

## 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23日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791127

研究課題名（和文） 神経可塑性メカニズムの解明～抗うつ薬の創薬を目指して～

研究課題名（英文） The Mechanism of neuroplasticity for discovery of antidepressants

研究代表者

山形 弘隆 (YAMAGATA HIROTAKA)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10549934

研究成果の概要（和文）：抗うつ薬の神経可塑性に対する効果が注目されている。しかし、抗うつ薬が神経可塑性に与える影響の詳細は未だ不明な点が多い。抗うつ薬投与を行ったマウス海馬で BubR1 の発現を調べたところ、BubR1 の mRNA が抗うつ薬投与群で減少していることが分かった。また、培養神経細胞の BubR1 を減少させると神経突起伸張が促進され、逆に BubR1 を過剰発現させると神経突起伸張が抑制されることから、抗うつ薬が BubR1 を介して神経可塑性を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Antidepressant treatment has been reported to increase neurogenesis and neural plasticity in the hippocampus. In this study, we focused on BubR1. The mRNA of BubR1 was decreased with chronic antidepressant treatment in the hippocampus the model mice for depression. Silencing of BubR1 accelerated neurite outgrowth in Neuro2a and SH-SY5Y cells. Exogenous expression of BubR1 inhibited neurite outgrowth in Neuro2a cells and primary neuron. These results suggest that BubR1 might be involved in the neural plasticity and the effect of antidepressant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：精神薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病患者において、海馬が縮小していることが報告されている。しかも、ニューロンやグリア細胞の数は減っておらず、細胞のサイズや神経網が小さくなっていると考えられている。動物実験では、慢性ストレスにより、

海馬や前頭前野背外側において、ニューロンの神経網や樹状突起の減少が認められている。樹状突起の減少は、抗うつ薬の慢性投与により防ぐことができるとされる。これらの報告は、うつ病と抗うつ薬が神経可塑性と深く結びついていることを示唆しているが、詳

細なメカニズムについては不明な点が多い。最近、海馬においてサイクリン依存性キナーゼ (CDK) を抑制する p21 が慢性のイミプラミン投与によって減少すること、p21 のノックアウトマウスにおいて海馬の神経増殖が増えていること、が報告された。CDK5 はコカイン報酬行動や恐怖行動との関連が報告されている。これらの報告から、細胞周期関連タンパクが海馬の神経可塑性を調節して抗うつ効果に関与していることが示唆される。

細胞周期関連タンパクが神経可塑性を調節している報告は複数存在する。例えば、ユビキチンリガーゼ活性を持ち、サイクリンの分解を担っている APC/C は M 期の進行に重要な役割を担っているが、細胞分裂を起こさない成熟神経細胞において、軸索の伸長や樹状突起の伸展を制御していることが報告されている。

## 2. 研究の目的

BubR1 は APC の co-activator である cdc20 を抑制してスピンドルチェックポイントの役割を担っている。しかし、BubR1 が神経細胞の突起伸長に及ぼす役割については、未だ不明のままである。本研究は、BubR1 の神経可塑性に対する役割を明らかにし、抗うつ薬の効果発現へどのように寄与しているかを検証していくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養と神経突起伸長の解析

Neuro2A (N2A) と SH-SY5Y は 10% 仔牛血清 (FBS) を含む DMEM メディウムを用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。Flag タグを付加した BubR1 の発現には、pcDNA-zeo3.1 (+) 発現ベクターを用いた。すべての siRNA は株式会社 RNAi より購入した。

N2A (1 × 10<sup>4</sup>) もしくは SH-SY5Y (1 × 10<sup>5</sup>) を 12 well プレートに播種し、24 時間後に 40 pmol の siRNA もしくは 1 μg のプラスミドを Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。同時に 200 ng の GFP expression vector も合わせてトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後に N2A 細胞は 1% FBS メディウムで培養した。SH-SY5Y 細胞は 10 μM の all trans-retinoic acid (ATRA) を 3% FBS DMEM に添加した。神経突起伸長は細胞体の 2 倍以上 (N2A) あるいは 1.5 倍以上 (SH-SY5Y) の神経突起をもつ細胞を数えた (n > 600 個)。

### (2) 動物

成獣オス BALB/c マウス (Charles River Japan) を、山口大学の動物使用ガイドライ

ンに従って適切に使用した。研究プロトコルについては、山口大学の動物使用委員会の承認を得た。イミプラミンを滅菌水で 160 mg/l の濃度で溶解し、3 週間経口で内服させたのちに海馬を摘出した。

### (3) 初代神経細胞

ddY マウスの E17 胎児脳から得られた海馬をトリプシン処理し、神経細胞を単離した。神経細胞 (5 × 10<sup>4</sup>) は PLL コートされた 24 well プラスティックディッシュを用いて B27 Supplement を含む Neurobasal Medium で 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養 24 時間後にリン酸カルシウム法を用いて 4.4 μg の BubR1 発現プラスミドおよび 2.2 μg の GFP 発現プラスミドをコトランスフェクションした。トランスフェクションしてから 54 時間後に、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、Sholl Plot 法を用いて神経突起伸長を定量した。

### (4) 定量的リアルタイム PCR (Q-PCR)

細胞からの RNA 抽出には RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いた。海馬からの RNA 抽出には TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いた。100 ng のトータル RNA を鋳型にして QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) を用いて cDNA を作成した。Q-PCR は Applied Biosystems StepOne™ Fast Real-Time PCR System を使用し、増幅の検出には SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) を用いた。内部コントロールには GAPDH mRNA を用いた。プライマーの配列は以下の通りである。

GAPDH: Forward Primer  
AGGTCGGTGTGAACGGATTTG, Reverse primer  
TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA,  
BubR1:T Forward Primer  
TCTGGGATGGACTCCTCTG, Reverse primer  
GGACTTGTCCTGACTGGCATTCA

### (5) ウェスタンブロットおよび免疫染色

細胞は遠心回収後に RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5% deoxycholate [sodium salt], and 150 mM NaCl) で溶解したのち、サンプルバッファでボイルして、一般的なプロトコールでウェスタンブロットを行った。免疫染色は ATRA 添加 48 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X で処理した後に、免疫染色した。BubR1 の抗体はベクトン・ディッキンソン社の抗体を用いた。

## 4. 研究成果

SH-SY5Y 細胞は ATRA を添加すると神経突起伸長することが知られている。10 μM の ATRA を添加し 24 時間後、72 時間後の

BubR1 のタンパク量をウェスタンブロットで検出したところ、ATRA 添加後に BubR1 が減少していることが分かった (図 1)。



図 1 ATRA による BubR1 タンパク量の変化

この結果をさらに確かめるために、免疫染色法でも BubR1 の局在と発現量を調べた。すると、ATRA 添加 48 時間後に BubR1 の発現量の低下が確認された (図 2)。

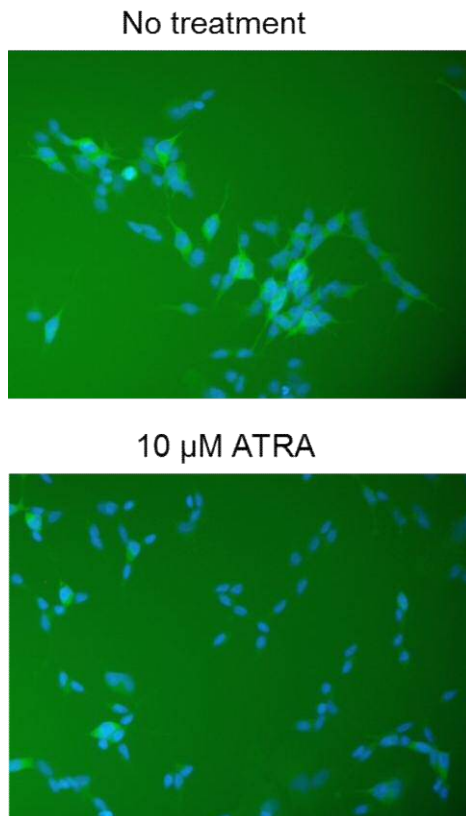


図 2 BubR1 発現量と細胞内局在 緑: BubR1、青: DAPI

しかし、細胞内局在については、ATRA による変化は認められなかった。以上の結果から、BubR1 が神経突起伸長を抑制的に制御していると仮定し、次の実験を行った。BubR1 を siRNA でノックダウンした SH-SY5Y 細胞に ATRA を添加して、神経突起伸長を調べたところ、siBubR1 は ATRA 添加による神経突起伸長を促進させた (図 3)。

SHSY5Y neurite growth

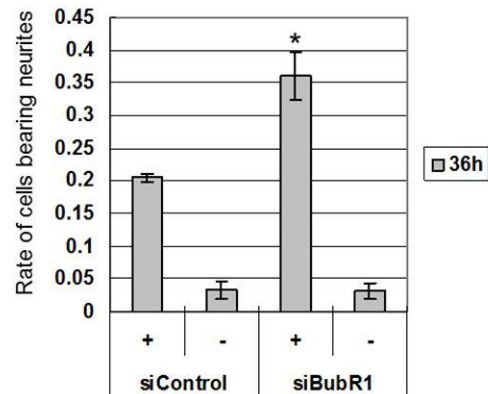


図 3 siBubR1 による SH-SY5Y の神経突起伸長 (+が ATRA 添加群)

同様の実験を N2A 細胞でも行った。siBubR1 で BubR1 を減少させた N2A 細胞を低血清の培地で培養したところ、ATRA 添加を行わずとも、コントロールに比べて神経突起伸長を起こすことが分かった (図 4)。

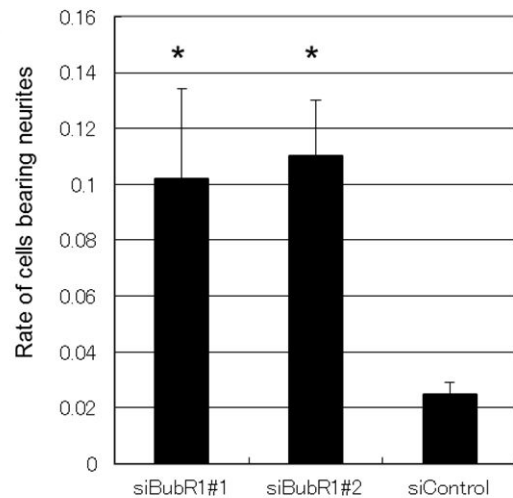


図 4 siBubR1 による N2A 神経突起伸長

逆に BubR1 過剰発現は、ATRA 添加による N2A 細胞の神経突起伸長を抑制した (data not shown)。さらに、海馬の初代神経細胞を用いて、BubR1 の神経突起伸長に対する役割を検証した。E17 胎児脳の花弁細胞から得られた初代神経細胞に BubR1 を発現させ、54 時間後の神経突起伸長を Sholl Plot 法を用いて調べた (図 5)。すると、BubR1 をトランスフェクションさせた細胞では、神経突起伸長が抑制されることが分かった。

これらの結果から、BubR1 が神経突起伸展を抑制的に制御していることが示唆された。

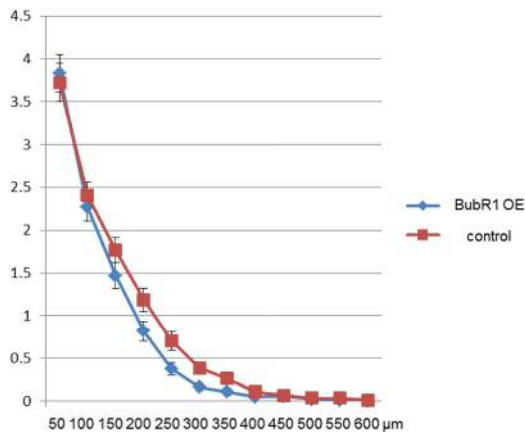


図5 BubR1 発現による Primary Neuron の神経突起伸展変化

抗うつ薬の効果との関連を調べるため、ストレス脆弱性が報告されている BALB/c マウスにイミプラミンを 3 週間投与し、海馬の BubR1 mRNA の発現量を調べたところ、BubR1 の mRNA が有意に減少していた (図 6)。線条体や前頭前野などでは変化が見られなかった (data not shown)。

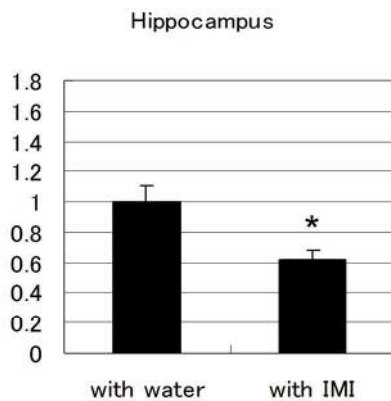


図 6 イミプラミン慢性投与による海馬 BubR1 mRNA の変化

以上の結果から、慢性の抗うつ薬投与が海馬の BubR1 mRNA を減少させて、神経可塑性を変化させることが、抗うつ薬作用に影響を与えている可能性が示唆された。

## 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 5 件)

① Higuchi F, Uchida S, Yamagata H, Otsuki K, Hobara T, Abe N, Shibata T, Watanabe Y. State-dependent changes in the expression of DNA methyltransferases in mood disorder patients. J Psychiatr Res. 45:1295-300; 2011 (査読有)

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. 45: 1106-12; 2011 (査読有)

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. Proc Natl Acad Sci U S A. 108: 1681-6; 2011 (査読有)

④ Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Suzuki T, Miyata N, and Watanabe Y. Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. Neuron 69: 359-72; 2011 (査読有)

⑤ Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Funato H, Hobara T, Otsuki K, Yamagata H, McEwen BS, Watanabe Y. 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; 2010 (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

① Hirota Yamagata et al. BubR1 inhibits neurite outgrowth of neuroblastoma cells, Neuroscience 2011 2011/11/14 Washington, DC. USA

② 山形弘隆 他 エピジェネティクスとストレス脆弱性、うつ病, 第 54 回日本神経化学学会 2011/9/27 瑠璃光 (金沢市)

③ 山形弘隆 他 BubR1 はニューロblastoma細胞の神経突起伸展を制御している, 第 34 回日本神経科学大会 2011/9/17 パシフィコ横浜 (横浜市)

④ 山形弘隆 他 うつ病と神経可塑性に対する BubR1 の役割, 第 32 回日本生物学的精神医学会 2010/10/7-9 リーガロイヤルホテル小倉 (北九州市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山形 弘隆 (YAMAGATA HIROTAKA)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10549934