

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 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791102

研究課題名（和文）難治性気分障害の新規治療標的の探索～成体海馬神経新生の分子機構の
解明から研究課題名（英文）Exploration of the new therapeutic target molecule for treatment-
resistant mood disorders through elucidation of the molecular me-
chanism of adult hippocampal neurogenesis

研究代表者

朴 秀賢（BOKU SYUKEN）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：60455665

研究成果の概要（和文）：

bFGF 依存性に増殖する成体海馬歯状回由来神経前駆細胞（ADP）の培養系を用いて、我々は既に GSK3 β が糖質コルチコイドアナログである dexamethasone (DEX) による ADP の増殖抑制に関与していることを見出していた。また、更にその詳細なメカニズムについて検討したところ、ROCK2 が GSK3 β の活性調節に関与していること、bFGF と DEX が ROCK2 の発現を相反的に調節することも見出していた。そこで、実際に *in vivo* にて ROCK2 が成体海馬歯状回神経細胞新生に関与しているか否かについて検討すべく、① *in situ* hybridization を用いて ROCK2 が実際に成体ラット海馬歯状回神経前駆細胞で発現しているかどうか、② *in vivo* で ROCK2 が実際に成体ラット海馬歯状回神経前駆細胞の増殖に関わっているかを調べることを目的に、レトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターを用いた ROCK2 の強制発現系の構築、をそれぞれ行い、後述の通りの一定の成果を得た。

研究成果の概要（英文）

We have already shown that ROCK2 is involved in DEX-induced decrease of bFGF-induced proliferation of adult rat dentate gyrus-derived neural precursor cells (ADP) through regulating the activity of GSK3 β and that bFGF and DEX reciprocally regulate the expression of ROCK2. Therefore, ROCK2 may play a role in adult neurogenesis in dentate gyrus. However, it remains unclear whether ROCK2 actually regulate *in vivo* neurogenesis in adult dentate gyrus. Here we examined the expression of ROCK2 in adult dentate gyrus with *in situ* hybridization. In addition, we tried to prepare the overexpression system of ROCK2 with retroviral vector and lentiviral vector.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野:医歯薬学

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：気分障害、成体海馬神経細胞新生、FGF、GSK-3 β 、 β -catenin、ROCK

1. 研究開始当初の背景

現在、うつ病や躁うつ病などの気分障害の治療には、主にセロトニン系、ノルアドレナリン系に作用する抗うつ薬や気分安定薬が用いられている。しかし、それらが単剤で有効であるのは50%程度であり、複数の薬物の併用や付加療法が必要であることが少なくない。更に、複数の薬物や付加療法に反応しない難治性気分障害の治療については、臨床の現場で難渋することが多く、副作用が出現する危険性が高まるため、従来の治療法に代わる新たな治療法の開発が強く待たれるところである。

従来、神経細胞新生は成体では起こらないとされてきたが、1980年代後半から1990年代にかけて行われた一連の研究により、成体においても海馬など限られた部位において神経細胞新生が起こることが明らかにされた。更に、近年、ラット等の動物を用いて、種々のストレスやうつ病モデルにおいて成体の海馬における神経細胞新生が抑制され、一方で抗うつ薬や気分安定薬などの向精神薬が神経細胞新生を促進するという報告が数多く成され、気分障害の病態、神経細胞新生と向精神薬の作用機序の間に強い関連があることが示唆されている。しかし、神経細胞新生に対する向精神薬の作用機序の詳細は未だに不明である。

我々は近年、成体ラット海馬歯状回という非常に限局した部位から神経前駆細胞を取り出し、神経前駆細胞の内因性増殖促進因子であるFGFに依存して増殖する培養系を確立することに世界で初めて成功した (adult rat dentate gyrus-derived neural precursor cell, 以下ADP)。そして、ストレスホルモンである糖質コルチコイドがADPの増殖を直接的に抑制することを見いだした。更に、気分安定薬リチウムが糖質コルチコイドによるADPの増殖抑制を回復させること、これら糖質コルチコイドとリチウムのADPの増殖に対する相反的な調節はGSK3 β / β -catenin pathwayを介して成されていることを明らかにした (Boku et al, *Neuropsychopharmacology* 34, 805-815, 2009)。

その詳細なメカニズムを明らかにするためには種々の分子生物学的手法を用いた検討が必須であるが、ADPは種々の遺伝子導入用試薬に不耐性である上に増殖能に限りがあるため十分な量を確保するのが困難である。そのため、我々はADPのFGF依存性増殖のモデルをヒト神経芽細胞腫由来のSH-SY5Y細胞で確立し、それを用いて更なる詳細な分子機構の解明を試みた。その結果、bFGF依存性の増殖に低分

子量GTP結合タンパク質RhoAのeffectorとしてよく知られているSer/Thr kinaseであるROCK2が関与しており、FGFはROCK2の発現を増加させ糖質コルチコイドは逆に減少させること、ROCK2はGSK3 β のチロシンリン酸化の調節を介して β -catenin pathwayを調節すること明らかにした (論文投稿中)。

しかし、FGF受容体とROCK2、ROCK2とGSK3 β の間の分子機構については全く不明である。GSK3 β / β -catenin pathwayは多くの組織や細胞において普遍的に用いられているためこれを薬物開発の標的にするのは困難であり、上述のようなFGF受容体とROCK2、ROCK2とGSK3 β の間の分子機構を明らかにすることで、海馬に比較的限局した分子の存在を明らかにできれば、それが有力な治療標的になることが期待される。

2. 研究の目的

成体海馬における神経前駆細胞の増殖を促進するメカニズムの詳細を分子レベルで明らかにすることによって難治性気分障害の新たな治療薬を開発する基盤を構築することを本研究の目的とする。現在までに上述の様なメカニズムをADP及びSH-SY5Y細胞を用いて明らかにしているが、更なる詳細な解析をこれら*in vitro*の系を用いて進め、新たな治療標的の候補となり得る分子の同定を目指す。加えて、*in vitro*の系を用いた研究で明らかになった分子が実際に*in vivo*の成体神経細胞新生において機能しているか否かを、分子生物学的手法や行動薬理学的手法などを組み合わせた研究によって検討する。

3. 研究の方法

本研究は、1) ADP及びSH-SY5Y細胞など*in vitro*の実験系を用いた神経前駆細胞の増殖の分子機構のより詳細な解析、2) 1)で同定された分子の*in vivo* neurogenesisにおける機能解析の2つの観点から進めていく。種々の組織化学的・生化学的・分子生物学的手法を用い、特に遺伝子改変動物やウイルスによる遺伝子導入により分子の直接的関与を示すべく、多面的な検討を試みる。

4. 研究成果

糖質コルチコイドアナログであるdexamethasone (DEX)によるGSK3 β のTyr216リン酸化増加にROCK2が関与していること及びFGF2がROCK2の発現を増加させることを既にSH-SY5Y細胞を用いた*in vitro*実験により示している。そこで、ROCK2が実際に*in vivo*においてFGF2やDEXの成体海馬神経細胞新生への作用に関与しているかどうかを

検討すべく下記の研究を実施した。①ROCK2が実際に *in vivo* で海馬歯状回の神経前駆細胞に発現しているのかを明らかにすることを目的に、多重 *in situ* hybridization を試みた。神経前駆細胞のマーカーとしては SOX2 を採用し、SOX2 と ROCK2 の ribo probe 用プラスミドを構築して riboprobe を合成し、*in situ* hybridization を行った。SOX2 は神経前駆細胞が存在する海馬歯状回の顆粒細胞層下帯に比較的特異的に染色され、riboprobe が適切に作成されたことが確認された。しかし、ROCK2 の riboprobe はなかなか適切に染色されるものが得られず、複数の riboprobe を作成して検討しているところである。②ROCK2 を成体ラット海馬歯状回で強制発現およびノックダウンすることを目的に、レトロウイルスベクターの作成を試みた。*In vivo* で使用する前に *in vitro* で予備的検討を行ったが、ウイルスは十分量得られたにもかかわらずなかなか十分に感染せず、レトロウイルスを断念してレンチウイルスを使用することに変更し、現在レンチウイルスベクターを作成し *in vitro* での予備的検討を行なっているところであるが、こちらの方は感染させ強制発現およびノックダウンを行うことに成功した。今後、*in vivo* での使用に向けて更なる検討を行なっていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Song N, Nakagawa S, Izumi T, Toda H, Kato A, Boku S, Inoue T, Sakagami H, Li X, Koyama T : Involvement of CaMKIV in neurogenic effect with chronic fluoxetine treatment. *Int J Neuropsychopharmacology*, in press, 2012 査読有
2. Song N, Boku S, Nakagawa S, Kato A, Toda H, Takamura N, Omiya Y, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T : Mood stabilizers commonly restore staurosporine-induced increase of p53 expression and following decrease of Bcl-2 expression in SH-SY5Y cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, Epub ahead of print, 2012 (Song N and Boku S are equally contributed to this work.) 査読有
3. Masuda T, Nakagawa S, Boku S, Nishikawa H, Takamura N, Kato A, Inoue T, Koyama T : Noradrenaline increases neural precursor cells derived from adult rat dentate gyrus through beta2 receptor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 36, 44-51, 2012. 査読有
4. Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S and Koyama T: Effects of combined treatment with clorgyline and selegiline on extracellular noradrenaline and serotonin levels. *Acta Neuropsychiatr*, Accepted manuscript online: 24 JAN 2012 DOI:10.1111/j.1601-5215.2012.00652.x 査読有
5. Masuda T, Nishikawa H, Inoue T, Toda H, Nakagawa S, Boku S, Koyama T: 5-HT depletion, but not 5-HT1A antagonist, prevents the anxiolytic-like effect of citalopram in rat contextual conditioned fear stress model. *Acta Neuropsychiatr*, Accepted manuscript online: 3 MAY 2012 12:05PM EST | DOI: 10.1111/j.1601-5215.2012.00669.x 査読有
6. Inoue T, Honda M, Kawamura K, Tsuchiya K, Suzuki T, Ito K, Matsubara R, Shinohara K, Ishikane T, Sasaki K, Boku S, Fujisawa D, Ono Y, Koyama T: Sertraline treatment of patients with major depressive disorder who failed initial treatment with paroxetine or fluvoxamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012 Apr 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22504727. 査読有
7. Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Nishikawa S, Kato A, Toda H, Song N, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T : Effects of mood stabilizers on adult dentate gyrus-derived neural precursor cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35, 111-117, 2011 査読有
8. Boku S, Inoue T, Honma H, Matsubara S, Nakagawa S, Koyama T. Olanzapine augmentation of milnacipran for stage 2 treatment-resistant major depression: an open study. *Hum Psychopharmacol*, 26:237-241, 2011. 査読有
9. Izumi T, Boku S, Shinmin W, Inoue T, Konno K, Yamaguchi T, Yoshida T, Matsumoto M, Watanabe M, Koyama T, Yoshioka M. Retrieval of conditioned fear activates the basolateral and intercalated nucleus of amygdala. *J Neurosci Res*, 89 (5): 773-790, 2011. 査読有
10. Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S, Kakuta A, Izumi T, Koyama T: Sertraline increases extracellular levels not only of serotonin, but also of dopamine in the nucleus accumbens

and striatum of rats. *Eur J Pharmacol*,
647: 90-96, 2010. 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. Boku S, Nakagawa S, Toda H et al :
Rho-associated coiled-coil kinase
(ROCK2) regulates bFGF-induced
proliferation of SH-SY5Y cells
through GSK-3 β and β -catenin
pathway, Society for Neuroscience 41th
annual meeting, Washington DC, 2011
2. 朴 秀賢、宋 寧、中川 伸、加藤 亜
紀子、高村 直樹、戸田 裕之、井上 猛、
小山 司 : 気分安定薬は SH-SY5Y 細胞に
おいて staurosporine による p53 の発現
増加および Bcl-2 の発現減少を抑制させ
る, 第 30 回躁うつ病懇話会, 京都 (ガ
ーデンホテル京都), 2011

〔図書〕 (計 1 件)

3. 朴秀賢 : 気分安定薬と成体海馬歯状回神
経細胞新生. 気分障害の薬理・生化学
—総括と新たな挑戦—, 医薬ジャーナ
ル, pp125-127, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 秀賢 (BOKU SYUKEN)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号 : 60455665

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし