

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791355

研究課題名(和文) ヘルペスウイルスを利用した新規双極性障害動物モデルによる、気分障害発症機序の研究

研究課題名(英文) Study on mood disorder pathogenesis using a novel animal model of bipolar disorders expressing protein of human herpesvirus.

研究代表者

小林 伸行 (KOBAYASHI, Nobuyuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20385321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)の潜伏感染タンパクSmall protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6(SITH)-1をマウスアストロサイトに発現させることでうつ様行動を引き起こした。その脳で遺伝子発現を調べたところ、炎症性サイトカインの変化はなかった。一方、気分障害患者では血液中炎症性サイトカインmRNA発現とうつ症状は相関を示した。以上より、中枢神経と末梢血での遺伝子発現は必ずしも一致せず、末梢での炎症反応が波及的に中枢神経に影響し、SITH-1発現を誘導することでうつ症状を引き起こす可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of Human herpesvirus (HHV-)6 (SITH) -1, a latent transcript of HHV-6, causes depressive-like behavior by being expressed in mouse astrocytes. Inflammatory cytokine mRNA levels did not change in the brains of mice. On the other hand, inflammatory cytokine mRNA blood levels and depressive symptom severity were correlated with mood disorders in human patients. Gene expression in peripheral blood and the central nervous system (CNS) do not necessarily coincide. Systemic inflammation affects the CNS and induction of SITH-1 may cause depressive symptoms.

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：双極性障害 気分障害 ヒトヘルペスウイルス6 SITH-1 動物モデル 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) はじめに

ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6は突発性発疹の原因ウイルスであり、ほとんど全てのヒトに2歳までに感染し、その後マクロファージや脳内アストロサイトで潜伏感染を成立させている。また、このHHV-6とポリオーマウイルス科JCウイルスのみ脳内で潜伏感染することが知られているが、これらのウイルスが潜伏感染時に脳に与える影響は不明であった。

HHV-6が脳内アストロサイトに潜伏感染すること、HHV-6脳炎の後遺症では、重篤な精神症状を伴うこと、HHV-6はうつ症状を併発しやすい慢性疲労症候群(CFS)との関連が多数報告されていること、以上から、我々はHHV-6が精神疾患と関連することを疑い、研究を開始した。

(2) HHV-6 潜伏感染遺伝子 SITH-1 の発見

我々はHHV-6が潜伏感染時に発現する新規ウイルス遺伝子をいくつか発見した。その中で、Small protein encoded by the intermediate stage transcript of HHV-6(SITH)-1と名付けた潜伏感染遺伝子は、アストロサイト特異的に発現することがわかった。精神疾患患者でこのSITH-1に対する血清抗体価を測定したところ、気分障害とくに双極性障害で高率に抗SITH-1抗体が陽性となることがわかった。

(3)細胞レベルにおけるSITH-1の機能解析

SITH-1は脳で発現することが知られるCalcium-signal modulating cyclophilin ligand(CAML)と結合し、細胞内カルシウム濃度の異常な上昇を引き起こすことがわかった。気分障害の先行研究においても、カルシウムシグナルの異常が指摘されており、SITH-1は細胞内カルシウムシグナルの異常を介して、気分障害発症の素因となることが示唆された。

(4) SITH-1による双極性障害の動物モデルの作製

また、アストロサイト特異的に発現するglial fibrillary acidic protein(GFAP)プロモーター制御のアデノウイルスベクターによりSITH-1をマウス脳に発現させた。アデノウイルスベクター脳内投与3週後のSITH-1発現マウスでは、尾懸垂テストでの無動時間の短縮、prepulse inhibition(PPI)の障害(躁様症状)を認めた。一方、投与5週間では、尾懸垂テストでの無動時間の延長及び自発運動量の低下(うつ様症状)を認めた。これらのことから、SITH-1発現マウスは双極性障害の動物モデルとして有用と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、この新規双極性障害動物モデルを用いて、脳内の遺伝子発現変化を検討することにより、双極性障害の病態に関わる分子メカニズムを明らかにすること、遺伝子発

現解析の結果を用いて、ヒトでも応用可能な双極性障害診断のための新規バイオマーカーの開発を目指すこと、HHV-6潜伏感染遺伝子SITH-1が脳へ与える影響を解析し、HHV-6の潜伏感染と気分障害との関連を明らかにすること、以上を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルによる、SITH-1による脳内遺伝子発現変化の検討

アストロサイト特異的に働くGFAPプロモーター制御下でSITH-1を発現するアデノウイルスベクターを作成した。このアデノウイルスを生後24時間以内のマウス脳へ接種した。対照群として、SITH-1を発現しないアデノウイルスを接種した。成長後5週齢で、全脳よりRNAを精製した。realtime RT-PCRにて、神経栄養因子であるBrain-derived neurotrophic factor(BDNF)、Nerve growth factor(NGF)、Glial cell-line derived neurotrophic factor(GDNF)、炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL-)1、IL-6及び内在性コントロールとして-Actin(ACTB)のmRNA発現を測定した。

本研究は東京慈恵会医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

(2) 気分障害患者における、血液中遺伝子発現変化の検討

DSM-IV-TRにて、気分障害と診断された患者を対象に、血液を採取し、うつ症状をMontgomery-Åsberg Depression Rating(MADRS)にて評価した。全血から、RNAを精製し、realtime RT-PCRにて、IL-1、IL-6及び内在性コントロールとしてGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)のmRNA発現を測定した。

本研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 動物モデルによる、SITH-1による脳内遺伝子発現変化

GFAPプロモーター制御下でSITH-1をマウス脳に発現させることにより、脳内BDNFの低下を認めた(図1A)。しかし、その他の神経栄養因子であるNGF、GDNFは有意な変化を認めなかった(図1B,C)。

また、炎症性サイトカインであるIL-1、IL-6はSITH-1発現により有意な変化を認めなかった(図1D,E)。

これらのことから、SITH-1によるうつ様行動変化には中枢性の炎症性サイトカインの

関与は少ないことが示唆された。また、SITH-1 により BDNF が低下する機序は明らかではないが、BDNF の低下は気分障害の臨床研究等での報告と一致し、SITH-1 による行動抑制に関与することが考えられた。

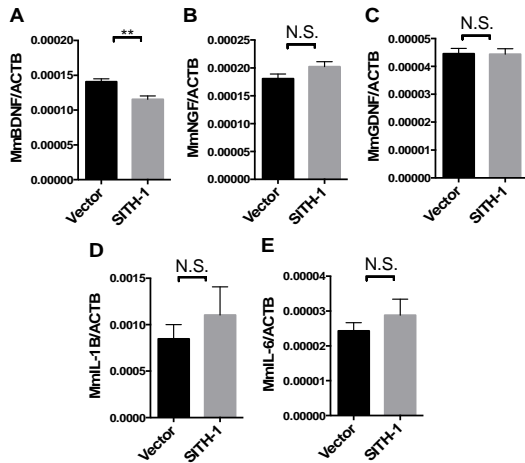


図 1. 動物モデルでの、SITH-1 による神経栄養因子及び炎症性サイトカインの変化

SITH-1 を発現させたマウス(SITH-1; n = 7) とその対照群として SITH-1 を発現しないアデノウイルスベクターを接種したマウス(Vector; n = 7)で、脳内の BDNF(MmBDNF)(A)、NGF(MmNGF)(B)、GDNF(MmGDNF)(C)、IL-1(MmIL-1B)(D)及び IL-6(MmIL-6)(E)の mRNA 量を示した。値は ACTB にて補正した。値は平均 ± 標準誤差、**P < 0.005、N.S.は有意差なし(対応のない t 検定)を示した。

(2) 気分障害患者における、血液中遺伝子発現変化とうつ症状との関連

気分障害 32 名を対象とした(女性 12 名、男性 20 名、年齢 52.3 ± 2.1 歳[平均 ± 標準誤差])。大うつ病性障害は 18 名、双極性障害は 14 名であった。

うつ症状の重症度を示す MADRS 合計スコアと血液中 IL-1 mRNA は有意差はないものの弱い相関を示す傾向を認めた(図 2A)。MADRS 合計スコアと血液中 IL-6 mRNA は弱い相関を認めた(図 2B)。すなわち、末梢性の炎症性サイトカイン量はうつ症状出現に関連することが示唆された。

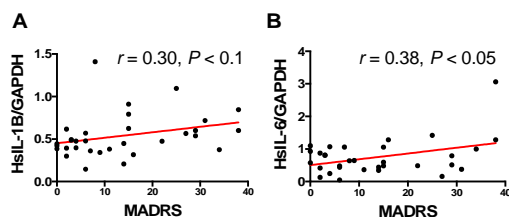


図 2. 気分障害患者における、うつ症状と血液中炎症性サイトカイン発現の関連

気分障害患者における MADRS 合計スコアとの血液中 IL-1 mRNA 発現(HsIL-1B)(A)または IL-6 mRNA 発現(HsIL-6)(B)との相関を示した。mRNA 値は GAPDH にて補正した。r は Pearson の相関係数、赤線は回帰直線を示した。

(3) 考察

本研究の結果から、SITH-1 によるうつ様行動には少なくとも中枢性の炎症性サイトカインは関与しないことがわかった。SITH-1 そのものがうつ様行動を引き起こす機序の一つとして、神経栄養因子である BDNF の低下を介して作用することが示唆された。

しかし、炎症性サイトカインと気分障害との関連が多数報告されていること、本研究でも血液中炎症性サイトカインとうつ症状の重症度が相関したことから、炎症性サイトカインが気分障害と何らかの関連を持つことは明らかであると考えられる。

ウイルス学的観点から、炎症性サイトカインは、HHV-6 の再活性化に作用し、SITH-1 発現を促進するものと考えられる。仮説として、末梢での炎症性サイトカイン発現が、波及的に中枢神経に作用し、SITH-1 発現を介することでうつ症状を引き起こす可能性が考えられた。

以上のことから、SITH-1 の発現を意味する抗 SITH-1 抗体価、炎症性サイトカインの値は気分障害診断のバイオマーカーとなり得るものと期待された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Nagata, T., Kobayashi, N., Shinagawa, S., Yamada, H., Kondo, K., and Nakayama, K. Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Journal of neural transmission*, 査読有, 2013.

DOI:10.1007/s00702-013-1121-y

Shimizu, A., Kobayashi, N., Shimada, K., Oura, K., Tanaka, T., Okamoto, A., and Kondo, K. Novel gene therapy viral vector using non-oncogenic lymphotropic herpesvirus. *PLoS One*, 査読有, 2013;8(2): e56027.

DOI:10.1371/journal.pone.0056027

Kobayashi, N., Nagata, T., Shinagawa, S., Oka, N., Shimada, K., Shimizu, A., Tatebayashi, Y., Yamada, H., Nakayama, K., and Kondo, K. Increase in the IgG avidity index due to herpes simplex virus type 1 reactivation and its relationship with cognitive function in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 査読有, 2013;430(3): 907-11.

DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.054

清水昭宏、小林伸行、嶋田和也、近藤一博、新規組み換えヒトヘルペスウイルス6B(HHV-6B)を用いた HHV-6B ゲノム組み込み 293T 細胞の樹立とヒトゲノム DNA への組み込み機構の解析. 東京慈恵会医科大学雑誌、査読有、2013;128 巻(1号): 41-52.
<http://hdl.handle.net/10328/7746>

Kobayashi, N., Nagata, T., Shinagawa, S., Nakayama, R., Kondo, K., Nakayama, K., and Yamada, H. Association between Neurotrophin-3 Polymorphisms and Executive Function in Japanese Patients with Amnesic Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer Disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 査読有, 2012;34(3-4): 190-97.

DOI:10.1159/000343075

小川智生、川嶋公成、清水昭宏、小林伸行、近藤一博、改良型遺伝子濃縮法によるヒトヘルペスウイルス6の前初期遺伝子および新規潜伏感染特異的遺伝子の同定、東京慈恵会医科大学雑誌、査読有、2011;126(1): 1-10.

<http://hdl.handle.net/10328/6567>

[学会発表](計4件)

小林伸行、岡直美、嶋田和也、近藤一博、アルツハイマー型認知症の前駆段階において単純ヘルペスウイルス1型再活性化が発症に与える影響、第61回日本ウイルス学会、2013年11月10日、神戸

小林伸行、鈴木豪、徳野慎一、山本泰輔、波多野弁、清水昭宏、嶋田和也、立花正一、近藤一博、疲労・ストレスによるヒトヘルペスウイルス(HHV-)6、7再活性化機構の検討、第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月13日、大阪

Kobayashi N, Shimada K, Shimizu A, Kondo K, Identification of SITH-1 as novel latent protein of Human Herpesvirus 6 (HHV-6) associated with

chronic fatigue syndrome (CFS) and mood disorders. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, 15 September 2011, Sapporo
小林伸行、精神科領域から見た疼痛-身体表現性障害と慢性疲労症候群-、第40回日本女性心身医学会学術集会、2011年7月24日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 伸行 (KOBAYASHI, Nobuyuki)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：20385321