

機関番号：20101  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591373  
 研究課題名 (和文) 神経新生とうつ病治療：末梢血因子と内在性神経幹細胞活性化による新治療戦略  
 研究課題名 (英文) Study on roles of neurogenesis and peripheral blood BDNF in depression.

研究代表者  
 橋本 恵理 (HASHIMOTO ERI)  
 札幌医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：30301401

研究成果の概要 (和文)：代表的な神経新生促進因子である BDNF が血小板に豊富に存在することに着目し、抗うつ薬が血小板 BDNF 遊離に与える影響を検討した。抗うつ薬によって血小板からの BDNF 遊離は促進され、うつ病モデルラットでこの遊離反応は TrkB 阻害薬で抑制されたことから、抗うつ薬の反応性に血小板 BDNF 遊離機能変化が深く関わることを示唆された。また、神経新生促進に関与する遺伝子として neuroserpine が神経新生の分化初期段階から重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We analyzed the influence of antidepressants on platelet BDNF release in rats. BDNF was dose-dependently released from platelets by direct treatment with various kinds of antidepressants in vitro. Sertraline-induced BDNF release from platelets was reduced in the presence of TrkB inhibitor, K252a in a rat model of depression compared with control rats. We also investigated neuroserpin expression in adult rat SGZ and found that neuroserpin may play some roles in early stage of neurogenesis in adult rat hippocampus.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経科学、脳・神経、うつ病、神経新生、BDNF、抗うつ薬、血小板、末梢血

## 1. 研究開始当初の背景

近年、抗うつ薬の慢性投与による海馬の神経新生の促進、ストレス負荷による神経新生の抑制、この神経新生抑制の抗うつ薬や電気痙攣処置による回復などが報告され、神経幹細胞からの神経新生の異常がうつ病の病態

に関与していることが示唆されている。我々は、難治性うつ病を含めたうつ病治療法の確立には従来のモノアミン仮説や受容体仮説とは異なる切り口での病態理解や治療戦略が必要と考え、うつ病の病態における神経幹細胞の役割に注目し、神経幹細胞や神経細胞

における細胞内情報伝達シグナル等の研究を重ねてきた。神経細胞の新生・生存や脳神経回路網の修復に関わる因子は、うつ病治療の分子標的となる可能性があり、これらの因子を用いて内在性神経幹細胞の活性化をはかることは、脳内神経回路網の再生を介した治療法につながることを期待される。また、これらの因子の末梢血における変動を検証することで、生物学的マーカーとしての可能性を評価することは、臨床応用へ結びつける点で大きな意義を有する。

## 2. 研究の目的

うつ病において障害された脳内神経回路網の再生という視点から、神経新生促進によるうつ病治療の新たな治療戦略を確立し、臨床応用へと結びつけることを目的とする。

(1) これまでに抽出した神経新生促進に寄与する候補因子を用いての内在性神経幹細胞活性化の臨床応用を目指す。特に、未だ明らかではない末梢血における BDNF (brain-derived neurotrophic factor: 脳由来神経栄養因子) の変動を検証することで、うつ病治療の観点から薬物反応性を含めた生物学的マーカーとしての可能性を評価する。

(2) 神経幹細胞の機能変化をより詳細に分子レベルで把握する試みとして、これまでに同定した ADRG (antidepressant related gene) [抗うつ薬長期投与によりラット脳内で発現が変化する遺伝子] をスポットした ADRG microarray を用いて、神経幹細胞の増殖・分化に関連する遺伝子をスクリーニングし、分化のどのステージに関与するか検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 生後 10 週の成体ラットから血液を採取し、血小板分画を得て調整した血小板に抗うつ薬 (sertraline, paroxetine, fluvoxamine, milnacipran) をそれぞれ添加し、その際の血小板からの BDNF 遊離の変化について検討した。BDNF の測定には BDNF ELISA Kit (R&D 社) を用いた。

(2) Corticosterone 慢性投与 (20mg/kg, 21 日間) によるうつ病モデルラットを作成し、血清 BDNF 濃度を対照群と比較した。(1) と同様の方法で、抗うつ薬を添加した際の血小板からの BDNF 遊離について対照群との比較検討を行った。

(3) 血小板からの BDNF 遊離機能のメカニズムの検討のため、TrkB 阻害薬である K252a を用いて BDNF-TrkB シグナル伝達を阻害した際の血小板からの BDNF 遊離変化を解析した。

(4) 神経新生促進に関する新規関連遺伝子の抽出のため、SD 系雄性ラット成熟脳スライス (Bregma より -3.30mm ~ -4.52mm) を作製し、laser capture microdissection 法により海

馬歯状回顆粒細胞層及びその外側部を切り出し、ADRG microarray を用いて部位特異的発現パターンを示す遺伝子の探索を行った。探索された遺伝子がコードするタンパク質発現の差異は免疫染色法により確認した。次に、上記の方法にて同定した neuroserpin と複数の機能タンパク質マーカーとの共局在を、蛍光免疫 2 重染色法により検討した。

## 4. 研究成果

(1) 抗うつ薬は cAMP-CREB カスケードを刺激し BDNF 発現を増加させるが、本研究では神経幹細胞から神経細胞への分化促進に寄与する因子としてこの BDNF に着目した。BDNF は脳内神経回路網の形成や発達およびその生存・維持に重要な役割を担うが、脳内のみならず末梢血中にも多く存在し、末梢血 BDNF の 80% 以上が血小板で貯蔵、放出される。うつ病患者において、血清 BDNF 濃度が健常者と比較して有意に減少していることや、抗うつ薬治療による症状改善に伴って血中 BDNF 濃度が上昇することなどが報告されており、うつ病患者における血清 BDNF 濃度の低下には、血小板からの BDNF 放出の減少が関与が考えられる。本研究ではこの血小板からの BDNF 遊離機能に着目し、抗うつ薬添加後の血小板からの BDNF 遊離を解析した。

抗うつ薬 [SSRI (sertraline, paroxetine, fluvoxamine), SNRI (milnacipran)] を成体健常ラットから得た血小板に添加することで、血小板からの BDNF 遊離が促進された (図 1)。また、この BDNF 遊離は、抗うつ薬の濃度依存的に ( $0.03 \mu\text{M} \sim 0.3 \mu\text{M}$ ) 増加することが確認された。Sertraline 添加時の BDNF 遊離変化を図 2 に示す。

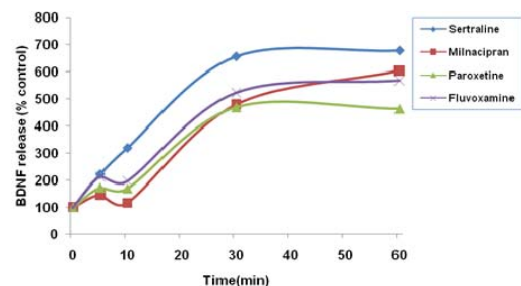


図 1. 各抗うつ薬添加時の血小板からの BDNF 遊離

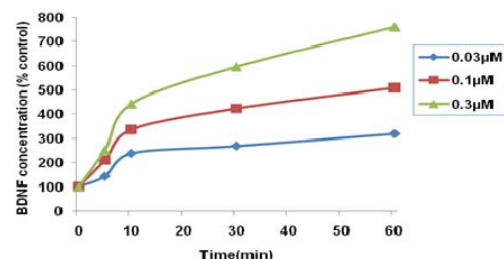


図 2. Sertraline 添加時の血小板からの BDNF 遊離変化

(2) うつ病モデルラットを用いた検討においては、対照群と比してモデルラット群では血清 BDNF 濃度の有意な減少を認めた(図3)。

また、うつ病モデルラット群、対照健康ラット群における、各抗うつ薬添加時の血小板 BDNF 遊離量を比較したところ、上記4種いずれの抗うつ薬によっても、モデルラット群においては対照群と比べて BDNF 遊離が有意に低下していた(図4)。SSRI と SNRI との間でこの結果に違いは認められなかった。

これらの結果から、抗うつ薬による血小板からの BDNF 遊離のメカニズムは、セロトニンやノルアドレナリンの再取り組み阻害の観点のみでは十分に説明できないと考えられ、他の因子の関与が示唆された。

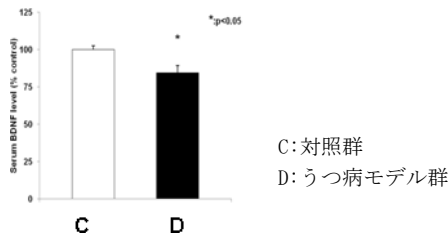


図3. うつ病モデルラットにおける血清 BDNF 濃度

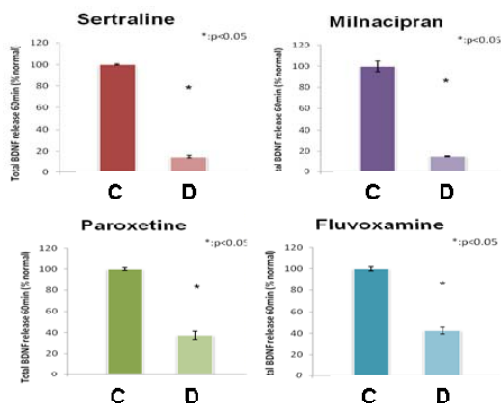


図4. 各抗うつ薬による血小板からの BDNF 遊離

(3) 抗うつ薬は神経細胞の TrkB に直接作用し TrkB の活性化を促すことが報告されている。血小板にはこの BDNF 受容体である TrkB が存在することから、血小板 TrkB が抗うつ薬による血小板からの BDNF 遊離変化に関わっていることが考えられる。そこで、TrkB inhibitor である K252a を用いて BDNF-TrkB シグナル伝達を阻害した条件で、抗うつ薬 (sertraline) 添加時の血小板からの BDNF 遊離を検討したところ、sertraline 単独処置と比べ、血小板 BDNF 遊離の有意な低下が認められた(図5)。

このことから、血小板 BDNF 遊離反応の機序には、BDNF-TrkB system の変化が関与していることが示唆された。

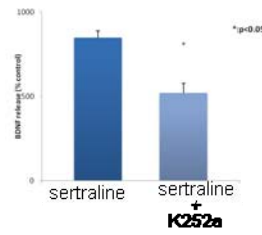


図5. 抗うつ薬 (sertraline) による血小板 BDNF 遊離に対する K252a の影響

よって、今後、血小板 BDNF-TrkB 経路を直接調節して血小板 BDNF 遊離を促すという観点からの検索を進めることによって、うつ病での血中 BDNF 濃度調整作用をもつ治療薬の開発へつながることが考えられる。また、血小板からの BDNF 遊離反応が、抗うつ薬への治療反応性の生物学的マーカーとして応用できる可能性が示唆された。

(4) ラット成熟脳海馬歯状回顆粒細胞層において、神経幹細胞が増殖し、分化することが報告されている。そこで、顆粒細胞層とその外側部における遺伝子発現変化を比較することにより、神経幹細胞の増殖・分化に関連する遺伝子をスクリーニングした。はじめに、抗うつ薬慢性投与によりラット成熟脳海馬歯状回顆粒細胞層の神経幹細胞数が増加することを確認した。このとき、神経幹細胞は顆粒細胞層の外側部には認められなかった(図6a)。次に、顆粒細胞層及びその外側部を laser capture microdissection 法により切り出した(図6b)。

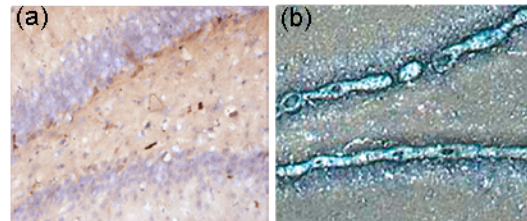


図6. 成体ラット海馬歯状回の神経幹細胞 (a) と laser capture microdissection 法による切り出し (b)

次に ADRG microarray を用いて部位特異的発現パターンを示す遺伝子の解析を行った結果、外側部に比べ顆粒細胞層において15遺伝子の発現増加、1遺伝子の発現減少が認められた。これらの遺伝子の中で、神経特異的に発現する機能分子であるセリンプロテアーゼ阻害因子 neuroserpin に焦点を絞って解析を進めた。Neuroserpin は顆粒細胞層外側部には発現せず、顆粒細胞層において高発現していることを確認した。また、神経分化マーカーの NeuN、未成熟神経細胞マーカー Tuj1 と共局在が認められたが、成熟神経細胞

マーカー-calbindin との共局在は認められなかった (図7)。

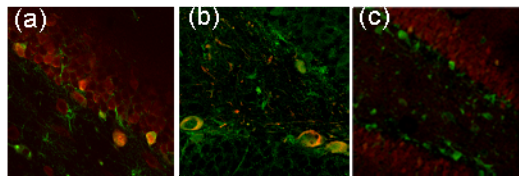


図7. 成体ラット海馬歯状回における neuroserpin と NeuN(a)、TuJ1(b)、calbindin(c) の蛍光免疫2重染色像

これまでに neuroserpin は、個体発生時において神経新生後期に発現し機能することが報告されている。しかし、今回の研究結果より、成熟脳においては神経新生の分化初期段階から機能を担っている可能性が示唆された。本研究により、うつ病の治療メカニズムには、これまで報告されている神経新生の過程の中の神経幹細胞の増殖に加えて、神経幹細胞から神経細胞への分化初期過程も重要であることが示唆された。

以上の結果から、神経新生を促進させる機構として、これまでに抽出した因子に加え、neuroserpin も神経新生の分化初期段階から重要な役割を担っていることが示唆された。また、代表的な神経新生促進因子である BDNF が中枢神経系においてのみならず末梢血中でも抗うつ薬処置にて変動し、血小板からの BDNF 遊離反応の機序には、BDNF-TrkB system の変化が関与していることが示唆された。よって、血中 BDNF 濃度調整作用をもつうつ病治療薬の開発にむけて、血小板 BDNF-TrkB 経路を直接調節して血小板 BDNF 遊離を促進させるという新たな視点が得られた。さらに、血小板からの BDNF 遊離反応が、薬物反応性の生物学的マーカーとして応用できる可能性が示唆された。

#### 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14件)

- ① Watanabe K, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Ono T, Tateno M, Watanabe I, Shirasaka T, Saito S, Saito T. Effects of antidepressants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release from platelets in the rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 査読有, 34, 2010, 1450-1454.
- ② Yamada M, Takahashi K, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Yamada M.: Neuroserpin is expressed in early stage of neurogenesis in adult rat hippo-

campus. NeuroReport, 査読有, 21, 2010, 138-142.

- ③ 橋本恵理、小野貴文、渡邊公彦、薬物と神経新生：向精神薬、Clinical Neuroscience, 査読無、26、2008、887-889.

[学会発表] (計30件)

- ① Saito T, Hashimoto E, Ukai W, Yoshinaga T, Ishii T, Tateno M, Ono T, Shirasaka T, Watanabe K, Watanabe I. Stem cell regulation as a new treatment strategy for alcoholism and other psychiatric disorders. In:[Symposium]: Alcohol and neuropsychiatric disorders. In: International Society for Biomedical Research on Alcoholism: 2010 Sep 13-16: Paris, France.
- ② Hashimoto E, Ishii T, Ukai W, Tateno M, Yoshinaga T, Watanabe K, Ono T, Watanabe I, Shirasaka T, Saito T. Dysregulation of neurogenesis in alcoholism and depression: possible approach to regulate neurogenesis by antidepressants in the damaged brain by ethanol. In: [Symposium]: Alcoholism and Depression: Possible Common Pathophysiology. In: The 1st Congress of Asia-Pacific Society for Alcohol and Addiction Research: 2009 Nov 12-14: Seoul, Koreae
- ③ Hashimoto E, Yoshinaga T, Ishii T, Ukai W, Tateno M, Ono T, Watanabe K, Watanabe I, Shirasaka T, Saito T. Potential regulation of neurogenesis by psychotropics in the damaged brain by ethanol. In:[Symposium]:Dysregulation of neurogenesis in the brain action: The common mechanism of alcoholism and depression. In: 9<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry: 2009 June 28-July 2: Paris, France.
- ④ Hashimoto E, Watanabe K, Ukai W, Watanabe I, Tsukamoto D, Saito S, Saito T. The possible role of BDNF as a tool for therapeutic interventions in psychiatric disorders. In: [Symposium]: The role of cytokine and brain-derived neurotrophic factor in psychiatric disorders. In: 2<sup>nd</sup> World Federation of Societies of Biological Psychiatry Asia-Pacific Congress and 30<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry: 2008 September 11-13: Toyama, Japan.

[図書] (計2件)

- ① 橋本恵理、齋藤利和、医学書院、気分障



害、2008、 pp561-566.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 恵理 (HASHIMOTO ERI)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30301401

### (2) 研究分担者

鵜飼 渉 (UKAI WATARU)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40381256

山田 美佐 (YAMADA MISA)  
国立精神・神経医療研究センター・精神  
保健研究所・研究員  
研究者番号：10384182

### (3) 連携研究者

渡邊 公彦 (WATANABE KIMIHIKO)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：70474493