

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07073

研究課題名(和文)新規神経栄養因子BDNF pro-peptideの作用機序と脳疾患関連の研究

研究課題名(英文)Role of the BDNF pro-peptide in brain functions and diseases

研究代表者

小島 正己(Masami, Kojima)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：40344171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：BDNF pro-peptideとうつ病の関係を検証した。最初にBDNFプロペプチドがヒトCSFに存在し、ウエスタンブロッティング法により簡便に検出可能であることを示した。次に、27人の統合失調症患者、18人の大うつ病性障害、および27人の健康な対照において、CSF濃度を調べた。男性と女性を別々に調べたところ、MDDの男性ではBDNF pro-peptideのCSF濃度が男性のコントロールよりも有意に低いことが見出された。しかしこの違いは女性の被験者では見出されなかった。これらの結果は、特に男性においてCSF中BDNF pro-peptideレベルの低下がMDDと関連することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中年男性の大うつ病患者において有意に低下している新規バイオマーカーを発見した。このマーカーはBDNF pro-peptideと呼ばれる脳および脳脊髄液に存在するペプチドであり、中年男性の大うつ病患者の脳脊髄液では健康人に比べて有意に減少していた。うつ病は日常生活や仕事の多忙や人間関係のストレス、さらには生活リズムの乱れなど生活習慣にも関係して発症する脳疾患である。本マーカーが働き盛りにある中年男性の大うつ病マーカーとして精神疾患研究分野の学術的意義、そして上記に記載した社会的意義をもたらすことが期待している。

研究成果の概要(英文)：We report that BDNF pro-peptide is present in human cerebrospinal fluid (CSF) and quantifiable by western blotting. We measured CSF BDNF pro-peptide levels in 27 patients with schizophrenia, 18 patients with major depressive disorder (MDD), and 27 healthy controls matched for age, sex, and ethnicity (Japanese). The ratio of the BDNF pro-peptide level to the total protein level in MDD patients was significantly lower than that in controls. When men and women were examined separately, males with MDD had a significantly lower BDNF pro-peptide/protein ratio than male controls; this difference was not found in female subjects. The ratio tended to be lower in male schizophrenia patients. Although we tried to measure the levels of mature BDNF in CSF, they were below the limit of detection of the ELISA and multiple analyte profiling technology.

研究分野：神経科学、精神医学

キーワード：神経 成長因子 うつ病 バイオマーカー 脳脊髄液 ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体内の成長因子の多くはその前駆体のプロセッシングにより活性型に変換されるが、その翻訳後メカニズムの詳細については十分に解明が進んでいなかった。申請者の研究グループは、神経栄養因子 BDNF の前駆体 proBDNF がプロテアーゼ切断を受けたとき、活性型 BDNF (図 1 白) と同時に産生されるプロセッシング副産物(図 1 黒)が内在的に存在することを見出しこの分子を BDNF pro-peptide と命名した (Mizui et al., PNAS, 2015)。

電気生理学の手法を用いて BDNF pro-peptide の活性を調べたところ、これまでに報告に一致して BDNF はシナプス伝達の長期増強(LTP; Long-term potentiation)を亢進するのに対して、BDNF pro-peptide はシナプス伝達の長期抑圧(LTD; Long-term depression)を亢進することがわかった。つまり、BDNF と BDNF pro-peptide の生理作用は異なりかつ相反することが示唆された。

これまでの BDNF 研究では、成熟型の BDNF に注目したものがほとんどであった (Park and Poo, *Nat. Neurosci. Rev.*, 2013)。しかし、前駆体のプロセッシングにより BDNF と BDNF peptide という異なる活性分子が同時に産生されることは、これまで数多く見出されてきた神経ペプチドと同様に、成長因子もその前駆体のプロセッシングにより活性型に限らず多様なサブタイプが産生される可能性を示唆する。

BDNF pro-peptide はヒト脳脊髄液、成体マウス脳組織で高濃度に存在しており、ヒト試料を用いたバイオマーカーの検証に注目した。

・BDNF pro-peptide の役割のまとめ

1. LTD を促進する (Mizui et al., PNAS, 2015)

急性スライス of 電気生理学的実験から BDNF pro-peptide が LTD を促進することを示した。

2. スパインを退縮させるためシナプス病態分子 (研究概要の項: 図 3 の黄色矢印)

バンカー法で調製した初代培養海馬神経細胞では、BDNF はスパイン密度を増加させるが BDNF pro-peptide はスパインを退縮させる (Mizui et al. in preparation)。

3. BDNF pro-peptide はマウス生後脳だけでなくヒト脳脊髄液中でも検出される。

特異的抗体を用いてマウス成熟脳での内在的存在を確認し (Dieni, Kojima et al., *JCB*, 2012)。ヒト脳脊髄液中に ng/ml の高濃度に存在することも確認した。

4. BDNF pro-peptide は TNF 受容体ファミリー分子 p75 を介して機能を発揮する

p75 受容体は、膜貫通型 TNF (Tumor necrosis factor) 受容体ファミリーに属してチロシンキナーゼのような活性ドメインを持たない。しかし、シグナル伝達を担う結合分子は多数同定されており、1) 神経軸索の伸長を含む分化の促進、生存維持作用、2) Nogo や MAG による中枢神経軸索の伸長の阻害、3) proBDNF によるアポトーシスの誘導などに関与する。

2. 研究の目的

BDNF pro-peptide が脳疾患の分子病態メカニズムにどの様に関わるのかは重要である。BDNF、proBDNF、BDNF pro-peptide の定量的測定系も作製済みであるため、本研究を通して新規ペプチド BDNF pro-peptide と脳疾患の関係の解明を目標とする。認知症やうつ病などの精神・神経疾患では、シナプス病態がその根底にあると考えられている (Zhou and Sheng, *Neuropharmacology*, 2013)。

そこで本研究では、BDNF と相反する活性を発揮する BDNF pro-peptide に注目して次の研究を行い、BDNF pro-peptide のシナプス可塑性における役割と脳疾患との関係の解明を目指す。

3. 研究の方法

申請者は脳脊髄液中の BDNF pro-peptide を簡便に検出する方法を確立している。また、BDNF pro-peptide がアルツハイマー病態脳において高発現していると最近報告された (Lim et al., *Human Mol. Genet.*, 2015)。国立精神神経治療研究センターから提供される脳脊髄液中の BDNF pro-peptide の濃度を決定し脳疾患との関連やバイオマーカーとしての役割を検証する。

具体的には、国立精神神経治療研究センターが収集した精神疾患患者および健康人の脳脊髄液サンプル中の BDNF pro-peptide の測定を行う。申請者らは BDNF pro-peptide を簡便に検出する方法を確立している。微量の脳脊髄液 (数十マイクロリットル) をウエスタンブロット法で BDNF pro-peptide を検出するだけであり、濃縮等の煩雑な処理は必要がないサンプル中の濃度は精製 BDNF pro-peptide の検量線から算出し、得られた結果をもとに統計学的解析を行い、脳脊髄液中の BDNF pro-peptide 濃度と精神疾患との関連を調べる。

4. 研究成果

脳脊髄液や血中に含まれる脳由来神経栄養因子 (BDNF) はうつ病患者で低下することが報告されてきたが、その結果を否定する論文も存在する。本研究では、BDNF pro-peptide とうつ病の関係を検証した。最初に BDNF プロペプチドがヒト CSF に存在し、ウエスタンブロット法により簡便に検出可能であることを確認した。次に、27 人の統合失調症患者、18 人の大うつ病性障害 (MDD) および 27 人の健康な対照において、CSF 濃度を調べた (年齢および性別が近い被験者を準備)。男性と女性を別々に調べたところ、MDD の男性では BDNF pro-peptide の CSF 濃度が男性のコントロールよりも有意に低いことが見出された ($p = 0.047$)。しかしこの違いは女性の被験者では見出されなかった。これらの結果は、特に男性において CSF 中 BDNF pro-peptide

レベルの低下が MDD と関連することを示唆している。BDNF pro-peptide は BDNF に比べて量的個人差が少なく測定も簡便であるため、今後はバイオマーカーとして臨床学的研究への応用を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizui T, Hattori K, Ishiwata S, Hidese S, Yoshida S, Kunugi H, Kojima M	4. 巻 113
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid BDNF pro-peptide levels in major depressive disorder and schizophrenia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Psychiatr Res	6. 最初と最後の頁 190-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpsychires.2019.03.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小島 正己、熊ノ郷晴子、水井利幸、石川保幸、上垣 浩一、広川貴次	4. 巻 18
2. 論文標題 BDNF Binds Its Pro-Peptide with High Affinity and the Common Val66Met Polymorphism Attenuates the Interaction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	6. 最初と最後の頁 E1042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms18051042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小島 正己、水井利幸、大平耕史	4. 巻 12
2. 論文標題 BDNF pro-peptide: a novel synaptic modulator generated as an N-terminal fragment from the BDNF precursor by proteolytic processing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 1024-1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.211173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kojima Masami, Otabi Hikari, Kumanogoh Haruko, Toyoda Atsushi, Ikawa Masahito, Okabe Masaru, Mizui Toshiyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Reduction in BDNF from Inefficient Precursor Conversion Influences Nest Building and Promotes Depressive-Like Behavior in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3984 ~ 3984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21113984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 M. Kojima
2. 発表標題 BDNF -a mastermind in the learning and memory-
3. 学会等名 IBRO-APRC Associate School (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 M. Kojima
2. 発表標題 Specification and diversification of functional control of BDNF by genetic polymorphism and post-translational mechanism
3. 学会等名 NIH Neuroscience Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小島 正己、水井利幸	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Vitamins and Hormones	5. 総ページ数 19-28
3. 書名 BDNF Propeptide: A Novel Modulator of Synaptic Plasticity	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 神経栄養因子に対する抗体	発明者 小島 正己、水井 利幸、赤澤 陽子、青木 智子、松井 この	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2018-002153	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

第24回 Hindgut Club Japan シンポジウム 奨励賞受賞

対象発表：松井このみ、水井利幸、塚原隆充、小島正己、BDNFプロセッシング障害が腸内細菌叢に与える影響の解析、2019、Hindgut Club Japan

産業技術総合研究所 論文賞 受賞

対象論文：Mizui et al., PNAS (2015)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----