

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24年 5月17日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700397

研究課題名（和文） 活性酸素酸性酵素の関わる精神障害-その病態と標的分子の同定

研究課題名（英文） Psychiatric dysfunction regulated by NADPH oxidase

研究代表者

衣斐 督和（IBI MASAKAZU）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10336539

研究成果の概要（和文）：

精神障害への活性酸素種（ROS）の関与が示唆されているが、その産生源および制御機構については未だ明らかとなっていない。ROSの主要な産生酵素であるNADPHオキシダーゼの中で触媒アイソフォームNOX1に着目し、精神障害におけるNOX1/NADPHオキシダーゼの役割について解析した。その結果、NOX1/NADPHオキシダーゼは不安様・うつ様行動の発現に寄与することが明らかになり、その機序としてHPA axisの活性化やBDNFの減少が関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The involvement of reactive oxygen species (ROS) in anxiety and mood disorders has been reported; however, the source of ROS in the nervous system has not been identified. NADPH oxidase is a superoxide-generating enzyme composed of multiple subunits including a membrane-spanning catalytic subunit, NOX. ROS derived from NOX1/NADPH oxidase, which possess a newly identified catalytic subunit, appear to play a key role in stress-induced anxiety and depressive-like behaviors, possibly by regulating activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and decrease in BDNF level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：NADPHオキシダーゼ、活性酸素種、精神障害

1. 研究開始当初の背景

古くより精神障害の発症機序として、神経伝達物質の量的異常が提起されている。一方近年視床下部-下垂体-副腎（HPA）axisを介

するストレス応答への酸化ストレスの関与が報告されている。しかしこの酸化ストレスの起源と分子機構は未だ明らかにされていない。

NADPH オキシダーゼは生体内の主要な活性酸素種 (ROS) 産生酵素であり、その触媒サブユニット (NOX) には複数の分子種が存在する。NOX2 で構成される NOX2 /NADPH オキシダーゼが産生する ROS は食細胞の殺菌能に関わり、細胞死を引き起こすことで神経変性疾患に寄与するとされている。他方、新規分子種として見出された NOX1 の ROS 産生能は低く、NOX2 由来の ROS とは異なるシグナル分子としての機能が想定されている。

ROS は膜タンパクや細胞内分子に直接作用してその構造や機能を変化させることでレドックス制御を行うことが知られる。事実、申請者は NOX1/NADPH オキシダーゼ由来の ROS が神経細胞の突起伸長を主に制御していること、またプロテインキナーゼ (PKC) の Cys 残基のジスルフィド結合形成を介しその膜移行を促進することで痛覚過敏を誘発することを *Nox1* 遺伝子欠損マウス (NOX1-KO) を用いてつきとめた。

最近申請者は試験的な解析において、野生型マウスの拘束ストレス負荷により惹起される不安増強と血清 ACTH の上昇が NOX1-KO では有意に抑制されていることを見いだした。

そこで今回、精神障害における NOX1/NADPH オキシダーゼの役割について動物モデルを用い行動解析を行い、本酵素由来の ROS によるレドックスを介した標的分子の活性制御機構を明らかにすることとした。

2. 研究の目的

本申請研究では、「ストレス応答により惹起される精神障害に NOX1/NADPH オキシダーゼ由来の ROS が関与する」という仮説を検証する。さらに HPA axis に焦点を当て、本酵素由来 ROS によるレドックスを介した標的分子の活性調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子の定量解析

不安・うつに寄与する脳部位または視床下部スライスカルチャーから total RNA を抽出し、逆転写後、real time PCR にて定量解析を行った。

(2) ROS 産生量の測定

マウス脳より抽出した各脳部位をホモジネートし、15000xg、15 分間遠心した上清をサンプルとして用いた。サンプルを 37°C で 30 分間インキュベートした後、10 μM L-012 存在下で 15 分間測定した。

(3) 視床下部スライスカルチャーの作製

生後 5-6 日目の胎仔の PVN を含む視床下部の 300 μm 冠状切片を作製し、Milli-Ce11 上に整置し、50% EMEM/25% BSS/25% HS 中で

35°C、5% CO2 環境下で 17 日間培養した。その後 75% EMEM/25% BSS 中で 4 日間培養し、forskolin (10 μM, 6 時間) 刺激または高 KCl 刺激 (50 mM) を行い、切片を回収し、total RNA を抽出した。

(4) うつモデル作製

うつモデルとして社会敗北ストレスとコルチコステロン (CORT) の長期投与を作製し、うつ様行動発現における NOX1 の役割について解析した。

①社会敗北ストレス (social defeat stress) 本モデルは Nestler らの方法を参考にした。実験概略は図 1 に示す。

うつ様行動は social interaction で、center での滞在時間を指標に評価した。

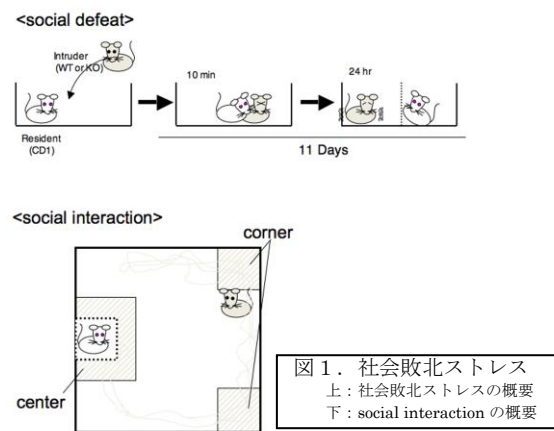


図 1. 社会敗北ストレス
上: 社会敗北ストレスの概要
下: social interaction の概要

②CORT 慢性投与

CORT を飲水に溶解し (35 μg/ml)、21 日間投与した。その後スクロース選択試験、明暗試験、高架式十字迷路試験を行い、投与 30 日目に脳を摘出した。

4. 研究成果

(1) 脳における NOX mRNA の発現分布

NOX1, 2, 4 mRNA の発現分布と発現量を real-time PCR 法にて測定した。大脳皮質、線条体、海馬、扁桃体においてすべての NOX mRNA が発現し、NOX1 発現量は NOX2, 4 と比較して低かった。また NOX2, 4 mRNA は野生型マウス (WT) と NOX1-KO で同程度の発現が認められ、NOX1 欠損による代償的变化は認められなかった。

(2) 拘束ストレスによる視床下部での遺伝子発現変化と ROS 産生増加

WT に拘束ストレスを 30 分間負荷することで視床下部における c-fos, CRH, AVP mRNA の発現増加と ROS 産生増加が認められたが、NOX1-KO では認められなかった (図 2)。

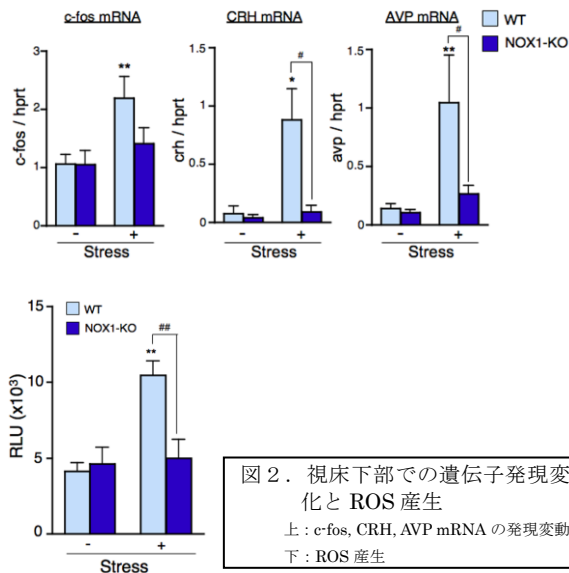


図2. 視床下部での遺伝子発現変化と ROS 産生
上: c-fos, CRH, AVP mRNA の発現変動
下: ROS 産生

(3) FSK 刺激による cCRH mRNA 発現増加における NOX1 の関与

視床下部で CRH mRNA および ROS 産生の増加が NOX1-KO で抑制されたことから、視床下部スライスカルチャーを用いてその発現制御機構の解明を行った。FSK 刺激により c-fos mRNA は両遺伝子群で著明に増大したが、CRH mRNA の発現増加は NOX1-KO で有意ではなかった (図3)。この知見より NOX1 より産生される ROS は PKA-CREB 経路を制御し、CRH mRNA 発現誘導を惹起することが示唆された。

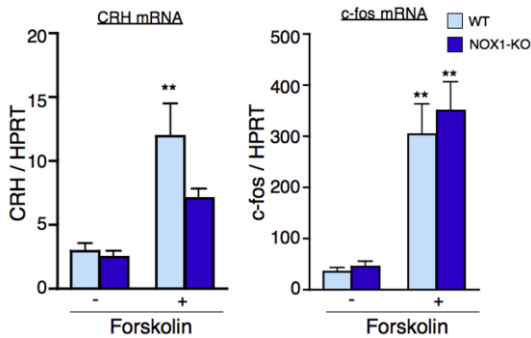


図3. FSK 刺激による遺伝子変化
左: CRH mRNA; 右: c-fos mRNA

(4) 社会敗北ストレスによるうつ様行動の発現

次にうつ様行動の発現に NOX1/NADPH オキシダーゼが関与するか検討した。社会敗北ストレスを 11 日間負荷した後、social interaction 試験を行った。WT, NOX1-KO においてターゲットマウス存在下での center における滞在時間が増加した。しかし、ストレス負荷された WT で social interaction 時間

の有意な減少が認められた一方、NOX1-KO では認められなかった (図4)。

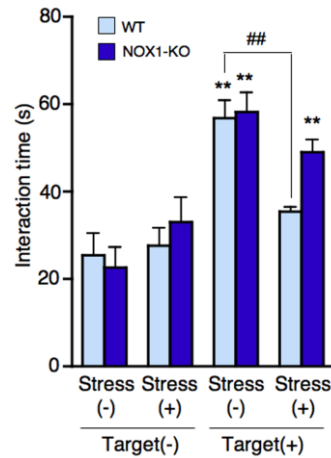


図4. 社会敗北ストレスによるうつ様行動の増加

(5) 慢性 CORT 投与によるうつ様行動の発現

さらに慢性 CORT 投与を行ったところ、両遺伝子群間で飲水量および体重増加において差は認められなかった。しかし CORT 投与によりスクロース選択性は WT で有意に減少したが、NOX1-KO では vehicle 投与群と同程度であった (図5上)。

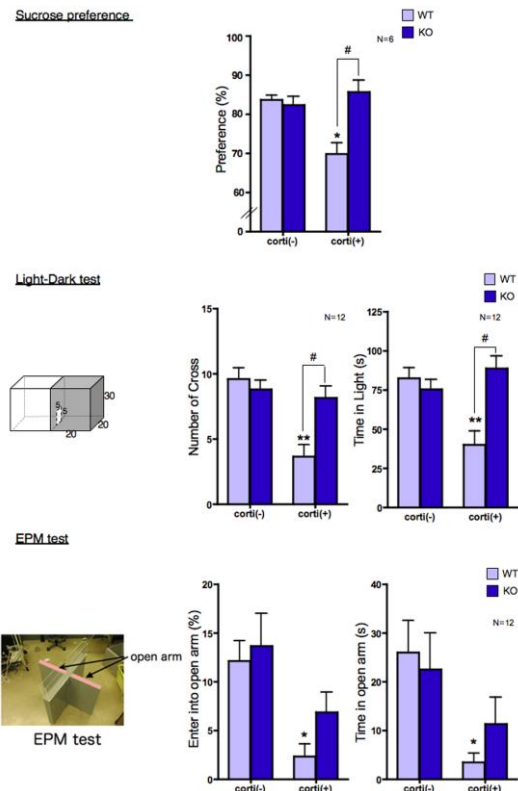


図5. CORT 投与による不安様・うつ様行動

さらに明暗試験において明暗室の通過回数と明室での滞在時間（図5中央）、高架式十字迷路試験において open arm への進入頻度と滞在時間（図5下）がCORT投与したWTで著明な減少が認められたが、NOX1-KOでは減少が抑制された。

(6) 慢性CORT投与によるROS産生とBDNF mRNAの変動

慢性CORT投与を行ったところ、WTのprefrontal cortex (PFC) で著明なROS産生増加が生じた。一方、NOX1-KOでは有意な増加が認められなかった。またBDNF mRNAはCORT投与したWTのPFCとNucleus Accumbens (Nac) で有意に減少した。しかしNOX1-KOではvehicle投与群と同じBDNF mRNA発現量を維持していた（図6）。

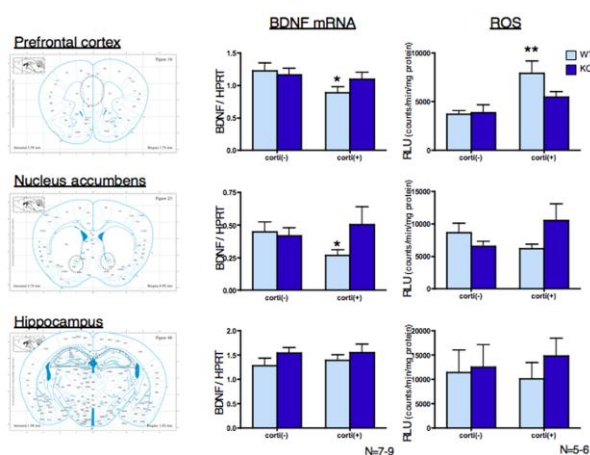


図6. CORTによるBDNF mRNA、ROSの変動

NOX1/NADPH オキシダーゼが不安様行動やうつ様行動の発現に寄与することが明らかとなったが、その詳細な制御機構については今後明らかにする必要がある。

さらにNOX1-KOで確認できた現象が抗酸化薬やNOX1 siRNA注入で再現できるかを確認すべきである。

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4件)

1. Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Sasaki M, Nakagawa T, Katsuyama M, Iwata K, Zhang J, Kaneko S, Yabe-Nishimura C. Involvement of NOX1/NADPH oxidase in

morphine-induced analgesia and tolerance. *J. Neurosci.* 31, 18094-18103, 2011 (査読有) DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4136-11.2011

2. Aoki R, Yagami T, Sasakura H, Ogura K, Kajihara Y, Ibi M, Miyamae T, Nakamura F, Asakura T, Kanai Y, Misu Y, Iino Y, Ezcurra M, Schafer WR, Mori I, Goshima Y. A seven-transmembrane receptor that mediates avoidance response to dihydrocaffeic acid, a water-soluble repellent in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 31, 16603-16610, 2011 (査読有) DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4018-11.2011
3. Cui W, Matsuno K, Iwata K, Ibi M, Matsumoto M, Zhang J, Zhu K, Katsuyama M, Torok NJ, Yabe-Nishimura C. NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) oxidase promotes proliferation of stellate cells and aggravates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Hepatology* 54, 949-958, 2011 (査読有) DOI: 10.1002/hep.24465
4. Katsuyama M, Hirai H, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Sp3 transcription factor is crucial for transcriptional activation of the human NOX4 gene. *FEBS J.* 278, 964-972, 2011 (査読有) DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08018.x

[学会発表] (計3件)

1. 衣斐督和、松野邦晴、松本みさき、矢部千尋. NOX1/NADPH oxidaseはモルヒネの鎮痛作用と耐性形成に関与する. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月15日; 京都.
2. 衣斐督和、松野邦晴、内牧弘祐、矢部千尋. ストレスにより誘発される不安・うつ様行動におけるNOX1/NADPH oxidaseの役割. 第34回日本神経科学大会. 2011年9月17日; 横浜.
3. 内牧弘祐、衣斐督和、松野邦晴、矢部千尋. NOX1/NADPH oxidaseはHPA axisの活性化を介して拘束ストレスによる不安を増強する. 第83回日本薬理学会年会. 2011年3月22日; 横浜.

[図書] (計1件)

1. 衣斐督和. 生体内におけるNADPH オキシダーゼ. *ファルマシア*. 48(1):43-47, 2012.

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pharmacology/gyoseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

衣斐 督和 (IBI MASAKAZU)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10336539