

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 1日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791128

研究課題名（和文）抗うつ薬とBDNFによるミクログリア活性化の制御機序解明・TRPチャンネルの関与

研究課題名（英文）Mechanisms underlying effects of BDNF and antidepressants on microglia; Possible role of TRPC channels

研究代表者 溝口 義人(MIZOGUCHI YOSHITO)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：60467892

研究成果の概要（和文）：BDNFによる細胞内カルシウムイオン濃度 $[Ca^{2+}]_i$ 持続的上昇（Mizoguchiら, J Immunol 2010）にも TRPCチャンネル、とくに TRPC3の関与を示唆する結果が得られた。BDNFは短時間でミクログリア細胞膜表面に TRPC3チャンネルを挿入し、増加させることが判明した。BDNFは活性化ミクログリアによる NO放出を抑制する（Mizoguchiら, J Immunol 2010）が、この抑制には TRPC3チャンネル活性化が関与することが分かった。さらに real-time RT-PCR法、免疫組織化学的手法により TRPチャンネルおよび関連分子・タンパクの検索を行った結果、ミクログリアは TRPC3チャンネルを発現することを確認した。

研究成果の概要（英文）：

In rodent microglial cells, sustained activation of SOCE, possibly mediated by TRPC3 channels, occurred after brief BDNF application and contributed to the maintenance of sustained $[Ca^{2+}]_i$ elevation. BDNF acutely upregulates the surface expression of TRPC3 channels in rodent microglia. In addition, RT-PCR and immunocytochemical techniques revealed that TRPC3 channels are highly expressed in rodent microglial cells.

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：精神医学

科研費の分科・細目：精神神経薬理学

キーワード：

うつ病、BDNF、ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

気分障害発症の背景に海馬での神経新生の障害が指摘されており（Dumanら, Biol Psychiatry 2006）、SSRIなどの抗うつ薬や気分安定薬の投与により神経新生が促進さ

れるという報告が近年相次いでいる（Santarelliら, Science 2003、Davidら, Neuron 2009）。

さらに、気分障害の病態にBDNFの発現低下が関与し、抗うつ薬の治療効果発現に海

馬での BDNF 産生および神経新生促進が関与する可能性が示唆されており

(Martinowich, Manji & Lu, *Nat Neurosci* 2007、Taliaz ら, *Mol Psychiatry* 2009)、BDNF は気分障害の病態と治療における 1 つの鍵分子であると考えられている (Licinio ら, *Arch Gen Psychiatry* 2009)。

一方、うつ病の病態において炎症の関与が重要視されており (Dantzer ら, *Nat Rev Neurosci* 2008、Miller ら, *Biol Psychiatry* 2009)、最近、うつ病様症状を呈する末梢神経損傷モデル動物では、前頭葉において炎症性サイトカイン (IL-1 β) の発現量が増加すること。さらに、神経損傷前の拘束ストレスがうつ病様症状を増悪させ、中枢での IL-1 β と BDNF の発現増加を伴うことが報告された (Norman ら, *Mol Psychiatry* 2009)。

中枢神経系での neuroinflammation (神経炎症) の機序には脳内ミクログリアが深く関与するが、ミクログリア活性化は BDNF など神経栄養因子を産生するとともに、炎症性サイトカインやフリーラジカル等の細胞障害因子も産生し放出する (Kempermann ら, *Science* 2003、Ransohoff & Perry, *Annu Rev Immunol* 2009)。

一方、BDNF はミクログリアの分化能、食食能 (Elkabes ら, *J Neurosci* 1996) さらに炎症性サイトカイン放出 (Nakajima ら, *Glia* 1998) を調節する。神経新生に対して、BDNF は促進的に作用するが、炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IFN- γ など) やフリーラジカル (NO など) は抑制的に作用することが知られている (Monje ら, *Science* 2003)。ミクログリアのニューロンに対する作用は「両刃の剣」であり、この両方向性を制御する機序が近年注目されている (Inoue K ら, *J Neurochem* 2007、Pocock & Kettenmann, *Trends Neurosci* 2007、Choi ら, *Trends Pharmacol Sci* 2009、Pollard, *Nat Rev Immunol* 2009)。

最近、申請者の所属する研究室は、非定型抗精神病薬、SSRI を含む抗うつ薬あるいはリチウムなどの気分安定薬の前処置により、IFN- γ 刺激後のミクログリア活性化が抑制され、炎症性サイトカインやフリーラジカルの産生放出が抑制されることを見出し報告した (Kato, Monji ら, *Schizophr Res* 2007、Hashioka ら, *Exp Neurol* 2007、Bian ら, *Prog Neuropsychopharmacol Biol*

Psychiatry、Kato, Mizoguchi ら, *J Neurochem* 2008)。

以上の報告を総合すると、ミクログリア活性化が炎症性サイトカイン、フリーラジカルあるいは BDNF の産生放出を通じて、気分障害の発症において重要な役割を担う可能性が示唆される。また抗うつ薬、気分安定薬および BDNF はミクログリア活性化を制御すると考えられ、その制御メカニズムの解明は、気分障害の治療において非常に重要である。ミクログリア活性化による炎症性サイトカインやフリーラジカルの産生・放出には、[Ca²⁺]_i 上昇が重要な役割を担う。抗うつ薬あるいは気分安定薬によるミクログリア活性化抑制作用の細胞内機序として、各薬剤による細胞内 Ca²⁺シグナリングの制御が関与する可能性が高い。

2. 研究の目的

うつ病を含む気分障害発症の背景に、海馬での神経新生の障害が指摘されており、抗うつ薬と気分安定薬の治療効果には、脳由来神経栄養因子 (BDNF) 産生放出の増加と神経新生の促進が関与する可能性が示唆されている。近年、うつ病の病態生理における神経炎症の関与が注目されているが、脳内ミクログリア活性化は BDNF のほか、炎症性サイトカインやフリーラジカル等の神経細胞障害因子を放出し、神経新生に大きく影響する。本研究は抗うつ薬・気分安定薬および BDNF によるミクログリア活性化の制御メカニズムを、特に細胞内 Ca²⁺シグナリングと TRP チャンネルに着目して解明し、気分障害の病態把握と治療薬開発に資することを目的とする。

3. 研究の方法

抗うつ薬・気分安定薬および BDNF による脳内ミクログリア活性化抑制効果についてその細胞内機序をとくに細胞内 Ca²⁺シグナリングと TRP チャンネルに着目して解明する。標本はラット培養ミクログリアとマウス 6-3 ミクログリア (cell line) を用いる。Real-time RT-PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫組織化学的手法により関連分子・タンパクの検索を行い、さらにカルシウム測光、DAF-2 による NO リアルタイム測定、電気生理学的手法により候補分子・タンパクの作用を検討する。また ELISA 法、Griess 法、in vitro/vivo

ESR 法によるミクログリア活性化の検討も行う。TRP チャンネルの検索に際して、siRNA あるいはアンチセンスヌクレオチドにより標的遺伝子の発現を抑制した細胞を作製する。

4. 研究成果

今回報告者はミクログリアにおいても paroxetine、sertraline、fluvoxamine などの抗うつ薬 SSRI が主に細胞外から Ca²⁺を流入させて細胞内[Ca²⁺]_iを上昇させることを確認した。SSRI による Ca²⁺流入過程に store-operated Ca²⁺ channels (TRP チャンネルを含む)が関与する可能性が示唆された。

また BDNF による [Ca²⁺]_i 持続的上昇 (Mizoguchi ら, J Immunol 2010) にも TRPC チャンネル、とくに TRPC3 の関与を示唆する結果が得られた。BDNF は短時間でミクログリア細胞膜表面に TRPC3 チャンネルを挿入し、増加させることが判明した。BDNF は活性化ミクログリアによる NO 放出を抑制する (Mizoguchi ら, J Immunol 2010) が、この抑制には TRPC3 チャンネル活性化が関与することが分かった (この結果については、DAF-2 による NO リアルタイム測定を用いた)

申請者はさらに real-time RT-PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫組織化学的手法により TRP チャンネルおよび関連分子・タンパクの検索を行った。これらの結果の一部について、国際学会で報告した。また、成果についても論文投稿中である (Mizoguchi ら、Mini Rev Med Chem 2011 に一部発表)。

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 9 件)

1. Mizoguchi Y, Sakami A, Imamura Y, Tsuruta T, Egami M, Yamada S (2012) The effect of oral presentation on salivary 3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol (MHPG) and cortisol concentrations in training doctors: a preliminary study. Endocrine (in press)

2. Monji A, Kato TA, Mizoguchi Y, Horikawa

H, Seki Y, Kasai M, Yamauchi Y, Yamada S, Kanba S (2012) Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry (in press)

3. 門司晃、溝口義人、山田茂人(2012) 神経炎症の観点よりみたアルツハイマー病の病態生理とその治療。分子精神医学 12(1) 9-13

4. Watanabe I, Li GY, Imamura Y, Nabeta H, Kunitake Y, Ishii H, Haraguchi M, Furukawa Y, Tateishi H, Kojima N, Mizoguchi Y, Yamada S. (2012) Baseline saliva level of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) associates with a consequent cognitive decline in non-demented elderly subjects: three-years follow-up study. Psychiatry Res. 195(3):125-8.

5. Mizoguchi Y, Monji A, Kato TA, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Kanba S, Yamada S (2011) Possible role of BDNF-induced microglial intracellular Ca(2+) elevation in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Mini Rev Med Chem. 11:575-81.

6. Kato TA, Monji A, Mizoguchi Y, Hashioka S, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Utsumi H, Kanba S. (2011) Anti-inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a 'fire extinguisher' in the brain of schizophrenia? Mini Rev Med Chem. 11:565-74.

7. Kato TA, Monji A, Yasukawa K, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Hashioka S, Han YH, Kasai M, Sonoda N, Hirata E, Maeda Y, Inoguchi T, Utsumi H, Kanba S. (2011) Aripiprazole inhibits superoxide generation from phorbol-myristate-acetate (PMA)-stimulated microglia in vitro: implication for antioxidative psychotropic actions via microglia.

Schizophr Res. 129(2-3):172-82.

8. Horikawa H, Kato TA, Mizoguchi Y, Monji A, Seki Y, Ohkuri T, Gotoh L, Yonaha M, Ueda T, Hashioka S, Kanba S (2011) Inhibitory effects of SSRIs on IFN- γ induced microglial activation through the regulation of intracellular calcium. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 34(7):1306-16.

9. Eggan SM*, Mizoguchi Y*, Stoyak SR, Lewis DA (2010) Development of cannabinoid 1 receptor protein and messenger RNA in monkey dorsolateral prefrontal cortex. Cereb Cortex 20(5):1164-74.

[学会発表] (計 3 件)

1. Mizoguchi Y et al
SSRI potentiates BDNF-induced microglial intracellular Ca²⁺ elevation
Society for Neuroscience, 41st Annual Meeting. Washington Convention Center. 2011. 11. 15

2. 神庭重信ら
精神疾患におけるミクログリアの役割
第 34 回日本神経科学大会 パシフィコ横浜
2011. 9. 15

3. Mizoguchi Y et al
Possible role of BDNF-induced microglial intracellular Ca²⁺ elevation in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders.
40th annual meeting of the Society for Neuroscience 2010 in San Diego. San Diego Convention Center 2010. 11. 17.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 義人 (MIZOGUCHI YOSHITO)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：60467892