

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07220

研究課題名(和文) 疲労によって誘導されるウイルス因子がうつ病発症に与える影響の解析

研究課題名(英文) Elucidate that fatigue-induced viral factors affect the onset of depression

研究代表者

岡 直美 (Oka, Naomi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00704503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6が疲労やストレス依存的に再活性化する際に発現する潜伏感染タンパク質Small protein encoded by the intermediate stage transcript of HHV-6 (SITH-1)が、うつ病の発症に関与するメカニズムを解明するために、SITH-1発現マウス(SITH-1マウス)を作製したところ、うつ病様行動およびストレス脆弱性を示した。SITH-1の発現は細胞内Ca²⁺濃度を上昇させるため、嗅球でアポトーシスが誘導され、海馬の神経新生が阻害され、HPA axisが異常亢進し、ストレス応答反応に異常が生じたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Small protein encoded by the intermediate stage transcript of HHV-6 (SITH-1) is a latent infected protein expressed by the human herpes virus (HHV-) 6 reactivated in a fatigue or stress-dependent manner. In order to elucidate the mechanism by which SITH-1 is involved in the development of depression, we created a SITH-1 expressing mouse model (SITH-1 mouse). SITH-1 mice showed depression-like behavior and stress vulnerability. Further studies showed that SITH-1 expression increased intracellular calcium concentration and subsequently induced apoptosis in the olfactory bulb, resulting in inhibition of hippocampal neurogenesis. Therefore, it is considered that SITH-1 mouse had a property of impaired stress response.

研究分野：ウイルス学

キーワード：うつ病 ウイルス ストレス 精神疾患 抗うつ薬

1. 研究開始当初の背景

うつ病はストレスに誘導される疾患であると考えられている。しかしその一方で、同程度のストレスにさらされても、「うつ病になりやすい」素因を持つ人と、そうでない人がいる。通常はこの様な場合、遺伝的因子の関与が考えられるが、うつ病は遺伝的な影響が少ないことが知られ、網羅的遺伝子研究によっても、原因遺伝子は見いだされていない。このため、うつ病の発症機構の解明には、遺伝的因子以外の「うつ病の素因」を見いだすことが重要であると考えられる。

遺伝的因子に代わる素因の原因として、最近、ヒトと共存する微生物(マイクロバイーム)が大きな注目を集めている。しかし、その研究のほとんどは、腸内細菌を中心とする細菌に関するもので、ウイルス性のマイクロバイームに関する研究は遅れていた。

HHV-6 は唾液中に大量に存在するウイルス性マイクロバイームで、最近、米国のグループによって唾液中の HHV-6 が嗅上皮のアストロサイトに潜伏感染することが報告されている。

2. 研究の目的

うつ病はストレスが原因の一つと考えられているが、ストレスによってうつ病を発症するかどうかは個人差が大きい。しかし、うつ病は遺伝的な影響が低いことが知られており、この素因がどのようにもたらされるかは不明である。我々は、アストロサイトで潜伏感染しているヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) が産生する潜伏感染タンパク質 SITH-1 を同定した。SITH-1 の産生は、うつ病患者の約 60%にみられるのに対し、健常人では 2.5%に留まっていた。また、SITH-1 を発現させたマウスはストレス脆弱性を示し、ストレス負荷によってうつ病様行動を生じ易いことを見いだした。本申請では、この SITH-1 を発現させた新規うつ病モデルマウスを用いて、うつ病の素因となるストレス脆弱性の分子機構とうつ病を発症する分子機構を解明する。さらに、新規うつ病モデルマウスで明らかにした分子機構がうつ病患者において見られるかどうかを検討し、患者でのうつ病発症機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

SITH-1 タンパク質がストレス脆弱性の誘導や、うつ病の発症に関与するメカニズムを解明するために、以下の検討を行う。

ストレス脆弱性の分子機構の解明：

SITH-1 マウスの脳内ストレス関連因子の遺伝子発現を解析し、ストレス脆弱性関連因子を特定する。

SITH-1 によって誘導されるうつ病の発症メカニズムの解明：

ストレスを負荷した SITH-1 マウスにおいて、うつ病患者で報告されている現象(BDNF の産生低下

など)の有無や、ストレス脆弱性関連因子の影響などを検討し、うつ病発症のメカニズムを明らかにする。

抗うつ薬の作用機序と効果の検証：

SITH-1 マウスのうつ病様行動を改善する抗うつ薬を特定し、ストレス脆弱性関連因子やうつ病発症メカニズムへの影響を検討する。さらに、抗 SITH-1 抗体陽性うつ病患者の治療に対するその抗うつ薬の有効性を後向き研究で検証する。

4. 研究成果

今回、SITH-1 マウスのストレス応答反応に異常が生じているか検討するために、SITH-1 マウスの脳から mRNA を抽出し、ストレス関連因子(コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)、REDD1、および カテニン)の発現量を測定した。その結果、SITH-1 マウスは対照マウスと比較して CRH の発現が高く、HPA axis が異常亢進していることが示唆された。さらに、REDD1 は SITH-1 マウスで有意に上昇していたが、カテニンおよび カテニンの安定性に関与する Axin2 の発現は変わらなかった(図 1)。

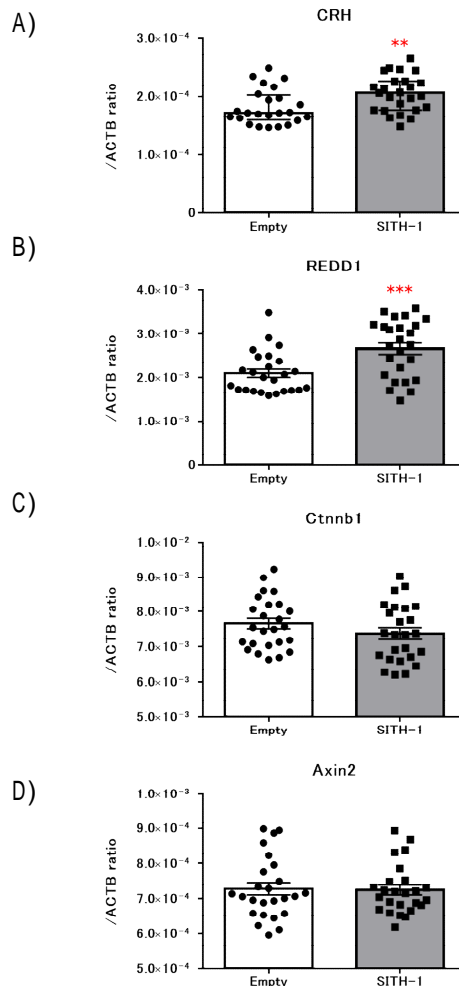


図 1. SITH-1 マウスおよび対照マウスの脳内遺伝子発現解析結果

脳の萎縮の有無を確認するために、脳組織切片のアポトーシス細胞を染色した結果、SITH-1 マウスの嗅球においてアポトーシス細胞が有意に多かった(図2)。この結果は、うつ病患者の嗅球萎縮と一致している。

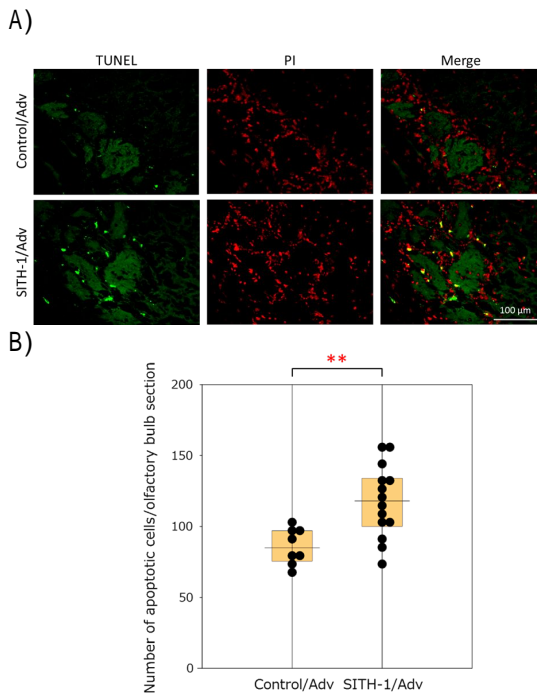


図2. SITH-1 マウスにおける嗅球のアポトーシス誘導
A)嗅球切片の TUNEL 染色(緑)および PI 染色(赤)を示している。B)TUNEL 陽性細胞数を計測してグラフ化した。統計学的有意差は Mann-Whitney U 検定を用いた。(** $P<0.01$)

さらに、海馬における神経新生を観察したところ、SITH-1 マウスの海馬神経新生は有意に抑制されていた(図3)。この結果は、嗅球切除マウスで海馬の萎縮が観察されるという報告と同じ現象が起きていると考えられる。

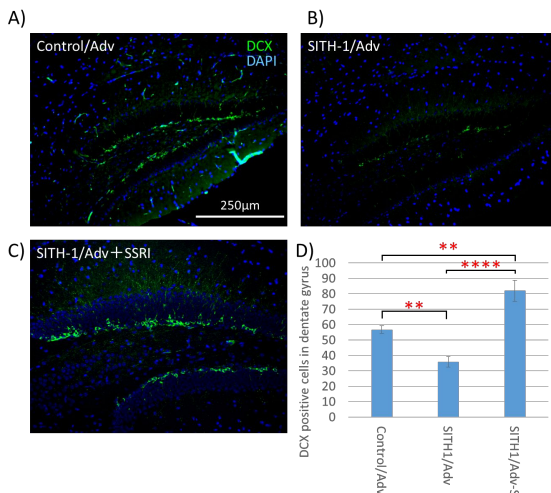


図3. SITH-1 マウスにおける海馬神経新生の

低下および SSRI 投与による回復
脳切片を用いて海馬神経新生細胞を抗 Doublecortin(DCX)抗体で緑色に染色した。青色は DAPI 染色。A)対照マウス、B)SITH-1 マウス、C)SSRI 投与した SITH-1 マウスを示している。D)DCX 陽性細胞数を計測してグラフ化した。統計学的有意差は多重比較検定 Fisher 最少有意差法を用いた。(** $P<0.01$, *** $P<0.0001$)

また、SSRI を 2 週間前から予め投与した後に、SITH-1/Adv を鼻腔投与した SITH-1 マウスの海馬神経新生数は改善されていた(図3)。このことから、SITH-1 タンパク質が原因となるうつ病には SSRI が有効であることが示唆された。

以上の結果から、SITH-1 マウスは嗅球でアポトーシスが誘導され、海馬の神経新生が阻害されるために HPA axis が異常亢進し、ストレス応答反応に異常が生じていたと考えられる。このメカニズムがストレス脆弱性を引き起こしていると考えられるため、ストレス応答反応に異常を生じていることが判別できるマーカーを探索した。しかし、ヒトでの測定に使用できる血液中 mRNA の遺伝子発現変化等を特定することはできなかった。

そこで、SITH-1 タンパク質の詳細な解析を進めた。その結果、SITH-1 タンパク質は内在性の Calcium modulating ligand (CAML) タンパク質と結合し、細胞内カルシウム濃度を上昇させることが明らかになった(図4)。

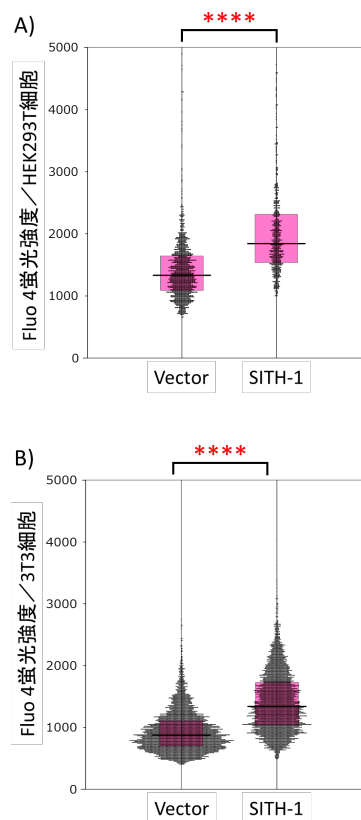


図4. SITH-1 発現細胞の細胞内カルシウム濃度
A) ヒト HEK293 細胞、および B) マウス 3T3 細胞に SITH-1 を発現させた時の Fluo 4 蛍光強度を示した。統計学的有意差は Mann-Whitney U 検定を用いた。 (**** $P<0.0001$)

さらに、SITH1-CAML 融合タンパク質を構築し、HEK293 細胞に発現させてその性質を検討したところ、細胞内カルシウム濃度が上昇した(図5)。

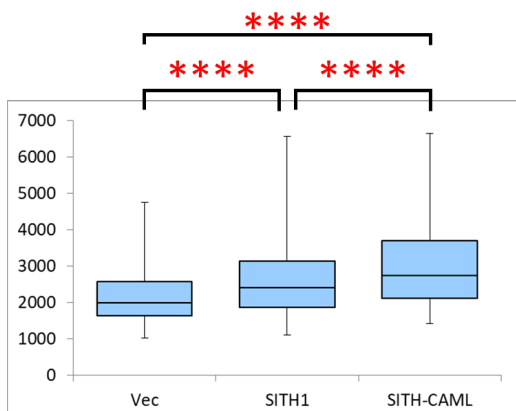


図5. SITH-1 および SITH1-CAML 融合タンパク質発現 HEK293 細胞の細胞内カルシウム濃度

ヒト HEK293 細胞に SITH-1 を発現させた時の Fluo 4 蛍光強度を示した。統計学的有意差は Mann-Whitney U 検定を用いた。(**** $P < 0.0001$)

従って、SITH-1 タンパク質は細胞内で発現すると SITH1-CAML 融合タンパク質様構造を形成し、CAML を恒常的に活性化することが示唆された。また、うつ病患者の血清を用いて抗 SITH1-CAML 抗体の有無を検証したところ、うつ病患者は抗 SITH-1 抗体よりも抗 SITH1-CAML 抗体を保持しており、陽性率は 78.8%であった。一方、健常者の抗 SITH1-CAML 抗体の陽性率は 3.6%であった(図6)。

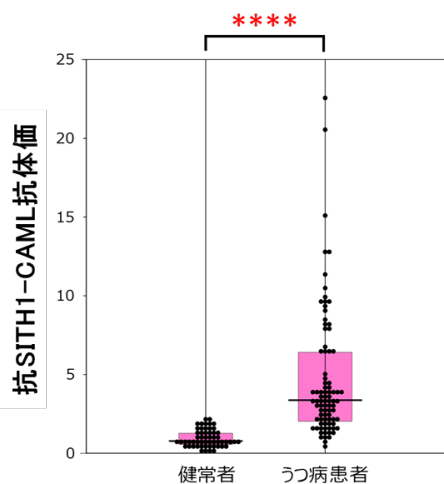


図6. 健常者およびうつ病患者血清中の抗 SITH1-CAML 抗体価

以上の結果から、SITH-1 タンパク質の発現が原因であるうつ病患者は全体の約 8 割であり、うつ病患者の中で SITH-1 タンパク質は SITH1-CAML 様構造を構築して細胞内カルシウム濃度を恒常的に上昇していることが示唆された。

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2件)

Ryo Aoki, Nobuyuki Kobayashi, Go Suzuki, Hirohiko Kuratsune, Kazuya Shimada, Naomi Oka, Mayumi Takahashi, Wataru Yamadera, Masayuki Iwashita, Shinichi Tokuno, Masashi Nibuya, Masaaki Tanichi, Yasuo Mukai, Keiji Mitani, Kazuhiro Kondo, Hiroshi Ito, Kazuhiko Nakayama.

Human herpesvirus 6 and 7 are biomarkers for fatigue, which distinguish between physiological fatigue and pathological fatigue. Biochemical and biophysical research communications 2016; 478(1):424-430. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.010.

Tamai M, Kobayashi N, Shimada K, Oka N, Takahashi M, Tanuma A, Tanemoto T, Namba H, Saito Y, Wada Y, Okamoto A, Ida H, Kondo K.

Increased interleukin-1beta and basic fibroblast growth factor levels in the cerebrospinal fluid during human herpesvirus-6B (HHV-6B) encephalitis. Biochemical and biophysical research communications 2017;486(3): 706-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.102.

〔学会発表〕(計8件)

岡直美、小林伸行、嶋田和也、高橋麻弓、近藤一博

唾液中に分泌された HHV-6 がうつ病を発症させるメカニズムの解明
第 12 回日本疲労学会総会・学術集会(横浜) 2016 年

最優秀発表賞受賞

小林伸行、青木亮、岡直美、高橋麻弓、嶋田和也、玉井将人、山寺亘、岩下正幸、倉恒弘彦、伊藤洋、中山和彦、近藤一博。

唾液中ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6 及び HHV-7 量による病的疲労と生理的疲労との鑑別に関する検討

第 12 回日本疲労学会総会・学術集会(横浜) 2016 年

岡直美、小林伸行、嶋田和也、高橋麻弓、近藤一博

疲労によって誘導されるウイルス因子が関与するうつ病発症メカニズムの解明

第 38 回生物学的精神医学会(福岡) 2016 年

嶋田和也, 小林伸行, 岡直美, 玉井将人, 高橋麻弓, 近藤一博.
CMV 潜伏タンパク質 ORF152 による先天性 CMV 感染症発症機序の解明
第 30 回ヘルペスウイルス研究会(府中) 2016 年

Shimada K, Kobayashi N, Oka N, Tamai M, Takahashi M, Kondo K.
Human Cytomegalovirus (HCMV) Latency-Associated Protein ORF152 Induces Pathogenesis of Congenital CMV Infection
The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (Sapporo) 2016 年

Nobuyuki Kobayashi, Ryo Aoki, Hirohiko Kuratsune, Naomi Oka, Mayumi Takahashi, Kazuya Shimada, Wataru Yamadera, Masayuki Iwashita, Hiroshi Ito, Kazuhiko Nakayama, Kazuhiro Kondo.
Human herpesvirus 6 (HHV-) and HHV-7 reactivation in fatigue, which distinguishes between physiological fatigue and pathological fatigue.
The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (Sapporo) 2016 年

岡直美, 小林伸行, 高橋麻弓, 嶋田和也, 近藤一博
唾液中に分泌された HHV-6 がうつ病を発症させるメカニズムの解明
第 13 回日本疲労学会総会・学術集会(名古屋) 2017 年

岡直美, 小林伸行, 嶋田和也, 高橋麻弓, 近藤一博
疲労によって誘導されるウイルス因子が関与するうつ病発症メカニズムの解明
第 39 回生物学的精神医学会(札幌) 2017 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: 疲労に関与する因子及びその利用
発明者: 近藤一博、小林伸行、岡直美
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2015/072887
出願年月日: 2016 年 11 月 21 日
国内外の別: PCT

名称: 気分障害を診断、治療又は予防する方法

発明者: 近藤一博、小林伸行、岡直美
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2016/089235
出願年月日: 2016 年 12 月 28 日
国内外の別: PCT

名称: 気分障害を診断、治療又は予防する方法
発明者: 近藤一博、小林伸行、岡直美
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 2016-529690、15/321884、15811939.6
出願年月日: 2017 年 1 月 5 日
国内外の別: JP, US, EP

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡直美 (OKA, Naomi)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00704503