

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19731

研究課題名(和文) ミクログリアを標的としたうつ病治療に関わるストレス応答機構の解明研究

研究課題名(英文) Mechanisms of stress response relating to medication for depressive disorder focused on microglia

研究代表者

山脇 洋輔 (Yamawaki, Yosuke)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：90584061

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)：Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) がミクログリアの機能を調整するという仮説のもとで、Prip欠損マウスを用いて、炎症下におけるうつ病様行動に与えるPRIPの役割とその分子機構解明を行うことが本研究の目的である。PRIP欠損マウスはLPS投与により引き起こされる摂食量抑制に対して脆弱性を示した。PRIPは、視床下部ミクログリアにおけるAKT-IKK経路を抑制し、グリア細胞間の情報伝達を介した炎症性サイトカインの産生を制御することで脳内炎症を調節する分子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to elucidate the roles of phospholipase C-related catalytically inactive protein in psychological stress and inflammation-induced depression-like behavior, including anorexia focusing on microglia. Prip-deficient mice showed the vulnerability against LPS-induced anorexia. We revealed that PRIP inhibits AKT-IKK signaling in hypothalamic microglia and regulates the expression of pro-inflammatory cytokines in microglia communicating with astrocyte, which contributes to maintaining the CNS environment.

研究分野：薬理学

キーワード：炎症 ストレス脆弱性 ミクログリア うつ病様行動 PRIP

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病は抑うつ気分、興味・関心の喪失などの精神症状および睡眠障害、食欲低下などの身体症状を呈する疾患である。うつ病の発症には遺伝的要因・環境要因などによる個体のストレス応答性の亢進が関与していると考えられているが、ストレス応答性のメカニズムには不明な点が多い。

近年、うつ病などの精神疾患と炎症が密接に関係していることが明らかとなってきた。動物モデルを用いた研究において、強力な免疫誘導物質である lipopolysaccharide (LPS) の腹腔内投与により、全身炎症、脳内炎症とともにうつ病様行動と類似した "sickness behavior" が引き起こされる (Dantzer et al., *Nat Rev Neurosci.*, 2008)。また、慢性的なストレス負荷によりミクログリアの活性化や、脳内のサイトカインシグナルの増大と神経新生の低下を伴ってうつ病行動が出現することが報告された (Koo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, Tanaka et al., *J Neurosci*, 2012)。よって、炎症下におけるうつ病様行動に対して、ミクログリアの関連が示唆される。すなわち、炎症という観点からミクログリアに着目して、うつ病の病態解明を試みることは重要である。

これまでに、兼松らは phospholipase C (PLC) と構造的に類似しているが PLC 酵素活性を持たない分子である PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) を発見し、PRIP は  $\text{Ins}[1,4,5]\text{P}_3\text{-Ca}^{2+}$  シグナルを調整することを明らかとした (Harada et al., *J. Cell. Physiol.*, 2005)。脳内炎症の主たる脳内細胞であるミクログリアは  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な経路によって遊走・貪食機能を調整される (Kanazawa et al., *J. Biol. Chem.*, 2002)。PRIP はミクログリアに発現していることから、PRIP はミクログリアの機能を調整することで、ストレスおよび炎症刺激下におけるうつ病行動を調整するのではないかという仮説を立て、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PRIP がミクログリアの機能を調整するという仮説のもとで、*Prip* 欠損マウスを用いて、ストレスや炎症下でのうつ病様行動や脳内炎症におけるミクログリアの機能に対する PRIP の役割の解明を行うことである。

## 3. 研究の方法

本実験を遂行するに当たり、広島大学における動物実験に関する指針および遺伝子改変動物による指針に従った。

### 3-1: 薬物投与

マウス (9-12 週齢、雄性) に対して、lipopolysaccharide (LPS, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を腹腔内投与した。

### 3-2: 摂餌量の測定

摂餌量は指定時間に、餌の重量を測定し、1 時点前の餌の重量との差分を摂餌量とした。マウスを 1 匹/ケージになるように隔離し、7 日間の順化を行った。順化 5 日目と 6 日目に生理食塩水を腹腔内投与し、注射に対する順化を行った。7 日目に生理食塩水を投与し、24 時間の摂餌量を測定し各個体の control とした。摂餌量測定後、直ちに LPS を投与し、24 時間の摂餌量を再度測定した。

### 3-3: 視床下部からのミクログリアの単離

CD11b ビーズを用いた MACS 磁気細胞分離法によって、マウス視床下部からミクログリアを単離した。

### 3-4: 初代培養ミクログリアの単離

生後 48 時間以内のマウスの脳を取り出し、小脳と嗅球を除去したものをトリプシンと DNase I の存在下でインキュベートして単細胞化し、フィルターを通過したのち 75  $\text{cm}^2$  フラスコに播種し、2 日おきに培地を交換した。8 日目に、フラスコを振盪 (150 rpm, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 1 hr) 後、培地を回収し、35 mm dish に播種した。1 時間経過したのち、培地で洗浄し残存したものをミクログリアとして使用した。

### 3-5: 定量的 PCR 解析

視床下部から抽出した total RNA を逆転写することで得た cDNA を鋳型として、定量的 PCR 法によって遺伝子発現量を定量した。

### 3-6: Western Blot 解析

視床下部からタンパクを抽出し、SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転写させた。PVDF 膜をブロッキング後、一次抗体液中に浸して、低温下で一晩振とうした。翌日、2 次抗体を反応させ、発光試薬を用いて検出した。

## 4. 研究成果

### 4-1: 拘束ストレスおよび炎症による中枢機能障害に PRIP が与える影響

野生型マウス (WT) および *Prip* 欠損マウス (KO) に繰り返し拘束ストレス (1 日 2 時間、14 日間) を与えたところ、脳組織における TNF- $\alpha$  の遺伝子発現が亢進していたが、遺伝子型間における差は認められなかった。一方で、ストレス負荷により、KO マウスは WT に比べて顕著な体重の減少を示した。これらの結果から、PRIP はストレス負荷時の脳内炎症応答性を調整する分子である可能性が示唆された。次いで、PRIP が炎症下における摂餌行動を調整しているかを検討するため、LPS を投与した後、経時的に摂餌量を測定した。その結果、KO の LPS による摂餌量の低下は WT よりも大きかった。

### 4-2: 炎症応答性における PRIP の機能の分子

## 生物学的な解析

炎症時における摂餌量の低下には視床下部における炎症性サイトカインの発現を伴う signal transducers and activator of transcription 3 (STAT3) のリン酸化が重要であることが明らかとなっている (Yamawaki et al. *Am. J. Physiol.* 2010)。LPS 投与 2 時間後において、視床下部における炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) の遺伝子発現は両遺伝子型間において亢進し、その程度は KO の方が WT よりも大きかった。さらに、ミクログリアの活性化マーカーである ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) の遺伝子発現は KO において WT よりも高かった。加えて、視床下部における STAT3 のリン酸化も KO において亢進しており、またその持続時間も WT よりも長かった。CD11b ビーズを用いた MACS 磁気細胞分離法により、マウス視床下部から単離したミクログリアにおける炎症性サイトカインの遺伝子発現は、WT に比べて KO で高かった。これらの結果は、PRIP は視床下部ミクログリアにおいて炎症応答性を負に調整する分子であることを示している。

### 4-3: ミクログリアにおける PRIP の機能解析

初代培養ミクログリア細胞を用いて、PRIP が LPS 応答性に与える影響について検討を行った。初代培養ミクログリア細胞を LPS (10 ng/mL) で 30 分間刺激したところ、KO 由来のものにおいて、AKT、IKK $\alpha/\beta$  のリン酸化の顕著な上昇を観察した。一方で、主たる炎症シグナル分子である NF- $\kappa$ B のリン酸化は WT と KO の間で変化がなかった。またこれに一致して、LPS 刺激による炎症性サイトカインの遺伝子発現上昇も遺伝子型間で有意な差は観察されなかった。興味深いことに、アストロサイトとの共培養系を LPS で刺激し、回収したミクログリアにおいて、炎症性サイトカインの遺伝子発現が亢進していた。これらの結果はすなわち、ミクログリアとアストロサイトは PRIP を介して、脳内炎症を協調的に制御する分子であり、またその調節にはミクログリアにおける PRIP による AKT-IKK $\alpha/\beta$  経路の負の制御機構が重要であることを示すものである。

本研究において、PRIP はストレス負荷や炎症によるうつ病様行動の一つである摂餌量低下を制御する分子であることが明らかとなった。またこの制御には PRIP 依存的な AKT-IKK $\alpha/\beta$  経路の制御機構を介したグリア細胞間コミュニケーションが重要な役割を担うことが明らかとなった。

## 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 6 件)

1. Oue K, Yamawaki Y, Asano S, Mizokami A, Hirata M, Irifune M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein-knockout mice exhibit uncoupling protein 1 upregulation in adipose tissues following chronic cold exposure. *Journal of Oral Biosciences*. **59** 108-112 2017 (査読有り)

2. Hayashiuchi M, Kitayama T, Morita K, Yamawaki Y, Oue K, Yoshinaka T, Asano S, Harada K, Kang Y, Hirata M, Irifune M, Okada M, Kanematsu T. General anesthetic actions on GABAA receptors in vivo are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice. *Journal of Anesthesia*. 2017 *in press* (査読有り)

3. Yamawaki Y, Oue K, Shirawachi S, Asano S, Harada K, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein can regulate obesity, a state of peripheral inflammation. *Japanese Dental Science Review*. 2017, **53**(1):18-24 (査読有り)

4. Hosoi T, Yamawaki Y, Kimura H, Ozawa K. Immobilization stress-induced anorexia is mediated independent of MyD88. *Neuroreport*. 2016, **27**(13):974-7 (査読有り)

5. Oue K, Zhang J, Harada-Hada K, Asano S, Yamawaki Y, Hayashiuchi M, Furusho H, Takata T, Irifune M, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related Catalytically Inactive Protein Is a New Modulator of Thermogenesis Promoted by  $\beta$ -Adrenergic Receptors in Brown Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, **291**(8):4185-96 (査読有り)

6. Fuchikami M, Yamamoto S, Morinobu S, Okada S, Yamawaki Y, Yamawaki S. The potential use of histone deacetylase inhibitors in the treatment of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016, **64**:320-4 (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1. 山脇洋輔, 兼松隆. PRIP による脳内炎症が誘発する摂食抑制行動の調節  
第 58 回 歯科基礎医学会学術大会 2016 年 08 月 24 日-26 日 北海道/日本

2. Yamawaki Y, Shirawachi S, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein is involved in the neuroinflammation-induced anorexia. CINF 2016, July 3-5, Seoul/Korea

3. 山脇洋輔, 兼松隆. Gene expression analysis in microglia related in antidepressant-like effect of sodium butyrate. 第 57 回 歯科基礎医学会

2016年9月11日-13日,新潟/日本

4. 山脇洋輔, 兼松隆 Antidepressant-like effect of sodium butyrate relating to inhibition of microglial activation 第48回 広島大学歯学会総会, 2015年06月27日, 広島/日本

5. 山脇洋輔, 吉岡伯華, 西田美沙子, 村井彩佳, 兼松隆, 赤木宏行 Sodium butyrate ameliorates inflammation-induced depression-like behavior via inhibition of microglial activation. CINP 2015, June 3-5 2015, Dublin/Ireland.

〔図書〕(計1件)

兼松隆, 山脇洋輔: 編集-大浦清, 坂上宏, 戸苅彰史, 二藤彰, 永末書店, 山崎純ポイントがよくわかるシンプル歯科薬理学, 2017年, pp16-22

〔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

山脇 洋輔 (Yamawaki Yosuke)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号: 90584061

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )