

## 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4月10日現在

機関番号：82611  
 研究種目：基盤研究C  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591268  
 研究課題名（和文） うつ病の治癒機転に関連する転写因子 MATH2 の標的遺伝子の同定と分子機構の解明  
 研究課題名（英文） Prg1, regulated by MATH2, is an important factor for survival of neurons derived from neural stem cells.  
 研究代表者  
 山田 美佐 (YAMADA MISA)  
 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・  
 科研費研究員  
 研究者番号：10384182

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、以前にうつ病の治癒機転に重要であることが示唆された転写因子 MATH2 の標的遺伝子 Prg1 が、抗うつ薬を慢性投与したラット脳において発現増加することを明らかとした。また Prg1 は、海馬歯状回において神経細胞マーカーである NeuN と共局在していた。さらに Prg1 は、神経細胞において生存維持に重要な因子であること、本作用には Prg1 の脱リン酸化作用が関与していることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We determined that Prg1, the target gene of a transcription factor MATH2, was induced after chronic treatment with SSRI in mouse hippocampus. Immunohistochemistry revealed that Prg1 expressed in the mouse dentate gyrus and colocalized with NeuN (neuron marker). Then, we studied the role in neuronal survival in neurons derived from neural stem cells. Our results suggest that Prg1 is important for survival of neurons through dephosphorylation activity.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：精神神経科学

キーワード：精神薬理学・転写因子・遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

ストレス社会といわれる現代社会において、うつ病は深刻な問題となっている。うつ病の治療は、主に抗うつ薬による薬物療法を中心としてなされているが、治癒メカニズムは明らかとなっていない。うつ病の病態及び治癒メカニズムについては、既存の抗うつ薬がシナプス間隙におけるモノアミン濃度を上昇させることから、うつ病ではモノアミン神経系に障害があるのではないかという「モノアミン仮説」が提唱されてきた。しかし、このような薬理作用が抗うつ薬投与後短時間で生じるのに対し、抗うつ効果発現には数週間を要するなど矛盾点も指摘された。近年、「抗うつ薬投与による転写因子 cAMP response element-binding protein (CREB) のリン酸化亢進とこれに続く brain derived neurotrophic factor (BDNF) 等の標的遺伝子の転写調節、さらに BDNF による神経保護、神経新生等の機能変化」等の一連の流れがうつ病の治癒につながるという報告が多数なされ、うつ病治癒メカニズム仮説として一定の評価を受けている。この仮説は、抗うつ薬の臨床効果発現に数週間を要するという点については説明できるものの、BDNF の発現増加が種々の抗うつ薬に共通する現象ではない点など矛盾点があり、未だにうつ病の治癒メカニズムは明らかではない。これまで我々は、抗うつ薬の慢性投与後にラット脳内で発現変化する遺伝子の網羅的探索を行い、bHLH 型転写因子 MATH2 を同定した。bHLH 型転写因子は中枢神経系の発生に重要な転写因子であり、神経幹細胞の増殖、神経幹細胞からのニューロンまたはグリアへの分化の決定、ニューロンの分化促進及び維持を制御することが報告されている (Kageyama et al., 2005)。さらに我々は、MATH2 が複数の抗うつ

薬の慢性投与によりラット脳内で共通して発現増加するが、単回投与では発現増加が認められないこと、抗精神病薬、躁病治療薬投与では発現変化しないことから、抗うつ薬の奏効メカニズムに特異的に関与する可能性を報告した (Yamada et al., 2009)。また MATH2 は、物理的うつ病治療法の電気痙攣負荷においても発現増加することが報告された (Ploski et al., 2006)。これらの結果は、MATH2 がうつ病の治癒メカニズムに重要であることを強く示唆するものである。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、大脳皮質初代培養神経細胞を用いて、転写因子 MATH2 が制御する候補遺伝子を探索し、46 遺伝子を発見した (Yamada et al., 2008)。そこで本研究では、46 の MATH2 標的候補遺伝子について、MATH2 標的遺伝子の同定、及び MATH2 標的遺伝子の機能を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬物投与による MATH2 標的遺伝子の発現定量

MATH2 及び標的遺伝子の特異的プライマーを設計し、抗うつ薬投与によるラット前頭葉皮質における発現変化を real-time RT-PCR 法により定量した。

### (2) マウス脳における MATH2 標的遺伝子 Prg1 の発現の検討

灌流固定したマウス成熟脳スライス (40um 厚) を作製し、抗 Prg1 抗体と、神経細胞のマーカーである NeuN との共局在を蛍光免疫 2 重染色法により検討した。

### (3) 神経幹細胞を用いた Prg1 の機能の検討

Wistar ラット (E14) の終脳より単離しニ

ユーロスフェア法により増殖させた神経幹細胞を bFGF 除去により分化させて作成した神経細胞を用いて神経細胞の生存維持における Prg1 の役割を検討した。具体的には、神経細胞に分化誘導 24 時間後に Prg1 siRNA (20nM) を導入し、48 時間後に生細胞数を計測した。生存率は、MTT assay によっても検討した。次に、Prg1 siRNA のターゲットとならないサイレント変異を持った Prg1-4-silent ベクターと、サイレント変異に加えてさらに脱リン酸化酵素活性を持たない変異を持った Prg1-4-silent-H253A ベクターをそれぞれ co-transfection し、神経細胞の生存に対する Prg1 siRNA の効果を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 薬物投与による Math2 標的遺伝子の発現定量

GeneChip 法により MATH2 過剰発現大脳皮質初代培養神経細胞において発現変化が認められた 46 遺伝子 (MATH2 の標的候補遺伝子) すべてについて特異的プライマーを設計し、real time RT-PCR 法により抗うつ薬慢性投与における発現定量を行った。その結果、Prg1、CD69 antigen、G substrate、CLIP associating protein2、adipocyte-specific adhesion molecule、horoidermia、ELAV(HuB) の 7 種の遺伝子において発現変化が認められた。この中で、MATH2 過剰発現大脳皮質初代培養神経細胞において最も発現変化が大きかった Prg1 に着目し、以降の研究をすすめた。

##### (2) マウス脳における MATH2 標的遺伝子 Prg1 の発現の検討

マウス成熟脳における Prg1 の発現を蛍光免疫 2 重染色法により検討した結果、Prg1 は海馬歯状回の顆粒細胞に発現しており、神経細胞のマーカーである NeuN と共局在していた (図 1)。

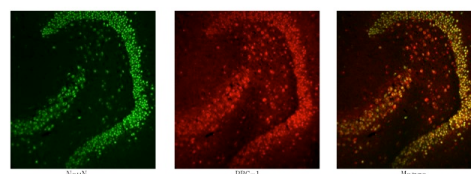


図 1 マウス成熟脳における Prg1 の発現  
灌流固定したマウス成熟脳スライス (40um 厚) を作製し、抗 Prg1 抗体と、神経細胞のマーカーである NeuN との共局在を蛍光免疫 2 重染色法により検討した。

##### (3) 神経幹細胞を用いた Prg1 の機能の検討

Wistar ラット (E14) 終脳より単離した神経幹細胞を分化させることにより調製した神経細胞を使用して、生存維持における Prg1 の役割を検討した。分化誘導した神経細胞に Prg1 siRNA を導入し経時的に細胞数を計測した結果、24 時間後から生細胞数の減少が認められた。興味深いことに、Prg1 siRNA による生細胞数減少は、Prg1 siRNA のターゲットとならない Prg1-4-silent ベクターの co-transfection により回復した (図 2)。しかし、脱リン酸化酵素活性を持たない 4-silent-H253A ベクターの co-transfection では、生細胞数の減少は回復しなかった (図 2)。MTT assay の生存率を用いた検討においても同様な結果が認められた。

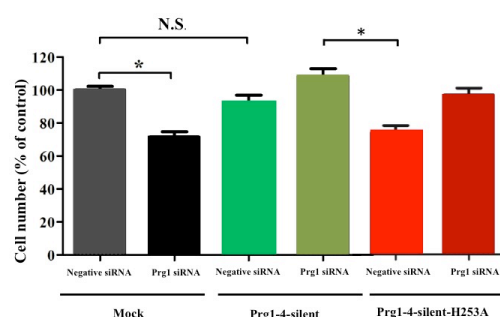


図 2 神経細胞の生存における Prg1 の影響  
分化誘導した神経細胞に Prg1 siRNA 及び種々の Prg1 発現ベクターを導入し、経時的に細胞数を計測した。

以上より、Prg1 は神経細胞の生存維持に働く因子であることが明らかとなった。また、

Prg1 の神経生存維持には、Prg1 の脱リン酸化作用が関与していることが示唆された。

## 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 1 件)

Plasticity-related gene 1 is important for survival of neurons derived from rat neural stem cells. Hashimoto, T., Yamada, M., Iwai, T., Saitoh, A., Hashimoto, E., Ukai, W., Saito, T. and Yamada, M. J. Neurosci. Res. (in press) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

Prg1, an antidepressant-related gene, is an important factor for survival of neurons derived from neural stem cells. 橋本富男, 山田美佐, 岩井孝志, 斎藤顕宜, 橋本恵理, 鶴飼渉, 齋藤利和, 山田光彦 第 36 回日本神経科学会 国立京都国際会館 2013.6.20-23

抗うつ薬関連遺伝子 Prg1 は神経細胞の生存維持に重要な因子である 橋本富男, 山田美佐, 岩井孝志, 斎藤顕宜, 橋本恵理, 鶴飼渉, 齋藤利和, 山田光彦 第 31 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 ホテル別府パストラル 大分 2012.11.16-17

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 美佐 (YAMADA MISA)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・科研費研究員

研究者番号：10384182

### (2) 研究分担者

斎藤 顕宜 (SAITOH AKIYOSHI)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長

研究者番号：00366832

山田 光彦 (YAMADA MITSUHIKO)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・部長

研究者番号：60240040