

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590300

研究課題名(和文) 抗うつ治療で賦活化する海馬プロトカドヘリン-マップキナーゼ系の意義

研究課題名(英文) Activation of hippocampal protocadherin-MAP kinase cascade by the treatment of depression

研究代表者

田中 秀和 (Tanaka, Hidekazu)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70273638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病により、情動の中核である大脳辺縁系の一部、海馬が萎縮し、その神経細胞の樹状突起が退縮し、シナプスを形成するスパインの密度も減少する。抗うつ薬などでうつ病が軽快すると、海馬の体積やスパイン密度も増す。抗うつ薬により海馬内神経細胞に、スパインの密度制御に関与する接着分子Arcadlin (Protocadherin-8; Paraxial protocadherin) が誘導される。Arcadlin遺伝子を欠損したマウスでも、抗うつ薬は正常に作用し、むしろその効果が促進されたので、Arcadlinは抗うつ作用が引き起こされる過程に対して拮抗的に作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hippocampus, a part of the limbic system, shrinks in depressive patients. It is also reported that dendritic arbors shrink, and that the density of spines that form excitatory synapses decreases in hippocampus. All these parameters recover in individuals successfully treated with antidepressants. Arcadlin (or Protocadherin-8; Paraxial protocadherin) is a protocadherin-type cell adhesion molecule induced in hippocampal neurons by these treatments. Arcadlin is known to regulate spine density. The effect of antidepressants was rather enhanced in arcadlin-gene deleted mouse. The data suggest that Arcadlin is induced by antidepressants, but shows an antagonistic effect against the drug's action.

研究分野：薬理学、神経化学

キーワード：抗うつ薬 シナプス可塑性 海馬 プロトカドヘリン マップキナーゼ 接着分子 樹状突起スパイン

### 1. 研究開始当初の背景

うつ病患者の脳内ではセロトニンなどのモノアミンが枯渇する。そこで、三環系・四環系抗うつ薬や SSRI・SNRI により、細胞外に放出されたモノアミンの滞留時間を長くすることでうつが軽快するとするモノアミン仮説が、現在のうつ病治療の科学的根拠となっている。しかしながら、抗うつ薬が作用発現に至るまでに数週間要すること、脳内における細胞外モノアミン濃度が早期に上昇する事実との間に見られる非整合性は未解決である。一方で、逼迫する自殺念慮など緊急を要するうつ症例に対して、電気けいれん療法が即効性を示し、成果を上げている。数週間かかる薬物療法と即効性の電気けいれん療法を統合的に理解するメカニズムは未解明であるが、両者とも海馬の機能が回復することが重要だと分かり始めてきた。海馬は進化的に古い大脳(辺縁系)の一部で、情動・記憶を司る中枢である。

我々の脳は、常にさらされている外界からの刺激に対して、適応を繰り返している。たとえば、経験や訓練による学習、麻薬・覚醒剤などで起こる薬物依存、そして脳損傷後の機能回復なども、広義の適応である。脳がこのような活発な適応現象を示す背景には、神経回路網の再構築(リモデリング)が関与していると考えられる。脳の本体は、神経線維(神経細胞)同士がシナプスで結びつき合ってきたネットワーク(神経回路網)である。神経回路網は、神経活動によりダイナミックに機能・形態両面でリモデリングを起こし、シナプスがつなぎかえられる(引用文献)。このような神経回路網のリモデリング(シナプスのリモデリング)が、脳が持つ豊かな適応能力の基盤をなしていると考えられる。

我々はこれまで、海馬シナプスのリモデリングのメカニズムに取り組んで来た。具体的には、神経線維同士をシナプスでつなぎ合わせるカドヘリンファミリー接着分子 N-cadherin が、神経活動によるシナプス結合(スパイン)の構造変化に関与することを見いだした(引用文献)。また、神経活動により転写・翻訳が劇的に誘導される Arcadlin (別名 Protocadherin-8/Paraxial protocadherin) というプロトカドヘリン分子がシナプスに運ばれ、シナプス(スパイン)の形態や数を調節する(シナプスのつなぎかえ)現象も示した(引用文献)。Arcadlin は、接着分子に典型的に見られる一次構造を持ちながら、最初期遺伝子として神経活動に応答する顕著な遺伝子発現誘導を見せる点で、極めてユニークであり、海馬シナプスのリモデリングを理解する上での鍵となることが期待される。

特筆すべき Arcadlin の特徴は、即効性の電気けいれん刺激で海馬に劇的な発現が見られるばかりでなく、抗うつ薬の長期投与でも海馬での発現が誘導される点である。このことから Arcadlin は、慢性・急性両方の抗

うつ療法に共通して海馬で起きるメカニズムを制御していることが想定される(図1)。

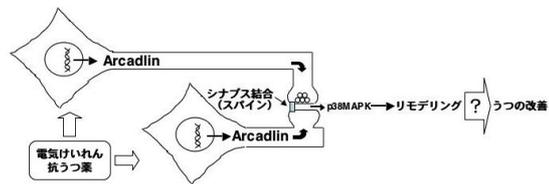


図1. Arcadlin は電気けいれん・抗うつ薬のいずれによっても海馬神経細胞内に誘導される。

さらに我々は、Arcadlin 同士が海馬シナプス結合で出会うと、下流の p38MAP キナーゼ経路を活性化することも示してきた(引用文献)。興味深いことに研究開始当初、p38MAP キナーゼ活性を抑制する MKP-1 (別名 DUSP1) 脱リン酸化酵素が、うつ病を引き起こすことが報告された(引用文献)。これらを合わせて考えると、抗うつ療法で高発現した Arcadlin が、p38MAP キナーゼを活性化して MKP-1 と拮抗することが、抗うつ効果発現メカニズムのひとつの可能性として想定された。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、「Arcadlin とその下流の p38MAP キナーゼシグナル伝達系」に着目して、以下のことを明らかにすることを目指した。作用機序が異なる抗うつ薬と電気けいれんの両者が、それぞれどのようなメカニズムで Arcadlin 発現誘導をもたらすのか? 増加した Arcadlin は、シナプス・スパインの機能・形態にどのような変化を与えるのか? そして、抗うつ治療 Arcadlin 誘導 p38MAP キナーゼ活性化 スパインのリモデリングという一連のメカニズムが、抗うつ効果に関与しているのか? これらの可能性について検討を行った。

### 3. 研究の方法

網羅的遺伝子発現解析によると、海馬で、抗うつ薬の慢性投与により発現誘導する遺伝子群と、電気けいれんにより即時誘導される遺伝子群は、異なっている。しかしながらそれら数多くの遺伝子の中で、arcadlin は両方の条件いずれにおいても劇的な発現誘導を示すことがわかった。我々の予備実験においても、Arcadlin 蛋白質が、電気けいれんのみならず、抗うつ薬 fluoxetine 慢性投与により海馬抽出物中に誘導されていることが確認できた。

前述したように、Arcadlin は神経活動に応答して神経回路のつなぎかえを担う接着分子なので(引用文献)、薬物・電気けいれんによる慢性・急性それぞれの抗うつ効果が、発現にいたる次のような過程:【抗うつ療法 Arcadlin 誘導 p38MAP キナーゼ活性化 スパインのリモデリング 抗うつ効果】を想

定し、この仮説の各段階を順次検討する実験を行った。

まず、本計画の端緒である、抗うつ薬による Arcadlin 誘導現象を多方面から確かめ、その基本的特性を明らかにした。電気けいれんでみられる Arcadlin 誘導プロフィールとの違い、神経活動で誘導される *arc* 等の最初期遺伝子との違いを明確にし、遅効性ならびに即効性両方の抗うつ療法における Arcadlin の重要性を探った。抗うつ薬 fluoxetine をマウスの腹腔内に投与し、海馬に発現した Arcadlin 他の分子をウェスタンブロットならびに免疫染色で検出した。

次に、海馬での Arcadlin 高発現は抗うつ効果と関与するのかどうかを確かめるために、マウスのうつ状態や不安を計測するモデル実験系を構築し、抗うつ薬の効果を評価した。その上で、Arcadlin ノックアウトマウスを用いた場合、抗うつ薬への反応性に変化がないかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

電気けいれんと抗うつ薬それぞれが治療効果を発揮するまでに要する時間が異なることをふまえ、マウスにおけるうつ病治療行為によって、海馬に Arcadlin が発現誘導されるのに必要な投与期間（オンセット）、効果持続期間（Duration）、投薬量（用量依存性）を明らかにした。

電気けいれんによる Arcadlin 蛋白質の発現誘導に必要な時間は4時間であり、その発現は12時間を過ぎると減じることが判明した。一方、抗うつ薬の場合は、連日の投与が18日を超えて初めて、顕著な Arcadlin 誘導が見られ、電気けいれんとの間にあきらかな時間的プロフィールの違いが認められた。また、慢性抗うつ薬投与による効果は3日間持続することもわかった。

これらの結果は、うつ病に対する治療効果が発現するタイミングと良く一致することから、Arcadlin を介した細胞生物学的メカニズムが、抗うつ効果の生物学的基盤となっている可能性が示唆された。また、その特異性も検討しており、神経活動で発現誘導されることが知られている最初期遺伝子 *arc* とは異なる発現プロフィールとなることも見出した。

次に、組織学的検討を進め、Arcadlin 蛋白質が、海馬の歯状回顆粒細胞ならびに CA1～CA3 錐体細胞の細胞体から樹状突起にわたって発現することを確認することができた。特に、シナプスを形成し、神経伝達といった神経回路機能に最も重要なスパインが形成される樹状突起部分にも Arcadlin が誘導されることを見いだした。

これらの部位で増加した Arcadlin が神経細胞シナプスにもたらす影響を検討するため、神経細胞の形態を色素でラベルし、シナプスを形成するスパインの数を計数する実験も進めた。現在、この方法を用い、抗うつ

薬の慢性投与によって誘導されるシナプスのリモデリングを明らかにすることを目指している。そして、その過程に Arcadlin が関与するか否かについて、Arcadlin 遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて検討している。

さらに抗うつ薬による治療効果を判定する手段として、マウスを用いた行動学的な解析を行った。うつ状態を反映するマウスの行動学的指標として強制水泳試験ならびに尾懸垂試験を行った。いずれも設定された状況、すなわちプール内で泳がなければならない状況や、尾で持ち上げられた状況から逃れられないと学習し、脱出のための行動をあきらめる時間を計ることで、うつ状態の一指標としての「学習性無力感」を数値化する方法である。

ストレスなどで増すと考えられる不安感の計測には、高架式十字迷路試験とオープンフィールド試験を行った。両者ともマウスが明るく開けた場所に不安や恐怖を感じ、壁の近傍に滞在する傾向をもつことを利用し、設定した行動領域内各所への滞在時間を計測することで、マウスが呈する不安傾向を数値化する手法である。

これらの方法を用い、C57BL/6 系統のマウスに長期間抗うつ薬を投与することで、行動学的な抗うつ・抗不安効果の発現を見ることが出来た。一方、短期間の抗うつ薬投与では抗うつ効果は見られず、Arcadlin の発現プロフィールと非常によく一致することが確かめられた。ちなみに、抗うつ薬の効果がこれらの行動実験で検出できるか否かは、マウスの系統によって異なることが知られている。たとえば C57BL/6 系統のマウスでは短期間の投与による抗うつ薬の効果は強制水泳試験で検出できないことが知られており、我々のデータと一致する。

引き続き *arcadlin* 遺伝子を欠損したマウスの行動解析を行ったところ、抗うつ作用が野生型と同様に見られたため、抗うつ作用発現の過程に Arcadlin の発現が必須ではないことが判明した。Arcadlin 欠損はむしろ抗うつ薬による行動学的変化を助長する傾向が見られた。このことから抗うつ薬で誘導される Arcadlin は、行動学的な抗うつ作用に拮抗するメカニズムに関与することが示唆される。

図2に示すように、うつ病で機能不全に陥っているとされるアミン神経が投射する海馬などの辺縁系や前頭前皮質は、うつ病で萎縮する反面、抗うつ治療で拡大する。また、それらの内部で神経回路を形作るスパインの密度や樹状突起の枝分かれの複雑さなども、うつ状態で減少し、回復とともに増加することが報告されている。

一般的な抗うつ薬はアミン神経の活動性を上げることを介して、また電気けいれんは直接または別の経路を介して、海馬や前頭前皮質の機能・体積・スパイン密度を回復させ

ると考えられる。Arcadlin はこれらの治療的  
刺激により、回復過程と並行して海馬神経細  
胞内に誘導されるが、海馬機能の回復に直接  
関与するのではなく、むしろスパイン密度を  
減少させるなど、回復過程に対して拮抗的に  
作用すると考えられた。

これらのことを総合すると、うつ病におい  
て Arcadlin の機能を抑制的に修飾するこ  
とができれば、より効果的な治療に結びつけ  
られると期待される。

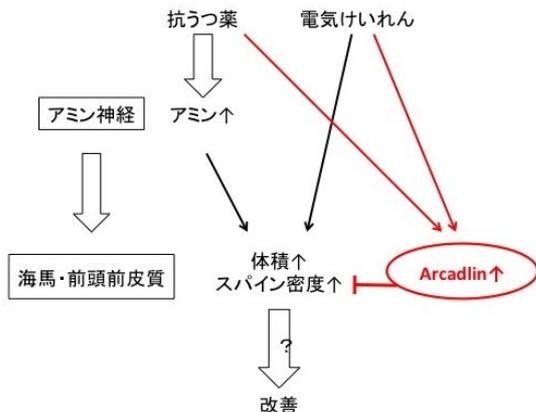


図2. うつ病の治療で Arcadlin は海馬神経細  
胞内に誘導され、スパイン密度や抗うつ作用  
に拮抗的に作用する。

#### < 引用文献 >

- Okamura, Tanaka et al., J Cell Biol. 167:961-72 (2004).  
Tanaka et al., Neuron 25:93-107 (2000).  
Yasuda, Tanaka et al., Neuron 56:456-71 (2007).  
Duric et al., Nat Med. 16:1328-32 (2010).

#### 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 15 件)

- 田中秀和. 抗うつ薬による樹状突起ス  
パインのリモデリング. 脳 21. 18: 198-202  
(2015). 査読なし.  
Oda A, Tanaka H. Activities of  
nicotinic acetylcholine receptors  
modulate neurotransmission and  
synaptic architecture. Neural Regen  
Res. 9: 2128-2131 (2014). 査読あり.  
Yasuda S et al (10 人中 5, 10 番目).  
Activation of Rheb, but not of mTORC1,  
impairs spine synapse morphogenesis in  
tuberous sclerosis complex. Sci Rep.  
4:5155 (2014). 査読あり.  
Oda A et al (9 人中 2, 9 番目). Nicotine  
induces dendritic spine remodeling in  
cultured hippocampal neurons. J  
Neurochem. 128: 246-255 (2014). 査読

あり.

田中秀和. シナプス構造はうつ病治療の  
標的となるか? ~抗うつ治療によって海  
馬神経回路シナプスのリモデリングが起  
きる可能性~. 日薬理誌. 142: 112-115  
(2013). 査読あり.

田中秀和. 脳とニコチン. 脳 21. 15:  
79-85 (2012). 査読なし.

Tanaka H et al (8 人中 1 番目). Linkage  
of N-cadherin to multiple cytoskeletal  
elements revealed by a proteomic  
approach in hippocampal neurons.  
Neurochem Int. 61: 240-50 (2012). 査  
読あり.

田中秀和. カドヘリンによるシナプスの  
リモデリング. 日薬理誌. 139: 93-98  
(2012). 査読あり.

(ほか 7 件)

#### [ 学会発表 ] (計 26 件)

秦侑希ら (9 人中 9 番目). 抗うつ薬に  
よって誘導されるプロトカドヘリン  
Arcadlin がうつ・不安関連行動ならびに  
海馬スパイン形態に及ぼす影響. 第 38  
回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本  
神経化学会大会合同年会. 2016/9/9. 福  
岡国際会議場(福岡市).

井次陸ら (6 人中 6 番目). 神経活動依  
存性プロトカドヘリン Arcadlin の 2 つの  
プライスバリエーションの発現調節. 第 38  
回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本  
神経化学会大会合同年会. 2016/9/9. 福  
岡国際会議場(福岡市).

秦侑希ら (9 人中 9 番目). 抗うつ薬に  
よって誘導されるプロトカドヘリン  
Arcadlin がうつ・不安関連行動ならびに  
海馬スパイン形態に及ぼす影響. 第 129  
回日本薬理学会近畿部会. 2016/6/24.  
広島県医師会館(広島市).

井次陸ら (6 人中 6 番目). 神経活動依  
存性プロトカドヘリン Arcadlin の 2 つの  
プライスバリエーションの発現調節. 第 129  
回日本薬理学会近畿部会. 2016/6/24.  
広島県医師会館(広島市).

内村尚登ら (9 人中 9 番目). アルカドリ  
ン/プロトカドヘリン 8 はフルオキセチ  
ンの抗不安作用に拮抗する. 第 89 回日本  
薬理学会年会. 2016/3/9. パシフィコ横  
浜(横浜市).

田中秀和. 抗うつ薬と接着分子によるシ  
ナプスの構造変化. 第 86 回日本薬理学  
会年会. 2013/3/21. 福岡国際会議場  
(福岡市).

田中秀和、金井好克. ニコチンによる海  
馬神経細胞スパインの形態変化. 第 54  
回日本神経化学会大会. 2011/9/27. 山  
代温泉瑠璃光(加賀市).

田中秀和ほか 3 名. ニコチンによる海馬  
神経細胞スパインの形態変化. 第 119 回  
日本薬理学会近畿部会. 2011/7/8. 愛知

県産業労働センター(名古屋市).  
(ほか 18 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 秀和 (TANAKA, Hidekazu)  
立命館大学・生命科学部・教授  
研究者番号：70273638

(2)研究分担者

山形 要人 (YAMAGATA, Kanato)  
公益財団法人・東京都医学総合研究所・シ  
ナプス可塑性プロジェクト・プロジェクト  
リーダー  
研究者番号：20263262