

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860481

研究課題名(和文)GluR1をターゲットにした早期抗うつ効果発現のメカニズム探索

研究課題名(英文)The role of AMPA receptor GluR1 for rapid-acting antidepressant behavior

研究代表者

芳原 輝之(HOBARA, Teruyuki)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：20637970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我々がこれまでに見出したHDAC阻害剤SAHAによる早期抗うつ効果の分子機構の同定を目的とした。その成果として、SAHAはCaMKII β の発現を増加させることでAMPA受容体サブユニットGluR1のリン酸化を促進し、その結果GluR1のシナプス膜上への移行が増大し、これが早期抗うつ効果に必須な分子イベントであることが示された。この結果はCaMKII β -GluR1シグナル経路が早期抗うつ効果の作用機序に関与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism underlying HDAC inhibitor SAHA-induced rapid-acting antidepressant behavior. We found that SAHA increases mRNA expression of CaMKII β , which in turn enhances the phosphorylation of AMPA receptor GluR1, resulting in increased trafficking of GluR1 in synaptic membrane in the hippocampus of mice treated with SAHA. Together, these results suggest CaMKII β -GluR1 signaling might be associated with SAHA-induced rapid-acting antidepressant behavior.

研究分野：分子精神医学

キーワード：CaMKII β ストレス うつ病 抗うつ作用 GluR1

1. 研究開始当初の背景

うつ病の病態は単純なモノアミン神経系の機能異常ではなく、最近では遺伝素因的なストレス脆弱性を基盤に、神経可塑性に關与する遺伝子群がストレスなどをトリガーに発現異常をきたすことにより、うつ病発症につながると想定されている。当研究室の先行研究でも、うつ状態が神経細胞の構造的変化を引き起こし、神経可塑性異常を生じることを見出している。我々はストレス負荷で生じる神経細胞突起退縮やスパイン減退が、海馬のCaMKII、さらにはその先のターゲットであるAMPA受容体への刺激により予防され、それが抗うつ効果へつながっていくと仮説を立て、うつ病の病態メカニズムへの新たなストラテジーの確立をめざしている。

2. 研究の目的

我々の先行研究において、HDAC阻害剤がCaMKIIのisoformであるCaMKII β を介して、従来の抗うつ薬ではみられない早期の抗うつ効果を示すことを見出した。またうつ病モデル動物の海馬CaMKII β 発現制御が、うつ様行動あるいは抗うつ効果に關与する可能性を見出した。

CaMKIIのシナプス内基質としては、グルタミン酸受容体であるAMPA型受容体のサブユニットGluR1のセリン残基が挙げられる。CaMKIIは神経可塑性に關連する重要な因子として記憶・学習についての研究はすすんでいる一方で、うつ病を始めとした精神疾患の病態との関係性については不明な部分が多い。

本研究では、CaMKII β 発現増強の結果として起こりうるGluR1の機能変化が抗うつ効果発現に關係するかを検討することとした。AMPA受容体への作用、特にGluR1への作用が早期抗うつ効果発現のキーポイントになることが確認されれば、同部位をターゲットとした新たな抗うつ薬の創薬への道が拓かれることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) うつ病モデルマウスの作製

8週齢の雄性BALB/cマウスに6週間にわたって慢性マイルド予測不能ストレス(CUMS)を負荷した。

(2) mRNA発現解析

マウス海馬より全RNAを抽出し、逆転写PCR法にてcDNAを合成した。StepOneリアルタイムPCR機を用いてCaMKII mRNA量を測定した。内部標準遺伝子としてGAPDH発現量を用いた。

(3) タンパク質発現量解析

50マイクログラムのタンパク質サンプルを電気泳動し、PVDFメンブレンにトランスファーした。メンブレンを5%スキムミルクでブロッキングし、抗CaMKII抗体(1:1000)で一晩インキュベートした。メンブレンを洗浄後、HRP二次抗体(1:5000)でインキュベートした。再度メンブレンを洗浄後、ECL試薬とスキャナーでメンブレンをdevelopmentし、ソフトウェアを用いて目的バンドのシグナル強度を測定した。内部標準として、GAPDHレベルを測定した。

(4) 行動解析

マウスのうつ状態を評価する行動解析法として、スクロース嗜好性試験と社交性試験を用いた。スクロース嗜好性試験は、まず2本の水ボトルで1週間以上飼育した。その後、スクロース入りのボトル2本で2日間飼育した。テスト前日にボトルをとりはずし、絶飲した。テスト当日、水ボトルとスクロースボトルの両方を提示し、4時間の摂取量を測定した。

社交性試験は、テストするマウスとC3Hマウスをそれぞれ新しいケージに個飼いにし、1時間後にテストマウスのいるケージの中に幼若C3Hマウスを入れた。その後、テストマウスによるインタラクションタイムを3分間測定した。

(5) 統計処理

2群間比較には unpaired t-test を、3群以上の比較には One-way ANOVA あるいは two-way ANOVA を使用した。有意差が認められた場合には、Bonferroni correction あるいは Tukey's post-hoc test 分析を行った。p 値が 0.05 未満を有意と判定した。

4. 研究成果

(1) CaMKII の発現分布

マウス海馬組織における CaMKII の分布、および早期抗うつ作用を有する HDAC 阻害剤の投与により同部位における CaMKII の発現量、分布にどのような影響をもたらすかを、免疫組織学手法を用いて解析した。まずストレス脆弱性を有する 8 週齢のオス BALB/c マウスの海馬 CA1、CA3、歯状回において CaMKII が強く発現している事を確認した (図 1)。

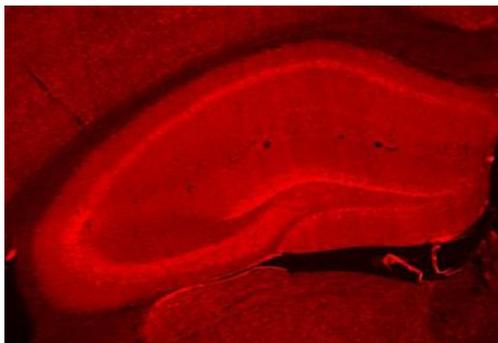


図 1. マウス海馬における CaMKII の発現局在

(2) SAHA 投与マウスにおける CaMKII 発現量

早期抗うつ効果を有する HDAC 阻害剤の SAHA を同系統マウスに 5 日間腹腔内投与し CaMKII の発現量を解析したところ、歯状回領域において有意に増加していることが確認された。また歯状回領域内に存在する海馬未成熟神経細胞の CaMKII 発現量も有意に増加していることが確認された (図 2)。

(3) GluR1 発現量の検討

CaMKII の標的分子として GluR1 に着目し、慢性ストレス負荷後の GluR1 発現量を測定した。その結果、シナプス画分を用いた検討において、ストレス負荷群の海馬における GluR1 発現量は、非ストレス群に比して有意に低下していた。また、この発現低下は SAHA や抗うつ薬の慢性投与により回復した。さらに、SAHA 投与によって、GluR1 のリン酸化は増加していた (図 3)。

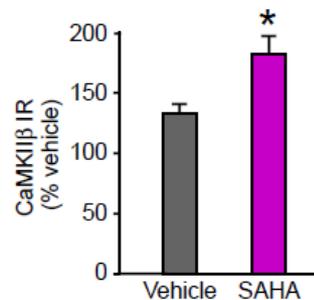


図 2. SAHA 投与マウス海馬歯状回における CaMKII 発現量

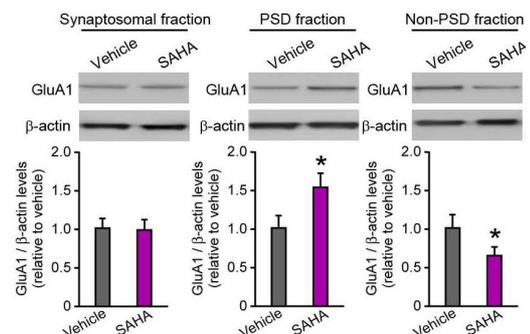


図 3. SAHA 投与マウスの海馬歯状回 (左: synaptosomal fraction、中央: PSD fraction、右: Non-PSD fraction) における CaMKII の発現量

(4) CaMKII による GluR1 のリン酸化

CaMKII が GluR1 のリン酸化を制御しているかを検討した。CaMKII の発現をノックダウン可能なアデノ随伴ウイルスを海馬に投与し、3 週間後に GluR1 のリン酸化レベルを測定した。その結果、CaMKII ノックダウンマウスにおける GluR1 のリン酸化レベルはコントロールマウスに比して有意に低下していた (図 4)。

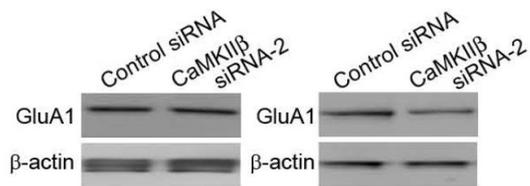


図4. CaMKII ノックダウンマウスにおける GluR1 のリン酸化レベル (左: whole cell extract、右: Synaptosomal fraction)

(5) GluR1 機能亢進のうつに対する影響

CUMS を負荷した BALB/c マウスの海馬に GluR1 のシナプスへの局在を増大させるペプチド(TAT-GluR1_{CT})を投与した結果、うつ状態は回復した(図5)。この結果から、海馬シナプス上の GluR1 が抗うつ効果に重要な役割を担っていることが示唆された。

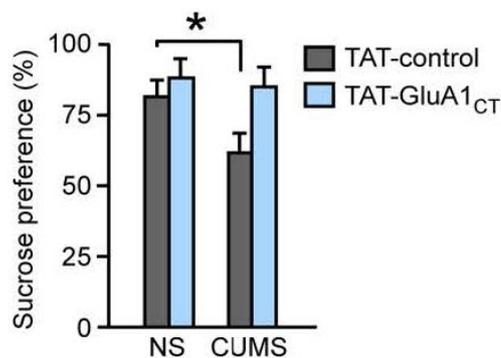


図5. TAT-GluR1_{CT} 投与マウスのスクロース嗜好性試験結果

以上の一連の解析から、SAHA による抗うつ作用は、CaMKII による GluR1 のリン酸化が重要な役割を担っていることが示された。この結果は、GluR1 のシナプス膜上への移行を促進させるような化合物が即効性のある抗うつ化合物となり得る可能性を示唆している。

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 1 件)

Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H, Higuchi F, Hobara T, Hara K, Kobayashi A,

Watanabe Y. Hippocampal Sirtuin 1 signaling mediates depression-like behavior. *Biological Psychiatry*. 2016 Jan 30. pii: S0006-3223(16)00080-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.01.009. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

芳原輝之. 海馬未成熟神経細胞の形態学的変化はうつ様行動に影響する. 第 33 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会. 大丸別荘 (福岡県筑紫野市). 2014 年 10 月 17 日.

芳原輝之. 海馬未成熟神経細胞の形態変化によるうつ様行動の変化. 第 36 回日本生物学的精神医学会. 奈良文化会館 (奈良県奈良市). 2014 年 9 月 30 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳原 輝之 (HOBARA, Teruyuki)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号: 20637970