

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19790849  
研究課題名 (和文) 新規うつ病治癒メカニズム解明に向けたアストロサイトに発現する Ndr2 の機能解析  
研究課題名 (英文) Expression analysis of N-Myc downstream regulated gene 2 (Ndr2) using the embryonic spinal cord and the adult brain  
研究代表者  
高橋 弘 (TAKAHASHI KOU)  
国立精神・神経センター精神保健研究所・老人精神保健部・外来研究員  
研究者番号：20415582

## 研究成果の概要 (和文)：

Ndr2 の発現が、ラットへの抗うつ薬長期投与及び電気けいれん負荷で共通して減少することを明らかにしてきた。しかし、Ndr2 の中枢神経系での役割は、ほとんどわかっていなかった。本研究では、胎仔期脊髄及び成獣期脳において、Ndr2 が神経幹細胞及びアストロサイトに発現していることを明らかにした。Ndr2 が神経幹細胞の増殖やアストロサイトへの分化に関与する可能性が考えられた。

## 研究成果の概要 (英文)：

We have reported that the expression of Ndr2 was decreased after chronic antidepressant treatment and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. However, roles of Ndr2 in the central nervous system were poorly understood. In the present study, we demonstrated that the expression of Ndr2 was detected in neuronal stem cells and astrocyte in both the embryonic spinal cord and the adult brain. These results may indicate that Ndr2 involved in the mechanisms of proliferation and differentiation in neuronal stem cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理、抗うつ薬、アストロサイト、神経幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、うつ病の治癒メカニズムに関連する脳内分子システムを探索するために、抗うつ薬長期投与によりラット脳内で発現量が特異的に変化する遺伝子を **Differential Cloning** 法により探索してきた。次に、得られた cDNA をスポットした **microarray** を開発・発現解析し、**real time PCR** 法及び **western blot** 法による定量解析を行った。その結果、**Ndr2** (**N-Myc downstream regulated gene 2**) の発現が、薬物的うつ病治療法 (抗うつ薬投与) 及び物理的うつ病治療法 (電気けいれん負荷) で共通して減少していることが明らかとなった。さらにこの発現減少は、抗うつ薬の長期投与により起こることから、抗うつ作用の臨床効果発現時期と時間的に一致していることが示唆された。また、**Ndr2** は、うつ病モデル動物である慢性軽度ストレス負荷動物や **corticosterone** 投与動物で発現が上昇することが報告されている。これらのことから、**Ndr2** がうつ病の病態及び治癒メカニズムに深く関与している可能性が示唆されている。しかし、**Ndr2** の中枢神経系での役割は、ほとんどわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、**Ndr2** の中枢神経系での役割を明らかにすることを目的とした。そこで、胎仔期の脊髄及び成獣期の脳における、**Ndr2** 発現部位の検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 胎仔期での **Ndr2** 発現

Diethyl ether 麻酔下、胎生 14.5、16.5 日

のラット胎仔を摘出後、20% sucrose/ 4% paraformaldehyde で脱水し、クライオスタットにより 30  $\mu\text{m}$  の厚さで脊髄スライスを作製した。免疫染色は、浮遊法により行った。切片を、PBST (0.2% triton X-100) に 20 分間浸した。その後 blocking buffer (1% FCS/PBST) に浸し、室温で 1 時間静置した。1 次抗体は、guinea pig anti **Ndr2** antisera 1 : 500, rabbit anti glutamine synthetase antibody 1:1000 (Sigma) を用いた。一晩 4°C で静置後、PBST で洗浄を行った。次に 2 次抗体は、goat alexa fluor 488 anti rabbit antibody (Invitrogen) 1 : 500, goat alexa fluor 546 anti guinea pig antibody (Invitrogen) 1 : 500 を用いた。室温で 2 時間静置後、PBST により 3 回洗浄を行った。切片をスライドガラスに付着させ、共焦点レーザー顕微鏡により免疫染色像を得た。

### (2) 成獣期での **Ndr2** 発現

8 週齢のラットを sodium pentobarbital で麻酔後、灌流固定した。頭蓋を切開し脳を摘出後、20% sucrose/ 4% paraformaldehyde で脱水した。BrdU 投与サンプルは、BrdU (Sigma) を 150 mg/kg 腹腔内投与し、2 時間後に灌流固定を行った。クライオスタットにより 30  $\mu\text{m}$  の厚さでスライスを作製した。免疫染色は、浮遊法により行った。切片を PBS 中で 1 時間煮沸し、PBST に 20 分間浸した。その後、blocking buffer に浸し、室温で 1 時間静置した。BrdU 投与サンプルは、blocking 前に、2 M HCl に浸し 37°C で 30 分間静置後、sodium borate で中和した。1 次抗体は、guinea pig anti **Ndr2** antisera 1 : 500, mouse anti BrdU antibody (Roche) 1 : 1000, goat anti

doublecortin antibody (Santa cruz)1:100 を用いた。一晚 4°C で静置後、PBST により 3 回洗浄を行った。次に 2 次抗体は、goat alexa fluor 488 anti mouse antibody (Invitrogen) 1 : 500, goat alexa fluor 568 anti guinea pig antibody (Invitrogen) 1 : 500, donkey alexa fluor 488 anti goat antibody (Invitrogen), donkey Cy5 anti guinea pig antibody (Chemicon) を用いた。室温で 2 時間静置後、PBST により 3 回洗浄を行った。切片をスライドガラスに付着させ、共焦点レーザー顕微鏡により免疫染色像を得た。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胎仔期での Ndr2 発現

胎仔期の脊髄は、細胞種類特異的な領域が明らかにされており、細胞発生研究のモデルとして有用である。そこで、胎仔期の Ndr2 発現を免疫染色法により検討した。神経細胞が分化する胎仔期初期において、Ndr2 は細胞分裂が盛んな神経管内側に発現していることが明らかとなった。また、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが分化する胎仔期後期では、Ndr2 が神経管内側の神経幹細胞とアストロサイトの機能的マーカーであるグルタミン合成酵素陽性細胞に発現することが明らかとなった(図 1)。本研究により、うつ病治療メカニズムに関与する Ndr2 が神経幹細胞の増殖やアストロサイトへの分化に関与する可能性が考えられた。

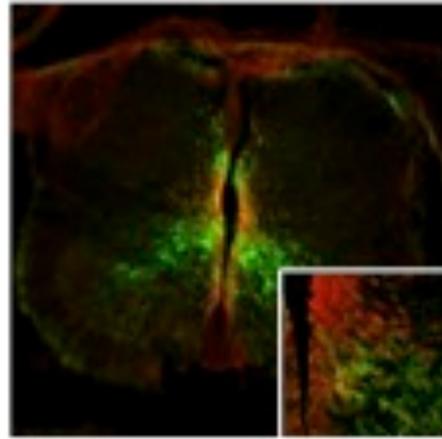


図 1 胎生 16.5 日脊髄の Ndr2(赤), Glutamine synthetase (緑)の免疫染色像。

##### (2) 成獣期での Ndr2 発現

近年、成獣においても、海馬歯状回の顆粒細胞下層(SGZ)及び側脳室下帯(SVZ)に神経幹細胞・前駆細胞が存在することが報告されている。そこで、成獣期の神経幹細胞・前駆細胞における、Ndr2 発現を免疫染色法により検討した。神経幹細胞・前駆細胞の同定は、細胞の増殖において DNA が合成される S 期に取り込まれる BrdU をラットに投与して、免疫染色法により行った。Ndr2 は、投与 2 時間後で BrdU 陽性細胞と共染色されたことより、成獣の SGZ 及び SVZ において神経幹細胞に発現していることが明らかとなった。また、アストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞と共染色された。一方、海馬において未熟な神経細胞のマーカーである doublecortin とは共染色されなかった。本研究により、うつ病治療メカニズムに関与する Ndr2 が成獣期においても神経幹細胞の機能に関与する可能性が考えられた。

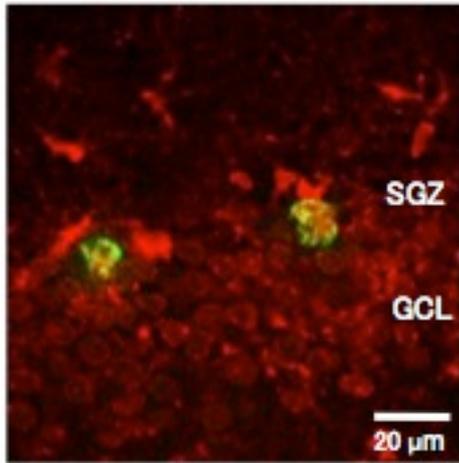


図2 ラット8週齢海馬のNdr2(赤), BrdU(緑)の免疫染色像。SGZ, subgranular zone; GCL, granular cell layer。

### (3)まとめ

近年、海馬の神経幹細胞の増加が抗うつ薬の作用の一つとして注目されている。海馬歯状回の神経幹細胞は、慢性ストレス負荷により減少する。さらに、抗うつ薬長期投与した動物では、神経幹細胞数の増加が報告されている。その神経幹細胞増加は、抗うつ薬長期投与の不安行動の評価である novelty suppressed feeding 行動に関与することが示唆されている。つまり、抗うつ薬の作用の一部に海馬神経幹細胞数の増加が関与することが考えられている。

本研究では、Ndr2 の胎仔期及び成獣期の発現を検討した。Ndr2 は、神経幹細胞及びアストロサイトに発現していることを明らかにし、中枢神経系で神経幹細胞の増殖やアストロサイトへの分化に関与していることが考えられた。Ndr2 は、うつ病の治療法の負荷により発現減少し、ストレスホルモン負荷により発現上昇する。今後、うつ病の病態及び治癒メカニズムにおけるNdr2の神経幹細胞に対する影響を検討することが望まれる。

## 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 Takahashi, K., Saitoh, A., Yamada, M., Maruyama, Y., Hirose, N., Kamei, J., and Yamada, M.: Gene expression profiling reveals complex changes in the olfactory bulbectomy model of depression after chronic treatment with antidepressants. *J Pharmacol. Sci.* 査読有 108(3), 320-334, 2008

② Yamada, M., Shida Y., Takahashi, K., Tanioka T., Nakano Y., Tobe T., and Yamada, M.: Prg1 is regulated by the basic helix-loop-helix transcription factor Math2. *J Neurochem.* 査読有 106(6), 2375-2384, 2008

③ Maruyama, Y., Yamada, M., Takahashi, K., Yamada, M.: Ubiquitin ligase Kf-1 is involved in the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 査読有 374, 737-741, 2008

④ Saitoh, A., Yamada, M., Yamada, M., Takahashi, K., Yamaguchi, K., Murasawa, H., Nakatani, A., Tatsumi, Y., Hirose, N., and Kamei, J.: Antidepressant-like effects of the delta-opioid receptor agonist SNC80 ([(+)-4-[(alphaR)-alpha-[(2S, 5R)-2, 5-dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperaziny]-3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide] in an olfactory bulbectomized rat model. *Brain research*

査読有 1208, 160-169, 2008

⑥ Yamada, M., Shida, Y., Takahashi, K. and Yamada M.: Induction of the transcription factor Math2 and its target gene Prg1 after chronic treatment with selective serotonin reuptake inhibitors in rat brain. J. Mental Health. 査読有 55, 103-109, 2009

⑥ Yamada, M., Takahashi, K., Ukai, W., Hashimoto, E., Saito, T. and Yamada M.: Neuroserpin is expressed in early stage of neurogenesis in adult rat hippocampus. Neuroreport. 査読有 21(2), 138-142, 2010

〔学会発表〕(計 5 件)

① 丸山良亮, 山田美佐, 高橋弘, 山田光彦: The RING finger domain of Kf-1 is required for ubiquitin ligase activity and subcellular redistribution. BMB2007, 横浜, パシフィコ横浜, 2007 年 12 月

② 志田美子, 高橋弘, 山田美佐, 中野泰子, 戸部徹 山田光彦: 抗うつ薬の作用メカニズムに関わる転写因子 ADRG701 が制御する下流遺伝子の探索. BMB2007, 横浜, パシフィコ横浜, 2007 年 12 月

③ Inagaki, M., Takahashi, K., Saitoh, A., Yamada, M., Iwai, T., Nakaani, A., Murasawa, H., Yoshida, M., Yamaguchi, K., Yamada, M.: A glutamate release inhibitor rapidly attenuates hyperemotional responses in OBX rats. The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Kyoto

International Conference Center, 2009, 11

④ Yamada, M., Yamada, M., Shida Y., Takahashi, K., Tanioka T., Nakano Y., Tobe T.: An antidepressant related transcription factor Math2 regulates Prg1 expression and involves in neurite differentiation. The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Kyoto International Conference Center, 2009, 11

⑤ Saitoh, A., Yamada, M., Takahashi, K., Iwai, T., Inagaki, M., Yamada, M.: Chronic treatment with a selective opioid-delta agonist SNC80 affects the expression of excitatory amino-acid transporter genes in frontal cortex of olfactory bulbectomized rat. The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Kyoto International Conference Center, 2009, 11

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nimh/rojin/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 弘 (TAKAHASHI KOU)

国立精神・神経センター精神保健研究所  
老人精神保健部 外来研究員

研究者番号 : 20415582

