

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K15759
研究課題名(和文) ストレス適応障害に関与するユビキチンリガーゼの同定とその制御による治療薬の開発

研究課題名(英文) Identification of ubiquitin ligase involved in stress-related adjustment disorder and development of therapeutic drug

研究代表者
宮岸 寛子 (MIYAGISHI, Hiroko)
日本大学・薬学部・助教

研究者番号：30642417
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体は、外界からのストレス刺激に対して適応するストレス適応機構を備えているが、この機構が破綻するとストレス性精神疾患の発症リスクが高まると考えられている。ストレスを負荷し、ストレス適応機構が破綻したマウス海馬では、ユビキチンリガーゼの一つであるNedd4-2のリン酸化が減少することが明らかとなった。ストレス負荷により増加するコルチコステロンを24時間曝露したマウス海馬神経細胞由来HT22細胞では、リン酸化Nedd4-2の発現量が減少した。以上より、ストレス適応機構の破綻には、海馬におけるNedd4-2のリン酸化の減少が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
うつ病等の気分障害や不安障害などのストレス適応機構の破綻と関連が深い精神疾患の患者数は、近年大幅に増加している。本研究結果より、ストレス適応機構の破綻にはユビキチンリガーゼNedd4-2のリン酸化の減少が関与することを示唆した。今後、この同定したユビキチンリガーゼを標的とする化合物を探索し、治療薬開発につなげていきたいと考えている。精神疾患の患者は、治療が長期間にわたるために社会生活に大きな困難が生じることが多い。そのため、ストレス性精神疾患病態メカニズムの解明に基づく治療法の確立は、患者自身のQOLを高めることにもつながると考える。

研究成果の概要(英文)：The ability to adapt to stress is an essential defensive function of a living body, and disturbance of this ability may contribute to some stress-related disorders. The expression level of phosphorylated Nedd4-2 (p-Nedd4-2) was decreased in the hippocampus of stress-maladaptive mice. Pretreatment with corticosterone down-regulated p-Nedd4-2 in a mouse hippocampal HT22 cells. These results suggested p-Nedd4-2 plays a pivotal role in the emotional abnormality in stress-maladaptive mice.

研究分野：薬理学

キーワード：ストレス ユビキチンリガーゼ コルチコステロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体は、外界からのストレス刺激に適応し、恒常性を維持するための生理機構(ストレス適応機構)を有しており、この機構の減弱や破綻が様々なストレス性精神疾患の発症に関与していると考えられている。これまでに、代表者が所属するグループでは、マウスに1時間の拘束ストレスを14日間慢性負荷することで、情動行動に異常が認められないストレス適応モデルマウス(適応マウス)並びに4時間の拘束ストレスを14日間慢性負荷することで、情動行動に異常が認められるストレス非適応モデルマウス(非適応マウス)を作り分けることに成功している。以前より、不安モデルである拘束ストレス負荷ラットの海馬では、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の濃度が上昇することが報告されている。細胞外グルタミン酸濃度の上昇によるグルタミン酸受容体の過剰な活性化は、神経細胞を傷害するため、その濃度はグルタミン酸トランスポーター(excitatory amino acid transporter; EAAT)により厳密に制御されている。代表者は、ストレス適応マウスと非適応マウスの海馬において、5種類のサブタイプが知られているEAATタンパク質の発現レベルを検討した。その結果、非適応マウスにおけるEAAT2の発現レベルのみが、適応マウスやコントロールマウスと比較して、顕著に減少することを見出し、ストレス適応機構の破綻のメカニズムに海馬におけるグルタミン酸の過剰が関与することを明らかにしている。近年、EAAT2はユビキチン修飾を受けることが報告されているが、ストレス負荷によりEAAT2におけるユビキチン化が変化するか、ユビキチン化の是正がストレス適応機構の破綻を改善するか否かについては不明なままである。ユビキチン修飾は、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンリガーゼの3種の酵素群の働きにより、ユビキチンリガーゼが選択的に識別する標的タンパク質に結合することで開始される。タンパク質に結合したユビキチンに次々とユビキチンが結合することでポリユビキチン鎖が形成され、プロテアソームによって認識され分解されることで、不要なタンパク質が除去される。ユビキチンリガーゼは多様性に富んだ酵素群であるが、構造的な違いから、HECT型、RING型、Uボックス型の大きく3つに分類される。興味深いことに、腫瘍関連領域では、ユビキチンリガーゼの役割が明らかにされ、Nutlin/R7112のようにユビキチンリガーゼをターゲットとした創薬例が存在するが、ユビキチンリガーゼをターゲットとしてストレス性精神疾患に対する治療効果を検証した例は皆無である。これらの学術的背景から、ストレス適応機構の破綻におけるユビキチンリガーゼの役割の解明が、ストレス性精神疾患の新規治療薬開発に繋がるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

生体は様々なストレス刺激に対する恒常性維持機構を有している。この機構の破綻は、ストレス性精神疾患の発症に直結することが知られているが、そのメカニズムについては未だ不明なままである。本研究では、ストレス適応機構の破綻に関与するユビキチンリガーゼの同定を行う。特に、代表者が所属するグループで開発したストレス適応および非適応モデルマウスを用いて、ユビキチンリガーゼのストレス適応機構の破綻に及ぼす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

実験には、6週齢のICR系雄性マウス(日本エスエルシー(株))を使用した。動物は恒温恒湿室(23±1°C、50±5%)にてプラスチックケース内で複数飼育し、7:00点灯、19:00消灯の12時間サイクルの明暗条件下で飼育した。なお、摂餌および飲水はともに自由とした。

(2) 適応マウスおよび非適応マウスの作製

ICR マウスに内径 3cm×全長 15cm の筒を用いて 1 時間あるいは 4 時間の拘束ストレスを 1 日 1 回負荷し、適応マウスおよび非適応マウスを作製する。拘束ストレス刺激(1 時間あるいは 4 時間)の単回負荷により誘発される種々のストレス反応が、慢性負荷により消失することをストレス適応の指標とし、依然としてストレス反応が認められることをストレス非適応の指標とした。

(3) 行動評価

ホールボード試験

新奇環境におけるマウスの探索行動を、自動ホールボード試験装置(model ST-1、室町機械(株))を用いて定量評価した。マウスを床面の中央から等距離に 4 か所穴(直径 3cm)を設けた灰白色角型のオープンフィールド(50×50×50cm)内に入れ、装置内でマウスが示す種々の探索行動を 5 分間測定した。各探索行動は装置の上方に設置したデジタルカメラおよび壁面に設置した赤外線センサーにより検出し、専用のデータ解析ソフト(comp ACT HBS、室町機械(株))を用いて数値化した。

高架式十字迷路

マウスの不安様行動を、高架式十字迷路試験装置(EPM-04M、室町機械(株)、日本)を用いて定量評価した。壁のない通路 open arms (30×6×0.3cm)と壁のある通路 enclosed arms(30×6×15cm)を床から 60cm の高位置に十字型に直行させた装置の交点(9×9cm)にマウスを置き、装置上を 5 分間探索させた。マウスの行動は装置の上方に設置したデジタルカメラにより検出し、移動距離、移動速度、open arms および enclosed arms 上での滞在時間、並びに open arms および enclosed arms への進入回数を専用のデータ解析ソフト Comp ACT HBS、室町機械(株)、日本)を用いて算出した。なお、すべての動物実験は国際医療福祉大学動物実験規定および日本大学動物実験内規に基づいて行った。

(4) 使用細胞

マウス海馬神経細胞由来の HT22 細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)を含む Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)で、5% Co2/95% air、37°C、加湿条件下のインキュベーター内で培養した。

(5) 細胞生存の評価

細胞の生死の評価には MTT 法を用いた。薬物処理終了後、MTT(250 µg/mL)を添加し、37°C、3 時間インキュベートした後、SDS 溶解液(50% dimethylformamide、20% SDS、pH4.7)を加えた。室温で一晩静置した後、マイクロプレートリーダー(SH-1000 Lab Microplate Reader, Corona Electric)により吸光度(吸光極大 570nm、Reference 640 nm)を測定した。

(6) タンパク質の発現解析

Western Blot 法

各処置後の脳部位および培養細胞は、RIPA buffer [150mM NaCl,1%NonidetP-40,0.5% Sodium deoxycholate,0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS),50mM Tris-HCl (pH8.0),1% TritonX-100,5mM EDTA]を用いて、細胞抽出液を作成した。2×Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories、USA)を用いて SDS 化した後、電気泳動を行った。電気泳動後、Immobilon™-P Transfer Membrane (millipore)に転写し、室温で 1 時間ブロッキングした。その後、各種一次抗体と 4°C一晩反応させ、二次抗体(JacksonImmuno research Laboratories)と室温にて 1 時間振盪した。Luminol Reagent (Santa cruz biotechnology)または ECL prime(GE Healthcare)により化学発光させ、目的とするタンパク質を Chemi Doc XRS(Bio-Rad Laboratories)にて検出した。

免疫組織化学染色法

クライオスタット (サクラファインテックジャパン(株))を用いて凍結させた脳組織より厚さ

30 μ m の脳切片を作成し 4°Cで一晩ブロッキングした。ブロッキング後は各種一次抗体を 4°Cで一晩反応させ、二次抗体を 2 時間インキュベートした。その後、Fluor Save Reagent (Calbiochem) にて封入し、共焦点顕微鏡 (FV1000、オリンパス(株)) を用いて観察した。

4 . 研究成果

(1)適応マウス、非適応マウスを用いた検討

1 日 1 回 1 時間あるいは 4 時間の拘束ストレス刺激負荷による行動変化

マウスの経日的な行動変化を確認するために、1 日 1 時間のストレス負荷を 1、3、7、14 日間、または 1 日 4 時間のストレス負荷を 1、3、7、14 日間行った。マウスにストレスをかけた後、ホールボード試験および高架式十字迷路試験を行った。ホールボード試験では、ストレス負荷 1 時間のマウスにおいて、負荷 1 日の群で非ストレス群と比較して、穴のぞき回数は減少した。しかし、日数の経過とともにこの回数は増加し、負荷 14 日間では非ストレス群と同程度となった。一方、ストレス負荷 4 時間のマウスでは、負荷 1 日の群では非ストレス群と比較して減少し、その後日数が経過しても減少したままであった。高架式十字迷路試験においても、ストレス負荷 1 時間のマウスにおいて、負荷 1 日の群では非ストレス群と比較して open arms 滞在時間割合が減少していた。負荷 3 日間と 7 日間のマウスの open arms 滞在時間割合は、負荷 1 日の群とほぼ変わらなかったが、負荷 14 日間のマウスでは大きく増加し、非ストレス群と同程度まで増加した。ストレス負荷 4 時間のマウスでは、負荷 1 日の群において open arms 滞在時間割合は非ストレス群と比較して減少し、その後日数が経過しても減少したままであった。

適応および非適応マウスにおけるユビキチンリガーゼタンパク質の発現変化

EAAT2 は、ユビキチンリガーゼの 1 つである neural precursor cell expressed developmentally down-regulated (Nedd) 4-2 によりユビキチン化されることが報告されている。そこで、Nedd4-2 の発現量を検討したところ、非ストレス群、適応マウス、非適応マウスの海馬、大脳皮質において、変化は認められなかった (Fig.1AB)。Nedd4-2 は 342 番目の Ser や 448 番目の Ser などの複数のアミノ酸残基がリン酸化されることが知られている。そこで、Nedd 4-2 リン酸化体の p-Nedd4-2 (Ser342) と p-Nedd4-2 (Ser448) の発現量の変化を Western blot 法で検討した。その結果、p-Nedd4-2 (Ser342) の発現量は、非適応マウスの海馬において減少した (Fig.1AC)。一方、適応マウスの海馬において変化は認められなかった (Fig.1AC)。また、p-Nedd4-2 (Ser448) の発現量は、非適応マウス、適応マウスの海馬いずれにおいても変化が認められなかった (Fig.1AD)。さらに、大脳皮質を用いて検討を行ったが、大脳皮質においては p-Nedd4-2 (Ser448)と p-Nedd4-2 (Ser342)の発現はストレス負荷によりともに変化が認められなかった。よって、ストレス適応機構の破綻には、海馬における p-Nedd4-2 (Ser342) の減少が関与する可能性が示された。

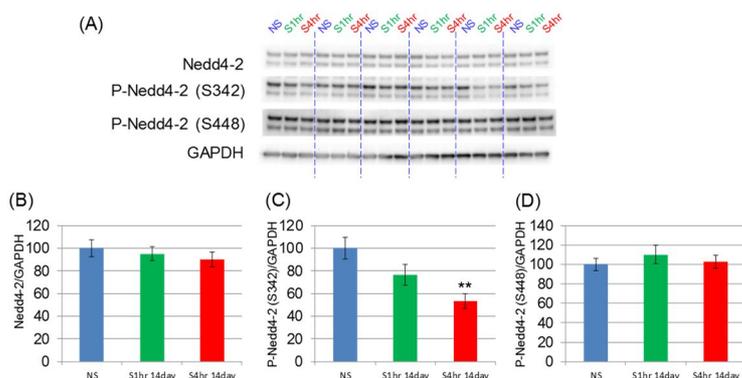


Fig.1 適応および非適応マウスの海馬における Nedd4-2、p-Nedd4-2 の発現量
非ストレスマウス (NS), 適応マウス (S1hr), 非適応マウス (S4hr)

マウス海馬におけるユビキチンリガーゼの発現分布

非適応マウス海馬において発現量の減少が認められた p-Nedd4-2 (Ser342)の発現分布を、免疫組織化学法を用いて検討した。マウス海馬において p-Nedd4-2(Ser342)抗体と GFAP 抗体を用いて共染色を行ったところ、p-Nedd4-2 (Ser342)と GFAP はほぼ共局在せず(Fig.2)、アストロサイトにおいて p-Nedd4-2 (Ser342) はほとんど発現していないことが示された。次に、p-Nedd4-2 (Ser342) 抗体と NeuN 抗体を用いて共染色を行ったところ、p-Nedd4-2 (Ser342)と NeuN は共局在し(Fig.2)、ニューロンにおいて p-Nedd4-2 が発現していることが示された。

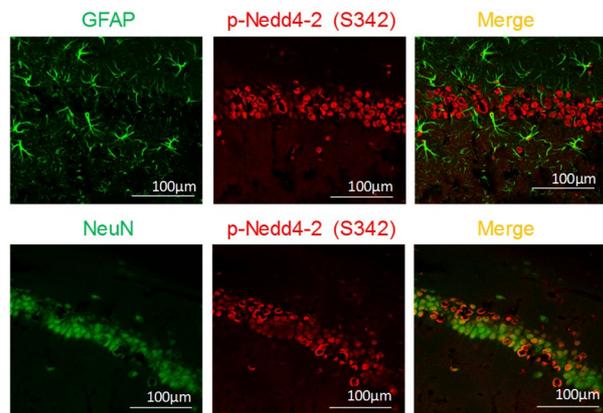


Fig. 2 マウス海馬のニューロンにおける p-Nedd4-2 (S342) の発現分布

(2) HT22 細胞を用いた検討

マウス海馬神経細胞由来の株化細胞である HT22 細胞を用いて、ストレス負荷により脳内で上昇することが知られているコルチコステロンが、神経細胞に及ぼす影響を検討した。高濃度のコルチコステロン (10 μ M 以上) の曝露は、HT22 細胞の生存率を有意に低下させたものの、3 μ M 以下の濃度では生存率の低下は認められなかった。また、この細胞毒性を示さない濃度のコルチコステロンを 24 時間曝露した HT22 細胞では、p-Nedd4-2(Ser342)の発現量が減少した。一方、Nedd4-2 の発現レベルには顕著な変化は認められなかった。以上の結果より、ストレス負荷により増加するコルチコステロンは、海馬神経細胞の Nedd4-2 の活性化を制御する因子のひとつであることが示唆された。

まとめ

本研究の成果より、ストレス適応機構の破綻には、海馬における p-Nedd4-2 (Ser342) の減少が関与することが示唆された。併せて、ストレス負荷により増加するコルチコステロンは、海馬神経細胞の Nedd4-2 のリン酸化を制御し、Nedd4-2 の活性化に関与する因子のひとつである可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nango Hiroshi, Kosuge Yasuhiro, Yoshimura Nana, Miyagishi Hiroko, Kanazawa Takanori, Hashizaki Kaname, Suzuki Toyofumi, Ishige Kumiko	4. 巻 9
2. 論文標題 The Molecular Mechanisms Underlying Prostaglandin D2-Induced Neuritogenesis in Motor Neuron-Like NSC-34 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 934 ~ 934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9040934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyagishi Hiroko, Tsuji Minoru, Miyagawa Kazuya, Kurokawa Kazuhiro, Mochida-Saito Atsumi, Takahashi Kohei, Ishige Kumiko, Takeda Hiroshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Characterization of 5-HT1A receptor and transport protein KIF13A expression in the hippocampus of stress-adaptive and -maladaptive mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135082 ~ 135082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.135082	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 Kosuge Y, Kaneko E, Nango H, Miyagishi H, Ishige K, Ito Y.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Bidens pilosa Extract Administered after Symptom Onset Attenuates Glial Activation, Improves Motor Performance, and Prolongs Survival in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oxid Med Cell Longev.	6. 最初と最後の頁 1020673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/1020673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kosuge Y, Nango H, Kasai H, Yanagi T, Mawatari T, Nishiyama K, Miyagishi H, Ishige K, Ito Y.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Generation of Cellular Reactive Oxygen Species by Activation of the EP2 Receptor Contributes to Prostaglandin E2-Induced Cytotoxicity in Motor Neuron-Like NSC-34 Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oxid Med Cell Longev.	6. 最初と最後の頁 6101838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/6101838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 持田 (齋藤) 淳美, 宮川 和也, 宮岸 寛子, 黒川 和宏, 君島 秀尚, 辻 稔, 武田 弘志	4. 巻 24(1)
2. 論文標題 スコボラミン誘発健忘モデルマウスにおけるドコサヘキサエン酸-ホスファチジルセリン複合体製剤の学習記憶改善効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 国際医療福祉大学学会誌	6. 最初と最後の頁 33-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ohno Rintaro, Miyagishi Hiroko, Tsuji Minoru, Saito Atsumi, Miyagawa Kazuya, Kurokawa Kazuhiro, Takeda Hiroshi	4. 巻 216
2. 論文標題 Yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, enhances the anxiolytic effect of fluvoxamine and reduces cortical 5-HT 2A receptor expression in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 89 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2018.01.032	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 宮岸寛子、辻 稔、小菅康弘、石毛久美子、武田弘志
2. 発表標題 ストレス適応形成に關与するセロトニン5-HT1A受容体および輸送タンパク質KIF13Aの細胞内分布の変化
3. 学会等名 第142回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮岸 寛子, 小菅 康弘, 辻 稔, 武田 弘志, 石毛 久美子.
2. 発表標題 ストレス適応障害マウス海馬におけるユビキチンリガーゼの発現変化.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuhiro Kosuge, Toru Imai, Hiroshi Nango, Hiroko Miyagishi, Yoshihisa Ito, Kumiko Ishige.
2. 発表標題 MOLECULAR MECHANISM FOR THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF S-ALLYL-L-CYSTEINE AGAINST ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS-INDUCED NEURONAL DEATH.
3. 学会等名 2019 International Garlic Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小菅 康弘, 宮岸 寛子, 八木 沙英子, 高橋 裕也, 下村 晃子, 南郷 拓嗣, 石毛 久美子, 伊藤 芳久.
2. 発表標題 成熟ニンニク由来成分S-allyl-L-cysteineは慢性腎臓病モデルマウスにおける海馬のストレス増加を抑制する.
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田 弘志, 宮川 和也, 持田 (齋藤) 淳美, 宮岸 寛子, 黒川 和宏, 辻 稔.
2. 発表標題 HDAC阻害薬のストレス適応形成促進作用における脳内ヒストン修飾変化の網羅的解析.
3. 学会等名 第9回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川 和也, 持田 (齋藤) 淳美, 黒川 和宏, 宮岸 寛子, 辻 稔, 武田弘志.
2. 発表標題 胎生期ストレスが惹起する脳内ヒストン修飾変化の網羅的解析.
3. 学会等名 第9回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場 清香, 小菅 康弘, 三浦 基文, 櫻原 利佳, 南郷 拓嗣, 宮岸 寛子, 鳥山 正晴, 本橋 重康, 石毛 久美子
2. 発表標題 Methylphenidateの小胞体ストレス誘発細胞死に対する保護効果.
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮岸 寛子, 辻 稔, 齋藤 淳美, 黒川 和宏, 宮川 和也, 武田 弘志
2. 発表標題 ストレス適応および非適応モデルマウスの海馬における5-HT1A受容体および輸送タンパク質KIF13Aの細胞内分布の特徴.
3. 学会等名 第34回日本ストレス学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮岸寛子, 齋藤淳美, 大野凜太郎, 黒川和宏, 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志
2. 発表標題 ストレス適応障害にはEAAT2のユビキチン修飾が関与する
3. 学会等名 第33回日本ストレス学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮岸寛子, 辻 稔, 齋藤淳美, 黒川和宏, 宮川和也, 武田弘志
2. 発表標題 ストレス適応障害におけるexcitatory amino acid transporter 2のユビキチン修飾の関与
3. 学会等名 第137回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroko Miyagishi, Minoru Tsuji, Atsumi Saito, Kazuhiro Kurokawa, Kazuya Miyagawa, Hiroshi
2. 発表標題 Ubiquitination of EAAT2 is involved in the impairment of stress adaptation
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----