

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870844

研究課題名(和文) Aktが賦活する転写因子の同定と転写因子過剰発現マウスによる抗うつ効果の解析

研究課題名(英文) The identification to transcription factor activated by Akt and the investigation for the relation between the transcription factor and antidepressant effect.

研究代表者

中野 三穂 (Nakano, Miho)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90621574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：SSRIの一種であるフルボキサミンによってAkt-1のリン酸が増加することを示した。そこで、さらにプロテオミクス的手法を用い抗うつ薬により変化する蛋白質の発現量を解析した。

SNRIであるミルナシプラム耐性HT22細胞を作成し、対照のHT22細胞との間で、蛋白質の発現の差をプロテオミクス的手法を用いて解析した。両群の比較を2D-DIGE法を用いて二次元電気泳動後、MSにて蛋白質を解析した。その結果、tRNA A ligase, glucose-regulated protein, Histone-binding proteinなどの蛋白質変化を認めた。

研究成果の概要(英文)：The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) may be a downstream target of a variety of antidepressant treatments, and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are used clinically for the treatment of depression. BDNF binds to and activates tyrosine kinases receptor (TrkB) to exert its effects. TrkB, after activation by ligands, stimulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K). This study demonstrates that fluvoxamine treatment rapidly increased phosphorylation of Akt-1. And BDNF activated Akt-1 phosphorylation by the TrkB/PI3K/Akt-1 pathway. We conclude that the phosphorylation of Akt-1, downstream of PI3K, was the key to their antidepressant effects.

We developed the milnacipran, SNRI, resistant HT22 cell, and detected the changed protein by the proteomics method. We detected some proteins, tRNA ligase, glucose-regulated protein, histone-binding protein compared with control.

研究分野：神経精神医学

キーワード：Akt 抗うつ薬 BDNF

## 1. 研究開始当初の背景

選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)は前シナプスにおいてセロトニン、ノルエピネフリン等の再取り込みを阻害し、シナプス間隙のセロトニンレベルを増加させることによって作用するといわれてきている。しかしながら、抗うつ薬投与後これらのモノアミンレベルはすみやかに上昇するのに対して、抗うつ薬の効果は数週間後にみとめられる。この時間的差異が生じることにより、シナプス間隙のモノアミンレベルの増加や再取り込み阻害のみでは説明できない。最近の研究では、抗うつ薬の作用機序が前シナプスの受容体レベルの仮説から、後シナプス、細胞質内の神経伝達系の作用機序の解明に移りつつある。

また最近の研究により BDNF はうつ病をはじめとする精神疾患の病態に関与していることがわかり、BDNF の発現は抗うつ薬の downstream target であるといわれてきている。一方 1レセプターは小胞体上に存在しており、物質によって刺激を受けると転位し、カルシウムイオンを増加させ、IP3 受容体が活性化する。いくつかの抗うつ薬は 1レセプターとの親和性をみとめている。受容体に結合する化合物は中枢神経系において様々な神経系に対して調節的に作用し、抗うつ作用、認知機能障害改善作用などを有する。また、1 受容体アゴニストは小胞体・ミトコンドリアを介するエネルギー産生を更新する作用を持ち、最終的には神経保護作用や神経突起促進作用を発現することが考えられる。申請者は、神経保護作用を有する BDNF と抗うつ薬の中でも特に 1 受容体アゴニストとして神経保護作用をもつといわれているフルボキサミン (FLV) に注目し、これらにより細胞内伝達系の調節作用のある Akt との関連性を検討した。

## 2. 研究の目的

SSRI である FLV の受容体以下の細胞内情報伝達系の変化を Akt-1 を介して究明する。さらに抗うつ薬により変化する蛋白量の変化を解明することで、抗うつ薬の中枢神経系での細胞内情報伝達系機能の変化を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) PC12 細胞に FLV と BDNF、シグマ 1 受容体作用薬である、dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate を投与し、細胞を回収後、電気泳動を施行した。anti-phospho (Ser<sup>473</sup>) Akt-1 抗体、Akt-1 抗体を用いてイムノブロットを施行し、Enhanced Luminol Chemiluminescence system にて蛍光を検出し、デンストメーターにて定量した。さらに PI3K の選択的阻害剤である LY294002 を前処置し、Akt-1 リン酸化が PI3K を介しているかを検討した。

(2) HT22 細胞を用い、抗うつ薬の SNRI である

ミルナシプラン(MIL)濃度を漸増し 100 μM MIL 耐性細胞を作成した。この細胞を 2D-DIGE にて二次元電気泳動を施行し、MS を用いて蛋白質の同定を行い解析をした。

## 4. 研究成果

(1) MTT assay にて FLV 濃度が 200 μM までは、PC12 細胞に対して毒性がないことが判明した。

PC12 細胞を 10 μM と 100 μM の FLV で刺激した。40 分で Akt-1 の Ser473 部位のリン酸化レベルがコントロール群と比較してそれぞれ、最大 2.4 倍、3.8 倍と増加した。また、50ng/ml の BDNF も同様に、投与後 5 分で Akt-1 の Ser473 部位のリン酸化レベルがコントロール群と比較して最大 2.6 倍増加した。更に、PI3K の選択的阻害剤である LY294002 によって、FLV や BDNF による Akt-1 のリン酸化は有意に阻害された。更に、シグマ 1 受容体作用薬である DHEA-sulfate もまた、Akt-1 の Ser473 部位のリン酸化レベルが 2.1 倍増加した。SSRI の一種であるフルボキサミンによって Akt-1 のリン酸が増加することを示した。このメカニズムは BDNF による tyrosine kinases receptor (TrkB) を活性化し、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を介しての系と、PLC-γ/ IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> pathway を介して sigma-1 受容体を活性化させた PI3K を活性化させる系との両方の系が関与し Akt-1 のリン酸が増加していることを示した。そこで、さらにプロテオミクス的手法を用い抗うつ薬により変化する蛋白質の発現量を解析した。

(2) SNRI である MIL 耐性 HT22 細胞を作成し、対照の HT22 細胞との蛋白質の発現の差をプロテオミクス的手法を用いて解析した。両群の比較を 2D-DIGE 法を用いて二次元電気泳動後、MS にて蛋白質を解析した。その結果、Glycine tRNA ligase, glucose-regulated protein, Histone-binding protein などの蛋白質変化を認めた。現在さらにこれらの蛋白質が抗うつ薬との作用にどのように関与しているのかを各タンパク質の siRNA を HT22 細胞投与し各蛋白質のノックダウンした後、Akt-1 のリン酸が増加しているかを検討している。

## 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 4 件)

渡邊高志、長田賢一、芳賀俊明、武藤亜矢、小川百合子、田口 篤、浅利翔平、中野三穂、貴家康男、山口 登、アリピプラゾールの長期投与によるジゴキシンの血中/脳内濃度の変化、聖マリア

ンナ医科大学雑誌、42(4)、223-231、2015、  
査読有

長田賢一、渡邊高志、田口篤、芳賀俊明、  
武藤亜矢、牛谷真由美、柳田拓洋、中野三穂、  
貴家康男、山口登、抗不安薬の適切な  
使用方法、Modern Physician、34(6)、2014、  
719-723、査読無

長田 賢一、渡邊高志、田口篤、小川百合  
子、芳賀俊明、武藤亜矢、中野三穂、柳田  
拓洋、貴家康男、山口登、線維筋痛症の概  
念と治療、臨床精神医学、42(6)、773-778、  
2013、査読無

長田 賢一、渡邊高志、田口篤、小川百合  
子、芳賀俊明、武藤亜矢、牛谷真由美、中  
野三穂、柳田拓洋、貴家康男、山口登、線  
維筋痛症のメンタルケア、関節外科、  
32(12)、52-55、2013、査読無

〔学会発表〕(計 3件)

A. Taguchi, K. Osada, T. Haga, A. Muto,  
M.Hakano, et. al. The investigation of  
the drug transporter regulated  
milnacipran in hippocampal neuronal in  
vitro system of HT22 cells.  
Neuroscience2014, 2014年11月

A. Mutou, K. Osada, T. Haga, T. Watanabe,  
A. M.Hakano, et. al. The Investigation  
for the rhythm of GABA in the mouse SCN.  
Neuroscience 2014, 2014年11月

T. WATANABE, K. OSADA, T. HAGA, Y.  
M.Hakano,et.al. The association between  
atypical antipsychotic drugs with  
P-glycoprotein in the mice brain.  
Neuroscience 2014, 2014年11月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://mariannapsycho.web.fc2.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 三穂 (NAKANO, Miho)

聖マリアンナ医科大学・神経精神科・助  
教

研究者番号：90621574