの制御により、ストレス暴露時の白質 OLs の構造変化を予防・治療することが出来るのかモデルマウスや SGK1 KO マウス等を利用して明らかにする。

(6) うつ病モデルマウス血漿などを用いて、SAM-e レベルやアルギニンメチル化レベルとうつ病体との関連性を検討することにより、うつ病の確定的な診断標的を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者らが作成した慢性ストレス暴露マウスでは、恒常的に血中のコルチコステロン量が増加しており、尾懸垂法などの行動解析で無気力レベルの上昇や海馬歯状回における神経新生レベルの低下など、ヒトうつ病患者で観察されるような動態を示し、うつ病の一つの病態モデルあると考えられた。

このマウス脳の形態的解析から、OLs の構造変化が起きていることを既に見出している。さらに、OLs における SGK1 発現量の増加及びリン酸化カスケードが活性化することも見出した。

そこで本研究では、このような OLs の構造変化が起きる分子機序、SGK1 活性化のメカニズムを解明し、うつ病発症における白質 OLs の構造・機能異常の病態生理学的な意義を明らかにする。

(1) 慢性ストレス特異的、OLs 特異的シグナル伝達経路の解析

本研究では、慢性ストレス暴露マウスにお

いて、SGK1 リン酸化シグナル活性化および PRMT1 メチル化シグナル活性化機構を明らかにする。

OLs 特異的グルココルチコイド (GC) 応答機構の解析

慢性ストレス暴露による PDK1-SGK1 のリン酸化亢進がグルココルチコイド受容体 (GR) 発現変化と関連するのか、その反応は OLs 特異的か否かについて解析する。

OLs 特異的 PRMT1 発現上昇機構の解析

PRMT1 発現量変化について発現量変化について Western blotting 法により検討する。

慢性ストレス特異的、かつ白質特異的リン酸化機構、メチル化機構の検討

急性ストレスとして単回のストレス暴露を行ったマウスと慢性ストレス暴露マウスの脳において、SGK1 活性化、PRMTs 活性化について検討する。

(2) OLs 構造異常がランビエ絞輪に及ぼす影響の解析

本研究では、白質における OLs の細胞質・突起の増加が神経軸索に与える影響を明らかにする。

OLs の構造変化がランビエ絞輪に与える影響の検討

ランビエ絞輪に局在するイオンチャンネル (Nav, Kv)、接着因子 (NF, Casper, AnkyrinG 等) の局在変化の有無について免疫染色法を用いて検討する。また、それぞれの因子の発現量変化について western blotting 法により解析する。

白質の微細構造の検討

形態学的な変化を検討するため、電子顕微鏡を用いてランビエ絞輪周辺の構造を比較検討する。

ストレス暴露により神経軸索に及ぼす影響の生化学的、電気生理的解析

申請者が見出した OLs の様々な構造変化が神経機能にどのような影響を与えるのか検討するために、伝導速度の測定を行うと共に、白質サンプルおよび灰白質サンプルを用いて、神経活性と非常に関連する Na-K ATPase 活性の測定を行い、比較検討する。

4. 研究成果

(1) まず、慢性ストレスにより特異的に活性化する PI3K シグナル経路における PDK1 の重要性の検討を行った。常時活性型および常時非活性型の PDK1 変異体を HEK293 細胞に強制発現させ、SGK1 や NDRG1 のリン酸化レベルの変動について検討を行ったところ、常時活性型 PDK1 を発現している細胞で SGK1 や NDRG1 のリン酸化の亢進が観察された。

(2) また、OLs における PRMT ファミリーの発現を確認したところ、PRMT8 の発現は低く、PRMT1 の発現が多いことを見出した。以上の結果を基に、PDK1 の RNAi 処理後のデキサメタゾン (Dex) 刺激、さらには PRMT1 の RNAi 処理後の Dex 刺激によるそれぞれの経路の活性化や発現変化を検討した。その結果、PRMT1

と PRMT8 の発現変化に差異が見出されたと共に、PRMT1 発現を低下させると PI3K シグナルの活性化レベルに変化が見られた。

(3) 引き続いて、HPA axis 制御に重要な役割を果たすグルココルチコイド受容体 (GR) タンパク量の調節機構について検討を加えたところ、Non-coding RNA のひとつ microRNA (miR) による転写後発現調節機構を見出した。脳梁においては、miR-124a の発現量低下による GR タンパク量の増加機構が存在することを見出した。

(4) OLs 構造異常がランビエ絞輪部にどのような影響を与えるのか検討するために、電子顕微鏡で微細構造を検討したところ、慢性ストレス後に nodo 領域、paranodo 領域共にその構造体の幅が狭くなっていた。さらに、抗 Nav, Caspr, Kv1.1 抗体を用いて免疫染色法により検討したところ、Node 領域は狭くなっているものの境界構造は保たれており、脱髄様の変化は起きていなかった。しかし、慢性ストレス後に paranodo と jaksta paranode の境界領域が崩れていることを見出した。

(5) このような OLs の様々な構造変化が神経機能にどのような影響を与えるのか検討を行ったところ、慢性ストレス負荷による白質の構造変化により伝導速度および Na-K ATPase 活性は共に低下傾向を示した。この変化が OLs-神経軸索間の情報伝達により引き起こされているか否か検討するため、Na イオン等の変化を捉えることの出来る細胞膜電位変化を測定したところ、神経細胞や未成熟 OLs では有意差に変化しなかったが、成熟 OLs のみ膜電位変化が有意に低下することを見出した。以上の検討から、慢性ストレス負荷による OLs の構造変化が神経軸索の活性化レベルを低下させている可能性について明らかに出来た。さらに、この成熟 OLs の活動レベルの低下には、PI3K シグナルによるリン酸化だけでなく、PRMTs ファミリーによるタンパクメチル化シグナルの関与の可能性を見出すことが出来た。

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14件)

Miyata S*, Taniguchi M, Koyama Y, Shimizu S, Tanaka T, Yasuno F, Yamamoto A, Iida H, Kudo T, Katayama T, Tohyama M. Association between chronic stress-induced structural abnormalities in Ranvier nodes and reduced oligodendrocyte activity in major depression. 査読有
Sci Rep. 2016; 6: 23084.
DOI: 10.1038/ srep23084.

Miyata S*, Yoshikawa K, Taniguchi M, Ishikawa T, Tanaka T, Shimizu S, Tohyama

M.
Sgk1 regulates desmoglein 1 expression levels in oligodendrocytes in the mouse corpus callosum after chronic stress exposure. 査読有
Biochem Biophys Res Commun. 2015; 464(1): 76-82.
DOI: 10.1016/ j.bbrc.2015.05.109.

Shimizu S, Tanaka T, Takeda T, Tohyama M, Miyata S*.
The Kampo medicine Yokukansan decreases microRNA-18 expression and recovers glucocorticoid receptors protein expression in the hypothalamus of stressed mice. 査読有
Biomed Res.Int. 2015;2015:797280.
DOI: 10.1155/ 2015/ 797280.

Shimizu S, Tanaka T, Tohyama M, Miyata S*.
Yokukansan normalizes glucocorticoid receptor protein expression in oligodendrocytes of the corpus callosum by regulating microRNA-124a expression after stress exposure. 査読有
Brain Res.Bull. 2015 May;114:49-55.
DOI: 10.1016/ j.brainresbull.2015.03.007.

Tohyama M, Miyata S, Hattori T, Shimizu S, Matsuzaki S.
Molecular basis of major psychiatric diseases such as schizophrenia and depression. 査読有
Anat Sci Int. 2015 Jun;90(3):137-43.
DOI: 10.1007/ s12565- 014- 0269- 3.

Miyata S*, Hattori T, Shimizu S, Ito A, Tohyama M.
Disturbance of oligodendrocyte function plays a key role in the pathogenesis of schizophrenia and major depressive disorder. 査読有
Biomed Res Int. 2015;2015:492367.
DOI: 10.1155/ 2015/ 492367.

Shimizu S, Koyama Y, Hattori T, Tachibana T, Yoshimi T, Emoto H, Matsumoto Y, Miyata S, Katayama T, Ito A, Tohyama M.
DBZ, a CNS-specific DISC1 binding protein, positively regulates oligodendrocyte differentiation. 査読有
Glia. 2014 May;62(5):709-24.
DOI: 10.1002/glia.22636.

[学会発表](計35件)

Shingo Miyata, Keiko Yoshikawa, Manabu Taniguchi, Toshiko Ishikawa, Takashi Tanaka, Shoko Shimizu, Masaya Tohyama

Plasma corticosterone regulates cadherin superfamily molecules in oligodendrocytes in the mouse corpus callosum.
第20回グリア研究会 2015/12/5 名古屋市立大学(名古屋)

宮田信吾, 清水尚子, 田中貴士, 松村彬世, 川上あゆみ, 鹿島美恵子, 遠山正彌
うつ病発症に関わるオリゴデンドロサイトの機能異常に関する研究
BMB2015, 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015/12/1-4 神戸国際会議場(神戸)

Shingo Miyata, Shoko Shimizu, Takashi Tanaka, Masaya Tohyama
MicroRNA normalizes glucocorticoid receptor levels in neuron and oligodendrocytes after stress exposure.
第58回日本神経化学学会大会 2015/9/11-13 大宮ソニックシティ(大宮)

Shingo Miyata, Shoko Shimizu, Takashi Tanaka, Masaya Tohyama
Downregulation of microRNA normalizes glucocorticoid receptor levels in neuron and oligodendrocytes of stress exposed mice.
第38回日本神経科学大会 2015/7/28-30 神戸国際会議場(神戸)

宮田信吾, 清水尚子, 田中貴士, 遠山正彌
オリゴデンドロサイトの機能異常と慢性ストレスの関係
第19回グリア研究会 2014/12/6 東京商工会議所(東京)

S. MIYATA, S. SHIMIZU, T. TANAKA, M. TOHYAMA
"Structural abnormalities of the nodes of Ranvier by exposed repeated stressful events is associated with the onset of major depressive disorder"
SfN's 44th annual meeting, Neuroscience2014, Washington, DC, USA. 2014/11/15-11/19

宮田信吾, 清水尚子, 田中貴士, 遠山正彌
オリゴデンドロサイトの機能とストレス
第36回日本生物学的精神医学会, 第57回日本神経化学学会大会 合同学会 2014/09/29-10/1 奈良県文化会館(奈良)

S Miyata, Y Koyama, M Taniguchi, S Shimizu, T Tanaka, A Matsumura, M Tohyama
Structural abnormalities of the nodes of Ranvier by exposed repeated stressful events is associated with the onset of major depressive disorder.
Neuroscience 2014 - 第37回日本神経科学

大会 2014/09/11-13 パシフィコ横浜(横浜)

Shingo Miyata, Yoshihisa Koyama, Manabu Taniguchi, Masaya Tohyama

Structural abnormalities of the nodes of Ranvier upon chronic stress exposure is associated with the onset of major depressive disorder.

Neuro2013 第36回日本神経科学大会. 第56回日本神経化学会大会. 第23回日本神経回路学会大会 合同学会 2013/06/20-23 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

近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門(基礎研究部門)

<http://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/index.html>

近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門(基礎研究部門)研究成果

<http://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/results.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮田 信吾 (MIYATA, Shingo)

近畿大学・東洋医学研究所・准教授

研究者番号：70403194

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし