

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791134

研究課題名(和文) 抗うつ薬作用機序におけるエピジェネティックな役割の検討

研究課題名(英文) Analysis of the epigenetic regulation in the mechanism of antidepressants.

研究代表者

大舘 孝治 (OTUKI KOJI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10535256

研究成果の概要(和文)：本研究では、気分障害の病態解明を第一の目標とし、うつモデルマウスにおける GDNF 発現量低下と抗うつ薬投与による GDNF 発現量亢進に着目し、抗うつ薬の GDNF 発現亢進に対する選択性とその分子メカニズムをエピジェネティクスの側面から深く探究することを目的とした。動物実験における検討では、うつ病モデルマウスにて線条体で GDNF 発現量が低下し、ヒストン H3 アセチル化レベルの低下を認めた。それらの変化は抗うつ薬投与によって回復していた。培養細胞における検討では抗うつ薬は培養細胞(C6 cell)において GDNF 発現量を増加させ、GDNF プロモーター領域のヒストン H3, H4 のアセチル化レベルを増加させた。また、HDAC4 の過剰発現は抗うつ薬による GDNF 発現量増加を有意に抑制した。以上のことから、抗うつ薬はヒストン修飾を介して GDNF 発現量を増加させ、抗うつ効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously developed an animal model of depression: BALB/c mice exhibited the increase in depression-like behaviors and the decreased expression level of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in the striatum after a 6-wk of chronic ultra-mild stress episode. Importantly, the reduction of GDNF mRNA in the stressed BALB/c mice was reversed by chronic treatment with antidepressant imipramine. Therefore in this study, we aimed to clarify the molecular mechanism underlying the changes in the GDNF expression by antidepressants. First, we examined the effects of antidepressants, mood stabilizers, an anxiolytic drug and an antipsychotic drug on the expression of GDNF mRNA in C6 glial cells. The expression of GDNF mRNA was increased by all antidepressants used and valproate. Next, since the valproate has been known to act as a histone deacetylase inhibitor, we examined the effects of antidepressants histone acetylation. ChIP assay revealed that the levels of histone H3 and H4 acetylation at the GDNF promoter were enhanced by antidepressants. In addition, HDAC4 significantly decreased the transcriptional activity of GDNF promoter and inhibited the induction of GDNF expression by antidepressants. Thus, our data suggest that antidepressants increase transcriptional activity of GDNF gene through the modulation of histone acetylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子精神医学

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： antidepressant, GDNF, HDAC

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗うつ薬作用機序の分子メカニズム

抗うつ薬の作用機序として最もコンセンサスの得られているものに、脳内における栄養因子群の発現・機能調節があげられる。しかしながら、例えばBDNFの発現量は抗うつ薬に限らず、気分安定薬のバルプロ酸やリチウム投与でも増加することが知られており、BDNFの発現変化と抗うつ効果発現との関連には疑問が残っている。従って、抗うつ薬に対して特異的に反応する因子を同定することは、うつ病の病態解明のみならず、新規抗うつ薬の創薬につながる可能性が期待できる。

また最近、抗うつ薬のエピジェネティクスな作用に関心が集まっているものの、その詳細な分子機構は不明である。エピジェネティクスとは、DNA配列の変化を伴うことなく後天的な作用により変異が生じる機構であり、1) DNA塩基のメチル化による遺伝子発現の変化 2) ヒストンの化学修飾による遺伝子発現の変化が挙げられる。

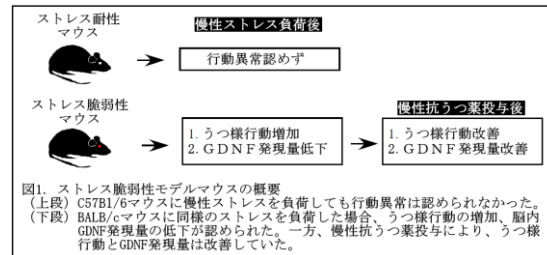
実際に、慢性ストレス負荷マウスや抗うつ薬を慢性投与したマウスにおいて、ヒストンタンパクのメチル化やアセチル化が変化することが報告されている。

(2) これまでの我々の研究成果、着想に至った経緯

我々はこれまでに「ストレス脆弱性モデルマウス」を確立した。具体的には、

- ① C57Bl/6 マウスはストレス耐性、BALB/cマウスはストレス脆弱性を有していた。
- ② 遺伝子発現解析により、慢性ストレス負荷後のBALB/cマウスにおけるグリア由来神経栄養因子(GDNF)発現量は無ストレス群に比して有意に低下していた。
- ③ 慢性抗うつ薬(イミプラミン)投与によりGDNF発現量は回復していた。

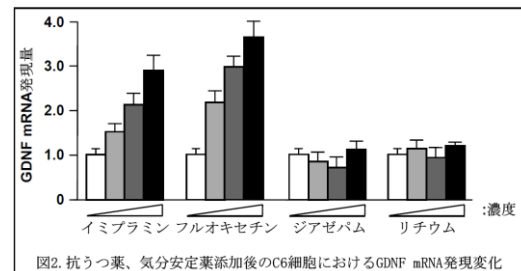
⇒ 以上の結果から、GDNFが慢性ストレスによるうつ状態の発現に関与していることが示唆された。(図1)



また、気分障害患者において GDNF mRNA 発現量の有意な低下を報告した(Otsuki et al., *J Psychiatr Res* 42, 1145-1153, 2008)。

さらに、培養細胞を用いた解析において、イミプラミンとフルオキセチン添加によってGDNF発現量は増加していたものの、リチウムやジアゼパムでは効果が認められなかった。

⇒ 以上の結果から、向精神薬の中でも抗うつ薬が選択的にGDNFの合成を誘導する可能性が示唆された。(図2)



2. 研究の目的

本研究では、気分障害の病態解明を第一の目標とし、うつモデルマウスにおける GDNF 発現量低下と抗うつ薬投与による GDNF 発現量亢進に着目し、抗うつ薬の GDNF 発現亢進に対する選択性とその分子メカニズムをエピジェネティクスの側面から深く探究することを目的とする。

具体的には、

- (1) 様々な向精神薬添加後のGDNF発現量を検討する。
- (2) 様々な向精神薬添加後のGDNF遺伝子プロモーター領域のヒストンアセチル化レベルの検討
- (3) 抗うつ薬によるGDNF発現量亢進に関与する候補因子として、ヒストンのアセチル化・脱アセチル化因子に着目し、その役割を分子生物学的手法を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 向精神薬添加後のGDNF mRNA発現量の解析

ラットC6細胞に以下の向精神薬を様々な濃度(3点以上)で添加し、リアルタイムPCR法によりGDNF mRNA発現量を定量解析する。

- ① 抗うつ薬: イミプラミン(三環系)、マプロチリン(四環系)、フルオキセチン(SSRI)、ベンラファキシン(SNRI)
- ② 気分安定薬: バルプロ酸、リチウム、カルバマゼピン
- ③ 抗不安薬: ジアゼパム
- ④ 抗精神病薬: ハロペリドール

(2) 向精神薬添加後のGDNF遺伝子プロモーター領域ヒストンアセチル化レベルの解析

向精神薬によるGDNF mRNA発現量亢進のエピジェネティックな作用の一端を解明するために、GDNF遺伝子プロモーター領域のヒストンアセチル化レベル(ヒストンH3、ヒストンH4)を検討する。

ヒストンタンパクがアセチル化されると下流の遺伝子の転写が活性化され、逆に脱アセチル化されると転写が抑制されて発現量が減少する。抗うつ薬添加後のGDNF遺伝子プロモーター領域のヒストンアセチル化レベルを検討することで、抗うつ薬のエピジェネティックな作用かを判断する。

具体的には、ラットC6細胞に向精神薬としてイミプラミン、フルオキセチン、バルプロ酸、リチウム、ジアゼパムを添加し、アセチル化ヒストンH3、及びH4抗体を用いたクロマチン免疫沈降法(ChIPアッセイ)によりそれらタンパクと結合しているゲノムDNAを精製する。得られたゲノムDNAとGDNF遺伝子プロモーター特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCR法により、アセチル化ヒストン量を定量解析する。

(3) 抗うつ薬のGDNF遺伝子プロモーターに対する作用機構の検討

(1)、(2)の結果から、ヒストンの脱アセチル化に関与するヒストン脱アセチル化酵素HDACs(HDAC1-11)に着目し、抗うつ薬との関連を検討する。具体的には、C6細胞に各HDACを過剰発現させたときに、抗うつ薬によるGDNF発現量増加が抑制されるか検討する。

(4) うつモデルマウスにおける検討

- ① ストレス脆弱性モデルマウス(BALB/cマウス)を用いた検討

慢性ストレス負荷後のGDNF遺伝子プロモーター上のヒストンアセチル化レベルを検討する。また、抗うつ薬投与後のストレス負荷マウスを用いて同様の検討を行う。

② ヒストンアセチル化関連因子発現量の解析

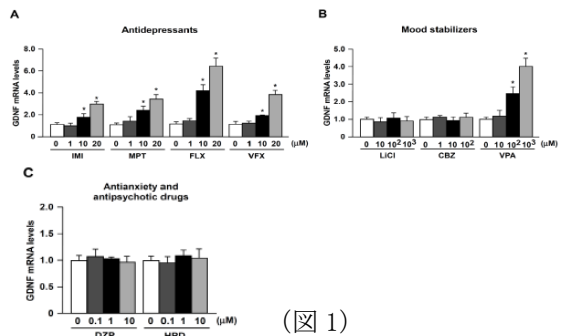
上記1の実験に関連して、ストレス負荷によりHDACsの発現が変化するか、リアルタイムPCR法により検討する。また、抗うつ薬投与後のストレス負荷マウスを用いて同様の検討を行う。

4. 研究成果

本研究では気分障害の病態解明を第一の目標とし、うつモデルマウスにおけるGDNF発現量低下と抗うつ薬投与によるGDNF発現量亢進に着目し、抗うつ薬のGDNF発現亢進に対する選択性とその分子メカニズムをエピジェネティクスの側面から深く探求することを目的としている。

(1) 向精神薬添加後のGDNF mRNA発現量の解析

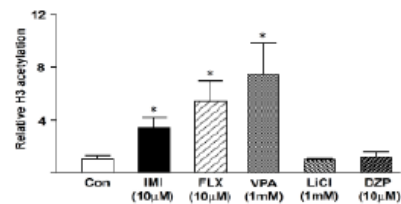
全ての抗うつ薬とバルプロ酸で有意なGDNF mRNA発現量の増加を認めたが、他薬剤では有意な変化は認めなかった(図1)。

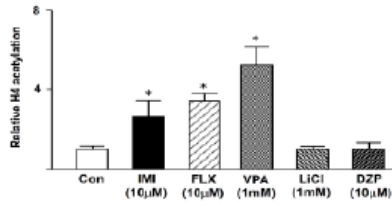


(図1)

(2) 向精神薬添加後のGDNF遺伝子プロモーター領域ヒストンアセチル化レベルの解析

ChIP assayによる解析を行ったところ、イミプラミン、フルオキセチン、バルプロ酸ではヒストンH3、H4において有意なアセチル化レベルの増加を認めたが、他薬剤では有意な変化は認めなかった。以上のことから抗うつ薬はヒストン修飾を介してGDNF mRNA発現量を増加させていることが示唆された(図2)。

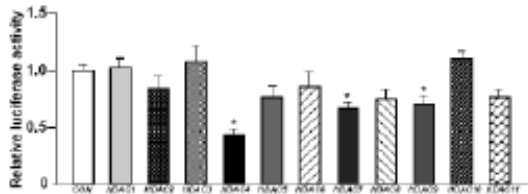




(図 2)

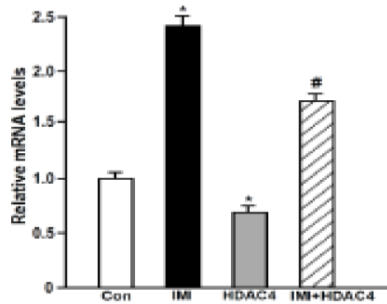
(3) 抗うつ薬のGDNF遺伝子プロモーターに対する作用機構の検討

レポーターアッセイを用いて検討した結果、HDAC4 が特に有意に GDNF プロモーター活性を減少させることが分かった(図 3)。



(図 3)

また、HDAC4 の過剰発現がイミプラミンによる GDNF mRNA 発現誘導を有意に抑制することも発見した(図 4)。

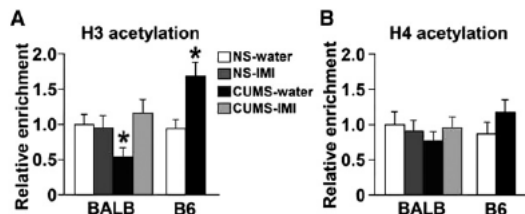


(図 4)

(4) うつモデルマウスにおける検討

4-1. ストレス脆弱性モデルマウス (BALB/cマウス) を用いた検討

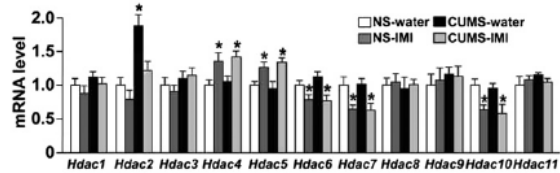
マウス線条体において、ストレス負荷群ではH3のアセチル化レベルが減少し、抗うつ薬投与にて回復していた。H4のアセチル化レベルには変化を認めなかった(図5)。



(図5)

4-2. ヒストンアセチル化関連因子発現量の解析

線条体において、ストレス負荷によりHDAC2が有意に増加し、抗うつ薬により回復していた。また、HDAC4は抗うつ薬投与により増加していた(図6)。



(図 6)

今後は①培養細胞を用いた実験系での抗うつ薬による HDAC4 を介した GDNF 発現調節の詳細なメカニズムの解明、②うつ病モデルマウスを用いて脳内側坐核における HDAC4 を阻害することでの、慢性ストレス負荷によって誘発されるうつ様行動に対する抗うつ薬の抑制効果への影響を検討することを予定している。

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 8 件)

- ① Higuchi F, Uchida S, Otsuki K, Hobara T, Abe N, Yamagata H, Shibata T, & Watanabe Y. State-dependent changes in the expression of DNA methyltransferases in mood disorder patients. *J Psychiatr Res, in press* (2011)
- ② Abe N, Uchida S, Otsuki K, Hobara T, Yamagata H, Higuchi F, Shibata T, & Watanabe Y. Altered sirtuin deacetylase gene expression in patients with a mood disorder. *J Psychiatr Res, in press* (2011)
- ③ Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Fujimoto M, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Abe N, Higuchi F, Shibata T, Hasegawa S, Kida S, Nakai A, & Watanabe Y. Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108, 1681-86. 査読有
- ④ Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Suzuki T, Miyata N, & Watanabe Y. (2011) Epigenetic status of *Gdnf* in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. *Neuron*, 69, 359-72. 査読有

- ⑤ Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Funato H, Hobara T, Otsuki K, Yamagata H, McEwen B.S, & Watanabe Y. (2010) Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J Neurosci*, 30, 15007-18. 査読有
- ⑥ Otsuki K, Uchida S, Wakabayashi Y, Matsubara T, Hobara T, Funato H, & Watanabe Y. (2010) Aberrant REST-mediated transcriptional regulation in major depressive disorder. *J Psychiatr Res*, 44, 378-84. 査読有
- ⑦ Hobara T, Uchida S, Otsuki K, Matsubara T, Funato H, Matsuo K, Suetsugi M, & Watanabe Y. (2010) Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. *J Psychiatr Res*, 44, 263-70. 査読有
- ⑧ Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Hobara T, Yamagata H, & Watanabe Y. (2010) Maternal and genetic factors in stress-resilient and -vulnerable rats: a cross-fostering study. *Brain Res*, 1316, 43-50. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Otsuki k. Antidepressants increase GDNF gene transcription through the histone modifications by HDAC4. 北米神経科学会 Neuroscience 2010.11.13 San Diego Convention Center, USA
- ② Otsuki k. Epigenetic regulation in depression. 第 32 回日本生物学的精神医学会シンポジウム 2010.10.07 リーガロイヤルホテル小倉, 福岡
- ③ Otsuki k. Antidepressants increase GDNF gene transcription through the histone modifications by HDAC4. 第 33 回日本神経科学会 2010.09.03 神戸コンベンションセンター, 兵庫
- ④ 大舘孝治 抗うつ薬はヒストンアセチル化を介して GDNF 遺伝子の転写活性を増加させる 第 39 回日本神経精神薬理学会

2009.11.14 京都 国立京都国際会館

- ⑤ Otsuki k. Antidepressant drugs increase transcriptional activity of GDNF gene via the histone modification. 北米神経科学会 Neuroscience 2009.10.21 McCormick Place convention center, USA
- ⑥ Otsuki k. Antidepressant drugs increase transcriptional activity of GDNF gene via the histone modification. 第 32 回日本神経科学会 2009.09.18 名古屋国際会議場, 愛知
- ⑦ 大舘孝治 抗うつ薬はヒストンアセチル化を介して GDNF 遺伝子の転写活性を増加させる 第 31 回日本生物学的精神医学会 2009.04.24 国立京都国際会館, 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大舘 孝治 (OTSUKI KOJI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10535256

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし