

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500291

研究課題名（和文） 海馬神経新生の制御による産後・周産期うつ病の治療法の確立

研究課題名（英文） Establishment of new therapy for the perinatal depression syndrome by regulation of adult hippocampal neurogenesis.

研究代表者

北島 康司 (KITABATAKE YASUJI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80506494

研究成果の概要（和文）：

うつ病は情動に障害をもたらす重要な疾患であるがその発症メカニズムはよく分かっていない。申請者は成体海馬における神経新生を制御する重要なファクターである sFRP3 に注目し、抗うつ薬作用において果たす役割について調べた。

抗うつ薬投与をうけたマウスの海馬では、sFRP3 発現量は速やかに低下し、その後数週間かけて徐々に回復する。また抑うつ行動に関する行動実験において、sFRP3 ノックアウトマウスは抗うつ薬投与を受けた野生型マウスと同じ表現型を示す。これらの結果は sFRP3 が海馬神経新生の制御を介して抗うつ薬の重要な作用点となっていることを強く示唆する。

研究成果の概要（英文）：

Although major depression is one of the leading causes of morbidity, its mechanisms are not well understood. Here we identified a Wnt signaling inhibitor, secreted frizzled-related protein 3 (sFRP3), as a molecular target of antidepressant treatments in rodent models. Neuronal activity decreases the expression of secreted sFRP3, and sFRP3 deletion activates various step of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. Furthermore, in tail-suspension and forced-swimming tests, which are reliable predictors of antidepressant potential, sFRP3 knockout mice showed significantly reduced levels of immobility compared to WT animals. Our studies identify a novel function of sFRP3 as an essential mediator of antidepressant actions in animal models. Targeting of sFRP3 may represent a novel therapeutic approach for depression treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

総合領域

科研費の分科・細目：

脳神経科学・神経科学一般

キーワード：

うつ病、海馬、神経新生

1. 研究開始当初の背景

うつ病は情動に障害をもたらす疾患であり、統合失調症とならんで最も重要な精神神経疾患のひとつである。日本でのうつ病の患者数はこの10年で2倍以上となっており、女性は男性の2倍以上も罹患率が高い。産後や更年期にはホルモンバランスの乱れによりさらに重いうつ症状に悩まされ、多くの女性が苦しめられている。

治療には選択的セロトニン/ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SSRI/SNRI) 等の抗うつ薬が使用されるが、眠気、口渇、注意・集中力の低下などの副作用が見られ、また若年者においては自殺願望を生じる可能性があることが報告されている。したがってより副作用が少なく、高い効果をもつ抗うつ薬の開発が望まれる。そのためにはうつ病の発症メカニズムならびに抗うつ薬の薬理作用、さらに女性ホルモンとの関連性を明らかにする必要がある。

うつ病の本態となる情動の形成・発現には大脳辺縁系が重要な役割を果たしている。とくに海馬はうつ病患者において委縮が見られることや、ストレス性刺激を受けた際に分泌されるグルココルチコイドに対する受容体が密に分布しているなど、その病態形成に大きく関与している。この海馬が脳の他の部位に比べて大きく異なる点は、成体においても神経が新生され続けている点である。海馬歯状回では常に新たな顆粒細胞が加えられ、神経回路の再構築が行われるとともに種々の病態の形成に関与していることが分かってきた。そして近年、

- 抗うつ薬の長期投与により、成体海馬の神経新生が活性化される
- 海馬神経新生を不活性化したマウスでは抗うつ薬投与による行動上の効果が消失する

という新たな発見がなされた。このことは成体海馬の神経新生が抗うつ薬の作用点として働いている可能性を強く示唆するものであり、その詳細なメカニズムの解明が求められている。

2. 研究の目的

申請者はこれまで成体海馬の神経新生と精神神経疾患との関連について研究を続けてきた。とくに神経新生を制御する重要な要素である Wnt 経路と分泌性 Wnt 阻害蛋白 sFRP に焦点を当て、sFRP3 が成体海馬に強く発現し、神経新生を制御する重要な因子であることを発見した。sFRP3 は神経新生を抑制しており、sFRP3 ノックアウトマウスでは(その脱抑制によって) 神経新生における増殖・移動・樹状突起伸長の各過程が促進されている。さらに注目すべきことは、sFRP3 の発現が神経活動依存性に厳密に調節されている

ことである。すなわち神経活動を活性化させることにより sFRP3 の発現量は約 50% まで減少し、Wnt 経路に対する脱抑制を介して神経新生が活性化される。このように sFRP3 は海馬歯状回における神経ネットワークの再構成を制御する鍵となる因子であることが明らかになった。

さらに申請者は、海馬がうつ病の病態形成の重要な部位であることに注目し、ストレスが成体神経新生を抑制し、また抗うつ薬の投与が神経新生を活性化すること、難治性うつ病患者において電気刺激療法が有効であることなどより、この sFRP3 が抗うつ薬投与時になんらかの役割を果たしているのではないかと考えた。

- 抗うつ薬の作用発現には成体海馬の神経新生の活性化が必須であること
- sFRP3 は海馬神経新生の活性を抑制していること
- 抗うつ治療により sFRP3 発現量が大きく減少すること

を考え合わせると、sFRP3 がうつ病治療の重要なターゲットである可能性が強く示唆される。そしてこれらの研究結果により「抗うつ治療は、sFRP3 の発現量減少を介し海馬の神経新生を活性化することによって、その抗うつ作用を起こす」という仮説を得た。本研究ではこの仮説に基づき、細胞レベルでの解析とマウスの行動実験を組み合わせることで詳細に検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 定量 RT-PCR

マウス脳から海馬を取り出し、ドライアイス上で速やかに凍結したのち QIAGEN RNeasy kit を用いて RNA 抽出をおこなった。逆転写反応により cDNA を作成し SYBR-green PCR master mix で反応させ、ABI PRISM 7900H sequence detection system を用いて mRNA 定量をおこなった。内部対照としては GAPDH を用いた。

GAPDH:

5'- GTATTGGGCGCCTGGTACC-3' (fwd)

5'- CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG-3' (rev)

sFRP3:

5'- CAAGGGACACCGTCAATCTT-3' (fwd)

5'- CATATCCCAGCGCTTGACTT-3' (rev)

いずれの反応も 3 回ずつ行い、sFRP3 の平均値を GAPDH の平均値で標準化を行った。

(2) BrdU ラベリング、免疫染色

BrdU(200mg/kg)を腹腔内投与し 2 時間後に固定。40um の組織を rat anti-BrdU (1:400; Accurate)により染色、共焦点顕微鏡を用いて発現の確認を行った。

(4) Electroconvulsive shock (ECS)

ECT unit Model 7801 を使用。ear clip をもちいマウスに電気刺激 (1.0 s, 100Hz, 13 mA stimulus of 0.3 ms square wave pulses) を投与。

(5) 行動実験

尾懸垂試験 (Tail-suspension test); 抗うつ薬/生食を 28 日間連日投与。最終投与後、尾を固定して 6 分間支持。そのうちの 4 分間で静止している時間を測定。

強制水泳試験 (Forced swimming test); 抗うつ薬/生食を 28 日間連日投与。最終投与後、水を入れた容器に 6 分間入れる。そのうちの 4 分間で静止している時間を測定。

Novelty-suppressed feeding test; 抗うつ薬/生食を 5 日間/28 日間連日投与。最終投与後エサをぬき、24 時間後にマウスを箱

(50x50x20cm) の隅に置く。中央部に餌をひとつおき、マウスが餌を食べるまでの時間を計測する。

(6) 浸透圧ポンプ

リコンビナント sFRP3(R&Dsystems)を浸透圧ミニポンプ (Alzet1002) に充填し 0.25ul/hr (120ng/day)でマウス脳室内に 14 日間投与する (posterior = 0.34 mm from Bregma, lateral = +1.0 mm, ventral = +3.0 mm)。

(4) sFRP3 ノックアウトマウス

sFRP3 ノックアウトマウスは Johns Hopkins 大学の J. Nathans 研究室において作成された。sFRP3 のエクソン 3 を LacZ カセットで置換するための targeting vector を作成、mouse ES 細胞内に注入。Homologous recombination を確認したのち C57BL/6 blastocyte に injection し、生まれてきたマウスを southern hybridization により確認した。C57BL/6 との 10 世代以上の backcross を行い、8-12 週齢の雄を実験に用いた。

4. 研究成果

(1) ECS による sFRP3 の発現抑制と神経新生への影響

抗うつ治療のひとつとしてヒトうつ病患者に用いられる電気ショックの影響をしらべるため、sFRP3 ノックアウトマウスおよび野生型マウスに電気ショック

(Electroconvulsion; ECS) の投与を行った。野生型マウスに ECS を投与すると、wt においては海馬神経新生が促進され、また速やかに sFRP3 の発現量が低下する。しかし sFRP3 ノックアウトマウスではこの ECS に

よる成体海馬神経新生への促進作用が消失することが分かった (Fig. 1-a, b)。このことより ECS の海馬神経新生への作用は sFRP3 を介していることが判明した。

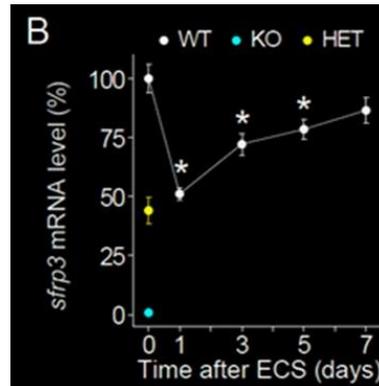


Fig.1-a, ECS 投与後の海馬での sFRP3 の発現量変化 (QRT-PCR)

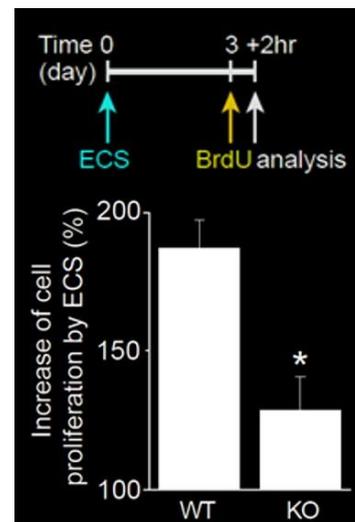


Fig.1-b, wt および sFRP3KO における、ECS 投与による細胞増殖率への影響

(2) 抗うつ薬の長期投与による sFRP3 発現量の変化

次に抗うつ薬投与による sFRP3 発現への影響を調べるために、wt マウスに抗うつ薬 (フルオキセチン, SSRI) を投与した後に海馬における sFRP3 発現量を RT-PCR および in situ hybridization により確認した。抗うつ薬投与の短期投与 (5 日間) および PBS の投与では sFRP3 の発現量は変化しなかったが、長期投与 (28 日間) により sFRP3 の発現量はコントロールの 60%に低下することが分かった (Fig 2-a,b)。

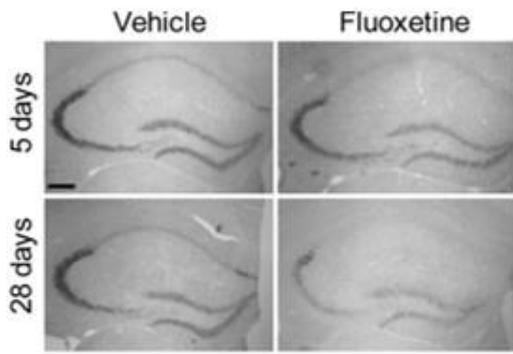


Fig.2-a. 抗うつ薬（フルオキセチン 20 mg/kg/day, i.p.）投与後の sFRP3 発現量変化 (in situ)

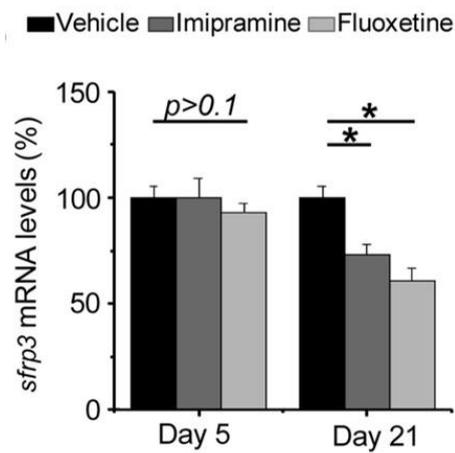


Fig.2-b 抗うつ薬（イミプラミン 20 mg/kg/day, i.p., フルオキセチン 20 mg/kg/day, i.p.）投与後の亜急性期（5日後）/慢性期における海馬での sFRP3 の発現量変化（RT-PCR）

(3) sFRP3 ノックアウトマウスにおける抗うつ行動の観察

さらに sFRP3 ノックアウトマウスにおける抗うつ作用を行動実験によって確認するため、抑うつ状態の観察に用いられる尾懸垂試験 (tail-suspension test), 強制水泳試験 (Forced swimming test) および Novelty-suppressed feeding test を行った。その結果、sFRP3 ノックアウトマウスは抗うつ薬を長期投与された wt と同じ表現型を示すことが判明した (Fig3-a, b, c)。さらにこの作用が sFRP3 のノックアウトによることを示すため、浸透圧ポンプによるリコンビナント sFRP3 の脳室内投与を行ったところ、抗うつ薬長期投与によってみられた抗うつ作用が消失した (Fig.3-d)。

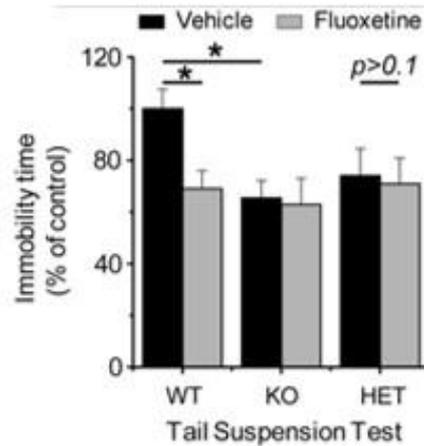


Fig.3-a 尾懸垂試験；
抗うつ薬（イミプラミン 20 mg/kg/day, i.p., フルオキセチン 20 mg/kg/day, i.p.）投与後の静止時間

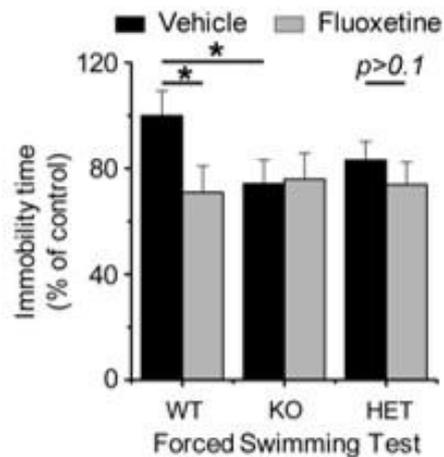


Fig.3-b 強制水泳試験；
抗うつ薬（イミプラミン 20 mg/kg/day, i.p., フルオキセチン 20 mg/kg/day, i.p.）投与後の静止時間

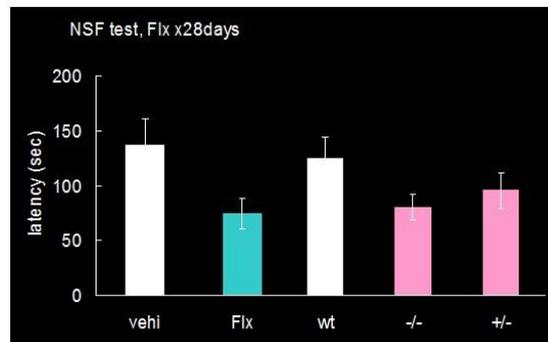


Fig.3-c Novelty-suppressed feeding test；
sFRP3 ノックアウトマウスは抗うつ薬投与後のマウスと同じ抗うつ行動を見せる。

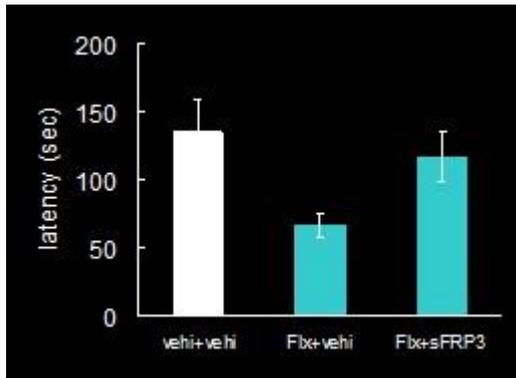


Fig.3-d Novelty-suppressed feeding test ; 浸透圧ポンプによる sFRP3 の過剰発現は抗うつ薬長期投与による行動への影響を消去する。

我々のこれまでの研究により、sFRP3 は成体海馬における神経回路の再構築を制御する重要な因子であることが判明した。そして興味深いことに電気刺激を与えると sFRP3 の発現量が劇的に低下し、Wnt 経路が活性化され、歯状回顆粒細胞の形態がダイナミックに変化することが明らかとなった。一方で海馬はうつ病患者における主要な病変部位であること、難治性うつ病患者においては電気ショック療法が有効であること、さらに最近の知見により海馬神経新生を欠失させたラットでは抗うつ薬による行動実験上の作用が消失することなどから、この抗うつ作用に sFRP3 がなんらかの役割を果たすのではないかと考えられる。実際今回の研究により、ECS 投与ならびに抗うつ薬の長期投与によって sFRP3 mRNA が減少することが分かった。さらに sFRP3 ノックアウトマウスでは行動実験上抗うつ作用を呈し、さらに sFRP3 の脳室内への過剰投与では抗うつ薬長期投与による行動実験上の効果が消失した。

これらの結果は sFRP3 が抗うつ薬の作用メカニズムに強く関与していることを示唆している。すでに述べた仮定が正しいとするならば、海馬における sFRP3 の発現を低下させるような処置や薬物の投与、あるいは既存の抗うつ薬との併用によって、より効果的な抗うつ作用が期待されると思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis

Jang M-H*, Bonaguidi M*, Kitabatake Y*, Sun J*, Song J, Kang E, Jun H, Zhong C, Su Y, Guo J, Wang M, Sailor K, Kim J-Y, Gao Y, Christian K, Ming G-l and Song H.

* These authors equally contributed to this work.

Cell Stem Cell 12 (2013):215-23

2. Secreted Frizzled-related Protein 3 (sFRP3) regulates antidepressant responses in mice and humans

Jang M-H*, Kitabatake Y*, Kang E, Jun H, Pletnikov M.V, Christian M, Hen R, Lucae S, Binder E, Song H and Ming G-l.

* These authors equally contributed to this work.

Mol Psychiatry (2012) advance online; doi: 10.1038/mp.2012.158

3. Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination

Jablonska B, Aguirre A, Raymond M, Szabo G, Kitabatake Y, Sailor K, Ming G, Song H, Gallo V.

Nat Neurosci 13 (2010): 541-550.

6. 研究組織

(1)研究代表者

北畠 康司 (KITABATAKE YASUJI)
大阪大学医学系研究科・小児科・助教
研究者番号：80506494

(2)連携研究者

大田 明生 (OTA AKEMI)
大阪大学医学系研究科・小児科・特任研究員
研究者番号：20283799