

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790280
 研究課題名 (和文) 新規抗うつ薬スクリーニング系の確立を目指したマウスによる分子基盤研究
 研究課題名 (英文) Basic study in mice to establish a novel screening system of antidepressants.
 研究代表者 笠原 二郎
 (KASAHARA JIRO)
 東北大学・大学院薬学研究科・講師
 研究者番号：10295131

研究成果の概要： 中枢神経細胞核内に豊富に存在するカルモジュリン依存性キナーゼ IV (CaMKIV) をノックアウトしたマウスの、既存抗うつ薬に対する感受性が分子レベル・細胞レベル・個体行動レベルにおいて、野生型マウスと比較して有意に減弱していることを初めて明らかにし、特に大脳皮質前頭領域と辺縁系が関わることが示唆された。また既存の抗うつ薬が関わるセロトニンやノルアドレナリンが、大脳皮質初代培養神経細胞において CaMKIVなどを活性化して基質である転写因子 CREB のリン酸化反応を制御することも明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：脳神経疾患、薬理学、シグナル伝達、モデル動物、リン酸化反応、細胞内カルシウム

1. 研究開始当初の背景

うつ病は深刻な社会問題であり、その分子病態や抗うつ薬の作用機序解明と、新規抗うつ薬の開発は社会的急務である。現在使用されている抗うつ薬は中枢セロトニンやカテコラミン系の増強作用をもつが、薬効発現には数週間以上の投与が必要であり、理由として投与期間中に遺伝子発現変化や神経新生などを伴った神経回路再編成が生じるためと考えられる。しかし抗うつ薬が脳のどの部位でどのような機序で神経細胞内分子や遺伝子発現に変化を及ぼすのか、詳細は不明で

ある。うつ病と抗うつ薬作用に関わる、細胞内機序や核内での転写制御機構を明らかにすることで新たな抗うつ薬開発につながりたいと申請者は考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、うつ傾向の増大と抗うつ薬感受性の顕著な低下が認められる CaMKIV ノックアウトマウスと初代培養大脳皮質神経細胞を用いて、うつ病と抗うつ薬感受性制御に関わる分子機構の一端を明らかにし、このマウスの新規抗うつ薬スクリーニング系

としての応用可能性を探ることである。

3. 研究の方法

スペクトルの異なる複数の抗うつ薬（デシプラミン、マプロチリン、フルオキセチン）を野生型 C57BL/6 マウスに慢性投与し、うつや不安に関連した行動評価を、強制水泳、尾懸垂、新規摂食抑制、高架式十字迷路などにより行った。

また慢性投与後に全脳を摘出し、前頭前野、線条体、海馬、扁桃核、視床下部における CaMKIV 活性をによって測定した。また同時に CaMKIV と同じファミリーに属する CaMKI と CaMKII の活性、CaMKIV の代表的な基質である転写因子 CREB のリン酸化反応を検討した。他の CREB リン酸化酵素である PKA や ERK などの活性も測定した。

抗うつ薬慢性投与後のマウスの、海馬歯状回における神経新生は、BrdU ラベル方によって検討した。

マウス大脳皮質初代培養神経細胞を調製し、培養 14 日目にグルタミン酸、セロトニン、ノルアドレナリンで刺激して、前述の酵素群・タンパク質の活性やリン酸化反応を、免疫プロット方により検討した。

4. 研究成果

抗うつ薬（フルオキセチン、デシプラミン、マプロチリン）を慢性投与した時の効果を行動レベルで評価したところ、野生型マウスに比較して CaMKIV ノックアウトマウスでは、強制水泳試験および尾懸垂試験における無動時間短縮効果が顕著に減弱し、新規性摂食抑制試験の潜時が有意に上昇していた。

抗うつ薬慢性投与による CaMKIV 活性化脳領域を検討したところ、検討した全ての抗うつ薬に関して、前脳皮質における CaMKIV 活性が顕著に増大していた。CaMKIV 基質である CREB タンパク質のリン酸化を定量比較したところ、野生型マウスに比べて CaMKIV ノックアウトマウスでは、基礎レベルの CREB リン酸化が有意に低下しており、野生型マウスでは抗うつ薬慢性投与により CREB リン酸化反応が有意に上昇したが、ノックアウトマウスではリン酸化反応の上昇が観察されなかった。CaMKI や protein kinase A は CaMKIV のような活性化パターンを示さなかったことから、前脳皮質において抗うつ薬慢性投与による CREB リン酸化反応の上昇には CaMKIV が主として関与していることが示された。海馬・扁桃核といった大脳辺縁系では、フルオキセチンとデシプラミンによって CaMKIV 活性が上昇したが、PKA 活性も上昇していた。

CaMKIV ノックアウトマウスの海馬歯状回における神経新生は、通常の飼育状態では野生型マウスと変わらず生じていたが、野生型マウスに見られる抗うつ薬フルオキセチンおよ

びデシプラミンによる神経新生促進効果が見られなくなっていることが明らかになった。またこれまで使用していたマウスの週齢より高い週齢で、不安の指標となる高架式十字迷路試験を行ったところ、ノックアウトマウスで有意に高い不安傾向が観察された。このマウスが加齢に伴うストレス脆弱性を示す可能性が強く示唆され、うつおよび不安のモデルとなりうる可能性が考えられる。

以上の結果から、CaMKIV ノックアウトマウスでは抗うつ薬慢性投与による薬効が顕著に減弱しており、既存抗うつ薬の作用点下流で機能していることが強く示唆され、そのような分子機構に深く関与していることが推察される。またこの分子機構を活性化するような新規抗うつ薬のスクリーニング系になりうると思われた。

一方初代培養神経細胞を用いた研究では、グルタミン酸・セロトニン・ノルアドレナリンによる CaMKIV 活性化反応と、CaMKIV の基質である転写因子 CREB のリン酸化反応をを検討した。グルタミン酸による CaMKIV の活性化と CREB のリン酸化は急激かつ一時的に生じ、刺激時間 10 分以降では不活性化された。一方セロトニンおよびノルアドレナリンによる CaMKIV 活性化及び CREB リン酸化反応は、グルタミン酸刺激時とは異なる時間経過を示し、上昇した活性とリン酸化の持続傾向が観察された。細胞内シグナル経路を検討した結果、セロトニンによる CREB リン酸化反応は、刺激直後は CaMKIV と MAPK が、また MAPK は基礎レベルの CREB リン酸化も制御していることが示唆された。このように大脳皮質初代培養神経細胞で、モノアミン類によって CaMKIV の活性化と CREB リン酸化反応が上昇することが、初めて示された。

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 4 件）

(1) Bhuiyan MS, Takada Y, Shioda N, Moriguchi S, Kasahara J, Fukunaga K. Cardioprotective effect of vanadyl sulfate on ischemia/reperfusion-induced injury in rat heart in vivo is mediated by activation of protein kinase B and induction of FLICE-inhibitory protein: *Cardiovascular Therapeutics* **26**: 10-23 (2008)

(2) Tardito D, Tiraboschi E, Kasahara J, et al. Reduced CREB phosphorylation after chronic lithium treatment is associated with down-regulation of CaM kinase IV in rat hippocampus *International Journal of Neuropsychopharmacology* **10(4)**: 491-496 (2007)

(3) Lu YM., Shioda N., Han F., Moriguchi S., Kasahara J, Shirasaki Y., Win ZH. and Fukunaga,

K. Imbalance between CaM kinase II and calcineurin activities impairs caffeine-induced calcium release in hypertrophic cardiomyocytes. *Biochemical Pharmacology* **74(12)**: 1727-1737 (2007)

(4) Bhuiyan MS., Shibuya M., Shioda N., Moriguchi S., Kasahara J., Iwabuchi Y. and Fukunaga K. Cytoprotective effect of bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) on myocardial ischemia/reperfusion injury elicits inhibition of Fas ligand and Bim expression and elevation of FLIP expression. *European Journal of Pharmacology* **571(203)**:180-188 (2007)

〔学会発表〕(計4件)

(1) 笠原二郎、長井智史、澁谷正俊、荒木令江、岩渕好治、福永浩司 バナジウム化合物とメラトニンによるドパミン神経障害の保護効果 第31回神経科学大会 2008年7月11日 東京

(2) 笠原二郎、阪上洋行、福永浩司 マウス脳における抗うつ薬慢性投与によるカルモジュリンキナーゼIVの活性化とCREBリン酸化反応 第81回日本薬理学会年会 2008年3月17日 横浜

(3) Kasahara J., Fukunaga K. and Sakagami H. Requirement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV)-activity for the effects of antidepressants in mouse brain. *Society for Neuroscience 2007* 2007年11月7日 アメリカ合衆国・サンディエゴ

(4) 笠原二郎、阪上洋行、近藤尚武、福永浩司 マウス脳におけるCaMKIV活性は抗うつ薬の効果発現に必要である 第73回日本生化学会東北支部会例会 2007年5月12日 仙台

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 笠原 二郎

(KASAHARA JIRO)

東北大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号: 10295131

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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10件)

- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

〔学会発表〕(計5件)

- ①
- ②
- ③

〔図書〕(計2件)

- ①
- ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□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◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：