

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790376

研究課題名（和文） ストレス脆弱性と抗うつに関わる中枢神経細胞内分子機構の基礎研究

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms related to the vulnerability and anti-depression in neurons.

研究代表者 笠原 二郎

(KASAHARA JIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10295131

研究成果の概要（和文）：

中枢神経細胞の核内に豊富に存在するカルモジュリンキナーゼ IV (CaMKIV) ノックアウトマウスに幼弱時母性隔離ストレスを負荷し、うつや不安に関連した行動評価を行った。その結果、ストレスを負荷野生型マウスにおける一部のうつ・不安関連行動の成績低下や、ノックアウトマウスにおける同様又はそれ以上の成績低下を見出した。またマウス初代培養大脳皮質神経細胞を用いてセロトニンに対する刺激応答を生化学的に検討したところ、セロトニン受容体活性化に伴って CaMKIV や MAPK (ERK) が活性化され、それに伴って転写因子 CREB リン酸化反応が上昇することを見出した。このような分子機構が、抗うつ薬の薬効発現やストレス感受性の調節に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

CaMKIV is a calcium/calmodulin-dependent protein kinase which is found abundantly in the nuclei of central neurons, and CaMKIV knock out mice showed attenuated sensitivity to antidepressants. I examined sensitivity to early life stress of this mice using maternal separation paradigm. In wild type C57BL/6 mice, some of the depression- and anxiety-related behaviors were deteriorated by the early life stress. In CaMKIV knock out mice with the early life stress, similar or even worse results were obtained in the same behavioral analysis. I also examined serotonin-induced CaMKIV activation using cultured cortical neurons of mice. Serotonin activated CaMKIV and MAPK/ERK, concomitant with increase of the phosphorylation of a transcriptional factor CREB, suggesting this mechanism is required for the effect of antidepressants and regulation of mood.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：うつ病モデル、神経新生、抗うつ薬、セロトニン、可塑性

1. 研究開始当初の背景

国内の自殺者は10年連続して3万人を超え、そのうち多くはうつ病に罹患していたと考えられる。またうつ病患者数は800万人近いと推定され、深刻な社会問題である。ストレス社会といわれる現代においては、罹患したうつ病を治療する方法はもちろんのこと、うつ病を予防するための方法論、すなわち効果的な生体内抗うつ機構の活性化方法を動物モデルなどによって研究し、結果をヒトに応用して一般社会に還元することが重要であろう。

うつ病の分子病態に関連して、成体神経新生 (Adult Neurogenesis) が近年注目されている。成体脳においても神経幹細胞が分裂して神経細胞に分化するこの現象は、側脳室下帯と海馬歯状回で観察される。齧歯類の海馬歯状回では、慢性ストレス下で神経新生が減少し、逆に抗うつ薬の慢性投与、走行回転車エクササイズ (Running-wheel exercise: RWE) や環境エンリッチメントなどにより神経新生が増加することが報告されており、海馬における神経新生率が、生体内抗うつ機構の活性指標となる可能性が考えられる。つまりこれを増加させる生体刺激はうつ病の予防や改善につながると期待される。ただし、RWEに抗うつ効果があるかどうかは賛否両論あり、結論は未だ不明である。また神経新生を抑制した状態でも環境エンリッチメントにより抗うつ効果が得られることから (Meshi et al., *Nat Neurosci* 2006)、必ずしも神経新生率増加だけが抗うつ機構活性化の要因とは限らないだろう。

申請者は最近、中枢神経細胞の核に豊富に存在するカルモジュリン依存性キナーゼ IV (CaMKIV) が、抗うつ薬の薬効発現と海馬神経新生の増加に深く関わることを見いだした。抗うつ薬の慢性投与は前頭皮質や辺縁系の CaMKIV 活性を基質である CREB リン酸化と共に上昇させ、逆に抗躁薬リチウムは CaMKIV 発現量を低下させた。また CaMKIV 欠損 (KO)

マウスの抗うつ薬感受性は顕著に低下し、抗うつ薬による神経新生率増加も見られなかった。これらは CaMKIV が中枢で抗うつ機構を担う分子であることを示唆するユニークかつ重要な報告である。もし CaMKIV を含む抗うつ機構を薬物に頼らずに活性化できれば、うつ病の予防や改善に有用であると考えられる。興味深いことに RWE による神経新生増加には、NMDA 受容体を介した脳由来栄養因子 (BDNF) の発現が関与しており (Kitamura et al., *Neurosci Res* 2003)、また BDNF は CaMKIV により発現制御される (Shieh et al., *Neuron* 1998)。過去に申請者は、海馬神経細胞で CaMKIV が NMDA 受容体を介して活性化されることを報告しており、RWE による神経新生増加には CaMKIV が関与する可能性がきわめて高い。他方、ストレス下において、この酵素や他の中枢シグナル分子がどのように変化するのか不明であり、解明が待たれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスによるストレス脆弱性モデルを利用し、ストレス負荷によって惹起される、うつ・不安関連行動の成績低下と神経新生率の変化が、RWE によって改善されるのかどうか、また抗うつに機能すると考えられる CaMKIV の欠損や活性化によってどのように変化するのかを、関連する詳細な分子機構と共に明らかにすることである。本研究は、マウス個体行動を解析する *in vivo* 実験と、初代培養大脳皮質神経細胞を用いた *in vitro* 実験を平行して行う。本研究により、うつ病の予防や行動療法の新たな方法論提案が可能になり、抗うつ機能に関わる中枢神経細胞内分子機構とその活性化機序が明らかにされることが期待される。

3. 研究の方法

(1) マウス母性隔離 (Maternal Separation: MS) ストレス脆弱性モデルと評価系

本研究におけるストレス脆弱性モデルに

は、MS ストレスを適用する。本モデルは子の成長後のストレス脆弱性を比較的再現性良く惹起し、また脆弱性は抗うつ薬により改善されるので (MacQueen et al., *Int J Neuropsychopharm* 2003)、本研究のような抗うつ機構の解析モデルに好適である。行動・神経新生率・生化学的パラメーターの評価には、申請者が既に CaMKIV-KO マウスの抗うつ薬感受性に関する先行研究で確立している方法を適用する。

(2) 回転車運動 (Running Wheel Exercise)

上述の MS 適用群および非 MS 群の野生型マウスに自発的 RWE を実施させ、行動・神経新生率・生化学的パラメーターの各成績に RWE が及ぼす影響を検討する。これにより、RWE に抗うつ効果があるのか、また脳のどこで CaMKIV 活性を変化させるのか、明らかにする。RWE は、ケージ内に設置した回転車背面のスポットをファイバーセンサーで検出する装置を自作してシーケンサにより制御し、回転数から走行距離を算出する。

(3) CaMKIV 遺伝子改変マウスにおけるストレス脆弱性の検討

(1)および(2)の MS-RWE 評価系を用い、CaMKIV-KO マウスを解析し、これらのマウスにおけるストレス脆弱性と RWE の効果を評価する。

(4) マウス初代培養大脳皮質神経細胞におけるセロトニン・ノルアドレナリンによる CaMKIV を介した細胞内シグナル伝達経路の解析

標記培養細胞を用いて、抗うつ薬によってシナプスにおいて上昇するセロトニンやノルアドレナリンによって刺激した際の CaMKIV や他の細胞内情報伝達経路に関わるプロテインキナーゼ活性を評価し、その下流の転写因子 CREB のリン酸化反応を検討する。基本的にウェスタンブロット法によって評価し、必要に応じて酵素活性の直接評価も行う。

4. 研究成果

平成21年度には、マウスを用いたストレス脆弱性モデルの確立を試みた。新生マウスに対して、生後3日目から17日目まで毎日午前3時間、母親と隔離する母性隔離ストレスを加えた。その後、生後4週目までは通常の哺育期間をおき、また離乳後は雌雄別に通常飼育で12週齢まで飼育した。情動関連行動の試験としては、オープンフィールド、高架式十字迷路、強制水泳、尾懸垂、新規性摂食抑制試験を行った。その結果、野生型マウスではうつ関連行動の有意な成績低下が認められ、このモデルの有用性が確認された。さらにCaMKIV ノックアウトマウスにおいても、野生型マウスと同等またはそれ以上の成績低下が示された。これらの行動実験の後に、試験動物の脳から前頭皮質・線状体・海馬・扁桃体を摘出して凍結保存し、研究協力者であるイタリア・ミラノ大学のMaurizio Popoli博士に送付し、プロテオミクスによる今後の解析を委託した。

また、自発的RWE負荷システムを構築するため、回転車、ファイバーセンサー、シーケンサ及びデータ収集装置、コンピューターからなるシステムを自作し、野生型マウスを用いて実験条件の確立を図った。

なお研究代表者は平成21年11月末日をもって東北大学を辞し、12月1日より徳島大学に異動した。

平成22年度には、新任地・徳島大学薬学部動物飼育施設においてノックアウトマウスコロニーの確立と実験系の再セットアップを行った。ところが5月に、同施設において他研究者が飼育する複数のマウスから肝炎ウイルス (MHV) が検出され、全飼育動物の殺処分を余儀なくされた。このため施設の消毒および再開作業を実施し、また前任地から凍結胚を取り寄せて8月から新たに個体化と増殖を行い、新たなコロニーを確立しつつ、実験系と実験条件の再確立を行った。

一方、細胞レベルでの詳細な分子機構を検

討するため、マウス大脳皮質初代培養神経細胞を用いてセロトニンによるCREBリン酸化反応を検討した。その結果、セロトニン刺激によって3型セロトニン受容体が活性化され、これが1分以内にCaMKIVの活性化とそれに引き続くCREBリン酸化反応の上昇を引き起こすことが示唆された。また刺激3分後のCREBリン酸化反応は、3型セロトニン受容体阻害薬オンダンセトロンで阻害されず、この時ERK/MAPKの活性化が起きていることから、CaMKIVの初期CREBリン酸化反応に引き続き、ERK/MAPKがCREBリン酸化反応に関与することが示唆された。このようなセロトニンによるCREBリン酸化反応が、抗うつ薬の薬効発現や、ストレス感受性の調節に深く関わってい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7件)

- (1) Takao K, Tanda K, Nakamura K, Kasahara J, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi N, Toyama K, Adachi M, Umeda M, Araki T, Fukunaga K, Kondo H, Sakagami H, Miyakawa T
Comprehensive behavioral analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV knockout mice. *PLoS One* 5:e9460. (2010) 査読有
- (2) Eto R, Abe M, Kimoto H, Imaoka E, Kato H, Kasahara J, Araki T. Alterations of interneurons in the striatum and frontal cortex of mice during postnatal development. *International Journal of Developmental Neuroscience* 28(5):359-370 (2010) 査読有
- (3) Abe M, Kimoto H, Eto R, Sasaki T, Kato H, Kasahara J, Araki T. Postnatal development of neurons, interneurons and glial cells in the substantia nigra of mice.

Cellular and Molecular Neurobiology 30(6):917-928 (2010) 査読有

(4) Yokoyama H, Yano R, Kuroiwa H, Tsukada T, Uchida H, Kato H, Kasahara J, Araki T. Therapeutic effect of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide against MPTP

(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)neurotoxicity in mice. *Metabolic Brain Disease* 25(2):135-143 (2010) 査読有

(5) Uchida H, Fujita Y, Matsueda M, Umeda M, Matsuda S, Kato H, Kasahara J, Araki T. Damage to neurons and oligodendrocytes in the hippocampal CA1 sector after transient focal ischemia in rats. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(7):1125-1134 (2010) 査読有

(6) Adachi M, Abe M, Sasaki T, Kato H, Kasahara J, Araki T. Role of inducible neuronal nitric oxide synthase in neurogenesis of the dentate gyrus in aged mice. *Metabolic Brain Disease* 25(4):419-424 (2010) 査読有

(7) Takemura M, Mishima T, Wang Y, Kasahara J, Fukunaga K, Ohashi K and Mizuno K. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-mediated LIM kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 28554-28562 (2009) 査読有

[学会発表] (計5件)

(1) 笠原二郎、横山宏典、矢野遼平、加藤宏之、荒木勉 MPTPモデルマウスにおけるパーキンソン病様症状に対するゾニサミドの治療効果 第84回日本薬理学会年会 2011年3月24日 誌上開催

(2) Kasahara J, Adachi M, Oomura K, Fukunaga K and Araki T. Serotonin

(5-HT)-induced CREB phosphorylation in the cortical neurons of mice Annual Meeting of SfN 2010 年 11 月 17 日 San Diego, USA

(3) 笠原二郎、安達みなみ、大村幸司、福永浩司、荒木勉 セロトニンによる CaMKIV と ERK を介した CREB リン酸化反応 第 33 回神経科学大会 2010 年 9 月 2 日 神戸

(4) 笠原二郎、大村幸司、安達みなみ、福永浩司、荒木勉 マウス大脳皮質初代培養神経細胞におけるセロトニンによる CREB リン酸化反応は CaMKIV と MAPK (ERK) を介する 第 83 回日本薬理学会年会 2010 年 3 月 17 日 大阪

(5) 笠原二郎、大村幸司、福永浩司 マウス大脳皮質初代培養ニューロンにおけるセロトニンによる CREB リン酸化反応 第 32 回神経科学大会 2009 年 9 月 16 日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者 笠原 二郎

(KASAHARA JIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：10295131