

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 5月19日現在

機関番号：20101
研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23591677
研究課題名(和文) 脳を育てるうつ病治療：中枢⇄末梢両面からの脳神経回路網修復促進機構の解明
研究課題名(英文) Study on the improvement of neural network disruption in depression.
研究代表者
橋本 恵理 (HASHIMOTO, Eri)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30301401
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病治療の新たな試みとして、神経新生促進因子の中⇄末梢両面からの活用を目指し、神経幹細胞およびBDNFの末梢から脳内への移行を検討した。また、抗うつ薬によりヒト血小板からのBDNF遊離は促進されるが、その反応には個人差があり、抗うつ薬の種類でも異なることから、薬物治療反応性の予測に有用である可能性が示唆された。更に、治癒メカニズムに関与する遺伝子として、rhotekinおよびPrg1が神経幹細胞から神経細胞への分化過程や神経細胞の維持等に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effective treatment way of cellular biodistribution of stem cells and BDNF into the brain after intravenous injection. We analyzed the influence of antidepressants on platelet BDNF release and found that BDNF release from platelets may be useful for screening the most suitable antidepressant by predicting an individual response to antidepressant treatment. We also investigated the expression of rhotekin and Prg1 in adult rat brain and found that they may play important roles in neurogenesis.

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：神経科学、脳・神経、うつ病、抗うつ薬、神経新生

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに抗うつ薬がBDNF (brain-derived neurotrophic factor:脳由来神経栄養因子)等の発現変化や転写因子の活性調節等を介して神経新生促進に働いている可能性を示し、神経幹細胞の活性化を介した神経回路網の修復・再生による治療に関する研究を進めてきた。BDNFは脳内のみならず末梢血中にも多く存在し、その多くが血小板で貯蔵・放出される。モデル動物を用いた検討で、抗うつ薬刺激により血小板からのBDNF遊離が促進されて末梢血中のBDNFが増加することを既に報告しているが、BDNFは血液脳関門を通過し、その血中濃度は脳内濃度を反映することが推察されている。そのため、末梢血中のBDNFが脳内へ移行して作用している可能性が示唆されており、その治療応用も期待される場所であるが、末梢BDNF変化が脳に与える影響およびその作用機序は未だ不明である。神経新生を促進する因子は、うつ病

治療の新たな標的となる可能性があり、これらの因子の検討により、脳内神経回路網の再生を介した治療法につながることを考えられる。また、これらの因子の抗うつ薬刺激による評価を活用して、例えば、うつ病患者における薬物治療反応性を予測することが可能となれば、より適切な個別化治療への展開へとつながり、治療法の選択や優先順位決定に大きく寄与するものと考えられる。

2. 研究の目的

うつ病に対する統合的な治療戦略の確立を目指して、BDNFをはじめとする神経新生促進因子を中枢⇄末梢両面から治療的に活用するという発想に基づいて、脳を育てるという視点から、脳神経回路網修復機構を解明し、臨床応用へとつなげることを目的とする。

(1) BDNFが中枢⇄末梢双方向で果たす役割を解明するため、蛍光標識したBDNFを用いて、

末梢 BDNF 投与後の脳内移行に関して検討する。あわせて、末梢から投与した神経幹細胞の脳内移行に関し、アテロコラーゲンの有用性について検討する。

(2) 神経新生促進時の中枢における変化を分子レベルで把握する試みとして、抗うつ薬長期投与によりラット脳内で発現が変化する遺伝子をスポットした ADRG (antidepressant related gene) microarray を用いて、神経幹細胞分化時に選択的に発現変化する遺伝子をスクリーニングし、その機能、特に神経幹細胞の増殖、神経への分化および神経細胞の生存維持について検討する。

(3) これまでにモデル動物において確認している抗うつ薬添加時の血小板からの BDNF 遊離に関して、ヒト血液サンプルを用いて検討し、薬物治療反応性を含めた生物学的マーカーとしての可能性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 成体ラットを用いて、蛍光標識した BDNF (BDNF-FITC) を末梢から経静脈的に投与し、脳内移行および脳内での動態の検討を行った。次に、これまでに我々が精神疾患モデルラットに対して経静脈的に神経幹細胞移植を行ってきた方法で末梢から神経幹細胞を投与する際の、より効率的な脳へのデリバリーシステムとして、アテロコラーゲンに着目し、末梢からの神経幹細胞を投与した際の脳内への移行について、 $[^{35}\text{S}]$ -methionine ラベルした神経幹細胞を用いて、アテロコラーゲンの添加の有無の影響を検討した。

(2) 神経新生促進関連遺伝子の抽出のため、ラット胎仔より神経幹細胞を調製・培養し、L-glutamine, B-27 含有 Neurobasal 培養液で播種することにより神経細胞への分化を誘導した。分化誘導 0, 24, 48, 96 時間後の細胞において発現変化する遺伝子を ADRG microarray を用いて探索した。得られた遺伝子 rhotekin, Prg1 について、各 siRNA を用いて発現を抑制した時の神経幹細胞の増殖、神経細胞への分化、生存・維持に対する影響を検討した。

(3) 書面にて同意を得た健常者およびうつ病患者 (DSM-IV-TR: 大うつ病性障害の診断基準を満たすもの) から血液を採取し、血小板分画を得て調整した血小板に抗うつ薬 (sertraline, paroxetine, fluvoxamine, milnacipran) をそれぞれ添加し、その際の血小板からの BDNF 遊離の変化について検討した。BDNF の測定には BDNF ELISA Kit (R&D 社) を用いた。

4. 研究成果

(1) 成体ラットへの BDNF-FITC 経静脈的投与 24 時間後に、ラット海馬歯状回に BDNF-FITC の集積が認められた (図 1)。また、神

経幹細胞を末梢から投与した場合も脳内への移行が確認され、一部は神経細胞の形態を有していた。

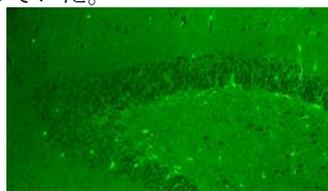


図 1. ラット海馬歯状回における BDNF-FITC の集積

次に、神経幹細胞の投与が神経回路網の修復の観点から治療的に有効である可能性をふまえ、経静脈的に投与した神経幹細胞の脳内への移行性を高める方法として、アテロコラーゲンの有用性を検討した。培養神経幹細胞へ 72 時間アテロコラーゲンを処置した場合には、アテロコラーゲン濃度 0.01~0.05% の範囲において、神経幹細胞の生存、増殖および遊走の各機能に対し有意な変化は認められないが、0.03~0.05% のアテロコラーゲン処置では神経幹細胞から神経細胞への分化の有意な減少が認められることを既に確認している。よって、ラットに対する経静脈的神経幹細胞移植時の脳内移行について、0.02% のアテロコラーゲン処置を行った場合と行わない場合について比較したところ、アテロコラーゲン処置群では、非処置群と比べて脳内への神経幹細胞の移行が有意に増大していた。

アテロコラーゲンは、免疫原性が極めて低く成体適合性が高いバイオマテリアルであり、近年核酸医薬デリバリーシステム等においてその汎用性および安全性から担体としての臨床応用が期待されている。本研究成果から、アテロコラーゲンは神経幹細胞移植におけるより効率的な脳へのデリバリーシステムとして有用であることが示唆された。

(2) 分化誘導後の神経細胞において発現変化する ADRG のスクリーニングを行い、0, 24, 48, 96 時間後に発現増加が認められた rhotekin と、96 時間後の発現変化率が大きかった Prg1 について、機能解析を行った。

はじめに、細胞に rhotekin siRNA をトランスフェクションし、rhotekin の発現が抑制されることを確認した。そこで、神経幹細胞から神経細胞への分化過程の生存に対する rhotekin siRNA のトランスフェクションの影響を検討した。生存率は、rhotekin siRNA のトランスフェクション 72 時間以降、有意な減少が認められた (図 2)。そこで、生存率には影響しない 48 時間後における分化率、および神経突起長を検討した。その結果、いずれも対照群に比べ rhotekin siRNA のトランスフェクション群において有意に減少し

た(図3)。次に、神経幹細胞の増殖における rhotekin siRNA の影響を調べた。BrdU 陽性細胞数を測定した結果、rhotekin siRNA のトランスフェクションにより有意に増加した(図4)。これらのことから、rhotekin は、神経幹細胞から神経細胞への分化過程において、神経突起の伸長や神経細胞の生存等、さまざまな機能を有することが明らかとなった。

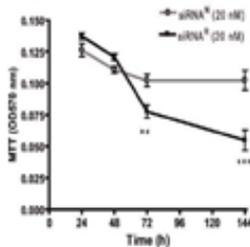


図2. rhotekin siRNA トランスフェクションによる分化神経細胞の細胞死

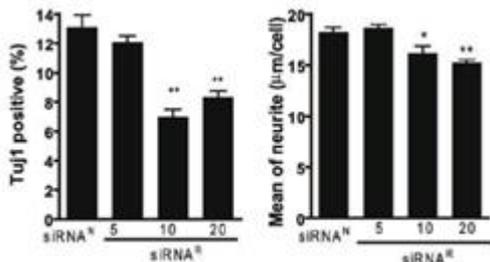


図3. rhotekin siRNA トランスフェクションによる神経細胞への分化率の減少と神経突起長の減少

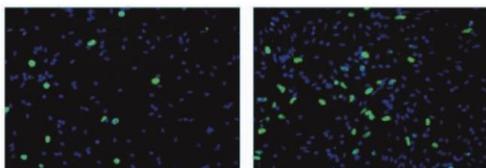


図4. rhotekin siRNA トランスフェクションによる神経幹細胞増殖の増加

次に Prg1 について、細胞に Prg1 siRNA をトランスフェクションし、Prg1 の発現が抑制されることを確認した。神経細胞の生存率は、Prg1 siRNA のトランスフェクション 24 時間以降 96 時間まで有意に減少した。この減少は、この siRNA の標的にならない Prg1-4S を共発現させるにより消失した(図5)。一方、siRNA の標的にならず、かつ、253 番目のアミノ酸をヒスチジンからアラニンに置換した Prg1-4S-H253A を共発現させても、消失は認められなかった(図6)。253 番目のヒスチジンは脂質の脱リン酸化活性に重要であるという報告があることから、Prg1 の神経細胞

の生存維持作用にも脱リン酸化活性が関与することが示唆された。

これらの結果から、うつ病の治療メカニズムには、神経新生の過程の中の神経幹細胞の増殖に加えて、神経幹細胞から神経細胞への分化過程や神経細胞の生存、維持も関与することが示唆された。

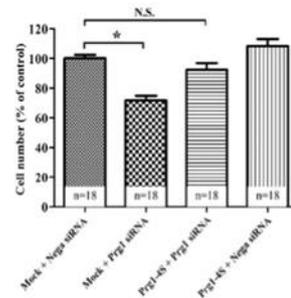


図5. Prg1 siRNA トランスフェクションによる神経細胞生存率の減少と Prg1-4S 共発現による回復

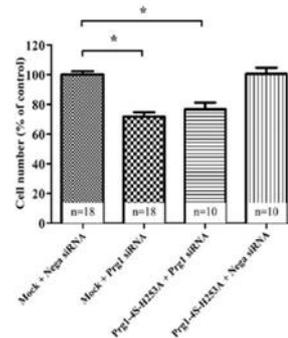


図6. Prg1 siRNA トランスフェクションによる神経細胞生存率の減少は Prg1-4S-H253A の共発現では回復しない

(3) 健常者から得た血液サンプルを用いた検討では、血小板からの BDNF 遊離反応は、添加した抗うつ薬の種類により異なり、その反応性には個体差が認められた(図7)。

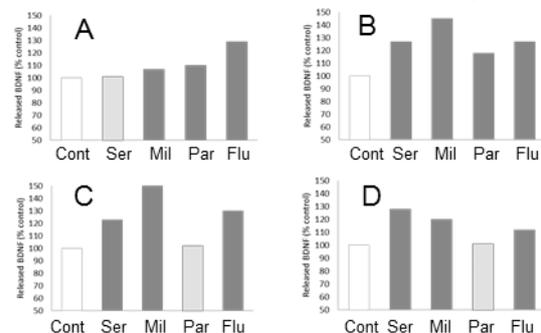


図7. 健常者4名(A~D)における各抗うつ薬(Ser: sertraline, Mil: milnacipran, Par: paroxetine, Flu: fluvoxamine)添加時の血小板からの BDNF 遊離反応

すなわち、特定の個人にとって、血小板からの BDNF 遊離をおこす作用が強い抗うつ薬と弱い抗うつ薬があることが示され、このことが、個人の薬物有効性と関連するのではないかと考えられた。そこで、既に特定の抗うつ薬に対する治療反応性を認めた患者の血小板を用いて同様の検討を行ったところ、薬物治療反応性と血小板 BDNF 遊離反応が正の相関を示す可能性が示唆された。この点の検討のためには、対象者を増やした上での前方視的な評価を行うことが望ましいと思われる。

うつ病患者において、血清 BDNF 濃度が健常者と比較して有意に減少していることが報告されており、うつ病患者における血清 BDNF 濃度の低下には、血小板からの BDNF 放出の減少が関与していることが考えられる。また、うつ病患者において、抗うつ薬治療による症状改善に伴って血中 BDNF 濃度が上昇するとの報告もあるが、血小板からの BDNF 遊離を促進する抗うつ薬には個体により異なるという本研究成果と考え合わせると、治療に用いる抗うつ薬の選定にあたって事前に血小板からの BDNF 遊離反応を検討することで、特定の個人にとって治療上より有効な薬物を予測できる可能性がある。すなわち、抗うつ薬刺激による末梢因子評価の活用によって、薬物治療反応性の予測に加え、より適切な治療法の選択等、個別化治療への展開を含んだ臨床応用へと結びつくことが期待される知見が得られた。

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 15 件)

- ① Hashimoto T, Yamada M, Imai T, Saitoh A, Hashimoto E, Ukai W, Saito T, Yamada M. Plasticity-related gene 1 is important for survival of neurons derived from rat neural stem cells. *J Neurosci Res*, 査読有, 91, 2013, 1402-1407. DOI: 10.1002/jnr.23269.
- ② Yoshinaga T, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Shirasaka T, Kigawa Y, Tateno M, Kaneta H, Watanabe K, Igarashi T, Kobayashi S, Sohma H, Kato T, Saito T. Effects of atelocollagen on neural stem function and its migrating capacity into brain in psychiatric disease model. *J Neural Transm*, 査読有, 120, 2013, 1491-1498. DOI: 10.1007/s00702-013-1010-4.
- ③ Iwai T, Saitoh A, Yamada M, Takahashi K, Hashimoto E, Ukai W, Saito T, Yamada M. Rhotekin modulates differentiation of cultured neural stem cells to

neurons. *J Neurosci Res*, 査読有, 90, 2012, 1359-1366. DOI: 10.1002/jnr.23029.

[学会発表] (計 34 件)

- ① Saito T, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Kigawa Y, Furuse K, Tsujino H, Kobayashi S, Yoshinaga T. Effects of ethanol and antidepressant on the platelet BDNF release function in the peripheral blood: Implication in the pathogenesis of psychiatric disease. In: 52nd Annual Meeting of the American College of Neuropsychopharmacology: 2013 Dec 8-12: Florida, U.S.A.
- ② Saito T, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Kigawa Y, Furuse K, Tsujino H, Kobayashi S, Yoshinaga T. Alteration of platelet BDNF release function in the peripheral blood. In: The 3rd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology: 2013 Sep 11-14: Beijing, China.
- ③ Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Kigawa Y, Yoshinaga T, Watanabe K, Shirasaka T, Tateno M, Kobayashi S, Saito T. Basic aspects of alcohol use disorder comorbid with depressive disorder. In: [Symposium] Alcohol abuse comorbidity. In: 14th Congress of ESBRA: 2013 Sep 8-11: Warsaw, Poland.
- ④ Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Watanabe K, Shirasaka T, Kaneta H, Kigawa Y, Yoshinaga T, Tateno M, Saito T. Usage of peripheral-derived cytokine as a marker and treatment approach for neural plasticity change in alcohol-induced brain damage and depression. In: [Symposium] Translational perspective on the imaging, epigenetics and peripheral-derived markers for alcohol induced brain damage and depression. In: 11th World Congress of Biological Psychiatry: 2013 June 23-27: Kyoto, Japan.
- ⑤ Ukai W, Hashimoto E, Shirasaka T, Kaneta H, Igarashi T, Kigawa M, Watanabe K, Yoshinaga T, Tateno M, Ishii T, Saito T. Peripheral intravenous therapy for psychiatric diseases: regeneration of damaged neural network by ethanol and depression. In: 35th Annual Scientific Meeting for Research on Alcoholism: 2012 June 23-27: San Francisco, U.S.A.

[図書] (計3件)

- ① 橋本恵理、医薬ジャーナル社、気分障害の薬理・生化学～うつ病の脳内メカニズム研究:進歩と挑戦～、2012、pp153-155.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 恵理 (HASHIMOTO, Eri)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30301401

(2) 研究分担者

鵜飼 渉 (UKAI, Wataru)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：40381256

山田 美佐 (YAMADA, Misa)
独立行政法人国立精神・神経研究センター
・精神保健研究所・研究員
研究者番号：10384182