

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500445

研究課題名(和文) PTSD発症における新規活性酸素産生酵素の役割解明と治療への応用

研究課題名(英文) The role of ROS-generating enzyme on the psychiatric disorders

研究代表者

衣斐 督和 (Masakazu, Ibi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10336539

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)：近年、精神疾患への活性酸素種(ROS)の関与が示唆されているが、その産生源および制御機構については未だ不明である。そこで本研究はNOX1/NADPHオキシダーゼが精神障害発症に寄与すると想定し、Nox1遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。

NOX1はうつ様行動発現に寄与することが示された。本研究を通じてNOX1が関与する脳領域および神経回路が明らかとなり、さらにその調節機序としてNOX1由来ROSのレドックス制御によるエピゲノム変化を介してうつ様行動発現に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The involvement of reactive oxygen species (ROS) in psychiatric disorders has been reported. However, the source of ROS has not been identified yet. We investigated the role of NOX1/NADPH oxidase in the depressive-like behavior using mice deficient in Nox1 (NOX1-KO). When wild type mice (WT) were repeatedly subjected to social defeat, the social interactions were decreased (avoidance behavior). Similarly, chronic administration of corticosterone (CORT) reduced sucrose preference (anhedonia). These depressive-like behaviors were significantly suppressed in NOX1-KO. Increased level of NOX1 mRNA was observed in the ventral tegmental area of WT treated with CORT, while the level of NOX1 mRNA was unaltered in the prefrontal cortex (PFC). On the other hand, increased ROS level in PFC of CORT-treated WT was significantly attenuated in NOX1-KO. Concomitantly, decreased levels of BDNF mRNA was significantly blunted in PFC of NOX1-KO.

研究分野：薬理学

キーワード：精神疾患 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

古くより精神障害の発症機序として神経伝達物質の量的異常が提唱されてきた。しかし、量的異常を改善する既存薬物に抵抗性を示すうつが出現し、十分な治療効果が得られていない現状である。一方、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) にいたってはその発症機序が不明であり、有効な薬物は存在せず薬物療法は確立されていない。従ってこれら精神障害の発症機構の解明と新規作用点を有する治療薬の探索は精神障害の罹患率が増加する昨今、重要課題である。一方、これら精神疾患における酸化ストレスの関与が注目されているが (Ng F et al., *Int J Neuropsychopharmacol.*, 11:851-876, 2008)、その起源と分子機構については未だ明らかにされていない。

NADPH オキシダーゼは生体内の主要な活性酸素 (ROS) 産生酵素であり、その触媒サブユニット (NOX) には複数の分子種が存在する。NOX2 で構成される NOX2/NADPH オキシダーゼが産生する過剰な ROS は神経細胞死を惹起することより神経変性疾患に寄与するとされている。これに対し、新規分子種 NOX1 は ROS 産生能が低く、NOX2 由来の ROS とは異なるシグナル分子としての機能が想定されている。

ROS は膜タンパクや細胞内機能分子に直接作用してその構造や機能を変化させることで、チャネルやトランスポーター、転写因子、酵素蛋白の活性を変化させることが知られている。事実、申請者は NOX1 に由来する ROS が神経細胞の突起伸長を負に制御していること (Ibi et al., *Free Rad Biol Med.*, 40:1785-1795, 2006) PKC の Cys 残基のジスルフィド結合形成を介しその膜移行を促進することで痛覚過敏を誘発すること (Ibi et al., *J. Neurosci.*, 28:9486-9494, 2008)、モルヒネの鎮痛耐性を増大させること (Ibi et al., *J. Neurosci.*, 31:18094-18103, 2011) を見いだした。最近、NOX1 遺伝子欠損マウス (NOX1-KO) において拘束ストレス負荷による HPA axis の活性化および不安様行動の増加が抑制されること、さらに社会的敗北ストレスによるうつ様行動の増加を見いだした。

2. 研究の目的

行動薬理的な解析においてストレスで引き起こされる不安様行動やうつ様行動に NOX1 が関与することを見出したことから、本申請では NOX1 による HPA axis の制御機構およびうつ様行動の制御機構を解明し、NOX1 由来の ROS の標的分子を同定する。

そして恐怖記憶の獲得・保持が PTSD の病態に関連することに着目し、恐怖記憶保持における NOX1 の役割とその制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各遺伝子発現の定量解析

不安・うつに寄与する脳部位または視床下

部スライスカルチャーから total RNA を抽出し、逆転写後、real time PCR にて定量解析を行った。

(2) 視床下部スライスカルチャーの作製

生後 5-6 日目の胎仔の PVN を含む視床下部の 300 μ m 冠状切片を作製し、Milli-Cell 上に整置し、50% EMEM/25% BSS/25% HS 中で 35°C, 5% CO₂ 環境下で 17 日間培養した。その後 75% EMEM/25% BSS 中で 4 日間培養し、forskolin (10 μ M, 6 時間) 刺激または高 KCl 刺激 (50 mM) を行い、切片を回収し、total RNA を抽出した。

(3) うつモデル作製

CORT を飲水に溶解し (35 μ g/ml) 21 日間投与した。

(4) NOX1 発現抑制ウイルスベクターの作製

NOX1 発現を抑制させる人工マイクロ RNA (miRNA) を (Invitrogen) にて作製した。この miRNA を pAAV-EF1a-DIO-EYFP にサブクローニングし、pAAV-RC と pHelper を HEK-293T 細胞にトランスフェクションすることで miRNA を発現する AAV を作製した。

(5) DNA メチル化解析

DNA メチル化は bisulfate-sequence 法により行った。

(6) レドックスプロテオミクス

Cleavable ICAT reagent kit (ABSciex) を用いて各サンプルを標識し、LC-MS にて同定されたペプチドをもとに、酸化修飾されたタンパクの同定をおこなった。

(7) 恐怖条件付け試験

文脈的恐怖条件付け試験にて恐怖記憶保持について検討した。具体的にはマウスをチャンパー内に入れ 180 秒経過後、0.2mA、1 秒間のフットショックを与えた。24 時間後に同じチャンパーに入れて 300 秒間の文脈的暴露を行い、この間に見られるすくみ行動時間を計測した。

4. 研究成果

(1) NOX1 による HPA axis 制御機構の解明

拘束ストレスにより視床下部および、Forskolin 刺激した視床下部スライスカルチャーで、CRH mRNA 発現増加が WT で認められたが、NOX1-KO では認められなかったことから、NOX1 は視床下部で cAMP-CREB 経路を介して CRH 発現を制御することが推測された。この仮説を検証するため、スライスカルチャーを用いて、CREB の活性化を検討したところ、両遺伝子群で有意な差は認められなかった。本解析で用いたスライスカルチャーは成熟 CRH ニューロンを維持できるから有用である一方、層構造を維持しているため顕微鏡観察

が困難であること、CRH ニューロン以外のニューロンや細胞が含まれることなどから、両遺伝子群での差異がマスクされ、その結果、両遺伝子群で CREB 活性化の差異が認められなかったと想定される。そのため、本解析を遂行するにあたり、CRH を含有するニューロン由来不死化細胞 (CLU) を入手して解析する必要が有ると考えられる。

(2) NOX1 を介したうつ様行動制御機構の解明

NOX1 を介したうつ様行動発現に関わる脳部位および神経回路の同定

慢性コルチコステロン (CORT) 投与により前頭前野で NOX1 に依存した ROS 産生の増加が認められたが、NOX1 mRNA 発現増加は認められなかった。しかし、CORT 投与により腹側被蓋野 (VTA) で NOX1 発現が有意に増加した。そこで NOX1 発現を抑制する人工 miRNA を組み込んだ AAV を VTA に微量注入してうつ様行動および BDNF mRNA 発現について解析した。その結果、VTA での NOX1 発現抑制に応じて CORT によるうつ様行動発現が抑制されること、さらに PFC での BDNF 発現減少が抑制されることを見出した。本結果より、VTA での NOX1 発現増加と VTA-PFC の神経回路がうつ様行動発現に寄与するが明らかとなった。

うつ様行動発現における NOX1 の標的分子の同定

NOX1 由来 ROS による細胞内シグナルの制御機構としてタンパクの酸化修飾が想定される。多くのタンパクは酸化修飾により、その活性が変化する事が報告されている。そこで、NOX1 由来 ROS の標的分子の同定を、タンパクの酸化修飾の変動を指標に行った。本検討にはレドックスプロテオミクスによる網羅的解析を行った。その結果、慢性 CORT 投与により WT において NMDA 受容体サブユニット NR1 の ⁷⁴⁴Cys が酸化修飾され、NOX1-KO では修飾は認められなかった。

NOX1 を介した BDNF 発現抑制機構の解明

慢性 CORT 投与により PFC で BDNF mRNA 発現の減少が認められた。BDNF mRNA は異なる 5' UTR を有する数種のスプライスバリエーションから構成される。このうち慢性 CORT 投与を行ったところ、5' UTR に Exon III と Exon IV を有する BDNF mRNA の発現が減少したが、NOX1-KO では有意に抑制された。その機序の一つとしてプロモーター領域での DNA メチル化に注目し、解析を行った。慢性 CORT 投与により WT において Exon IV のプロモーター領域で DNA メチル化が増加したが、NOX1-KO では有意に抑制されていた。本領域のメチル化の増加と BDNF mRNA 発現減少との相関が多数報告されている。また脱分極刺激や NMDA 受容体活性化によりプロモーター領域での DNA メチル化が減少し、その結果、BDNF mRNA 発

現増加することも報告されている。上記 (2) の結果より、慢性 CORT 投与により NOX1 に依存した NR1 の酸化修飾が生じる。この酸化修飾により NMDA 受容体の活性が抑制されることから、「NOX1 由来 ROS NR1 酸化修飾 DNA メチル化増加 BDNF mRNA 減少 うつ様行動発現」といった機序が想定される。そこで今後更なる解析を行うことで、NOX1 が関わるうつ様行動発現機序の解明を目指したい。

(3) 恐怖記憶保持における NOX1 の役割とその制御機構の解明

フットショック 24 時間後におけるすくみ行動時間は両遺伝子群で差異は認められなかったことから、NOX1 は再固定化には関与しないことが明らかとなった。今後、消去学習における NOX1 の役割について解析を行う予定である。

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 6 件)

1. Zhu K, Kakehi T, Matsumoto M, Iwata K, Ibi M, Ohshima Y, Zhang J, Liu J, Wen X, Taye A, Fan C, Katsuyama M, Sharma K, Yabe-Nishimura C. NADPH oxidase NOX1 is involved in activation of protein kinase C and premature senescence in early stage diabetic kidney. *Free Radic Biol Med.* 83:21-30, 2015. (査読有) DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.009.
2. Katsuyama M, Ibi M, Matsumoto M, Iwata K, Ohshima Y, Yabe-Nishimura C. Cloiquinol increases the expression of VGF, a neuropeptide precursor, through induction of c-Fos expression. *J. Pharm. Sci.* 124:427-432, 2014. (査読有) DOI:org/10.1254/jphs.13271 FP
3. Iwata K, Ikami K, Matsuno K, Yamashita T, Shiba D, Ibi M, Matsumoto M, Katsuyama M, Cui W, Zhang J, Zhu K, Takei N, Kokai Y, Ohneda O, Yokoyama T, Yabe-Nishimura C. Deficiency of NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase leads to pulmonary vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:110-119, 2014. (査読有) DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302107.
4. Matsumoto M, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Zhang J, Zhu K, Nauseef WM, Yabe-Nishimura C. Characterization of N-glycosylation sites on the extracellular domain of NOX1/NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med.* 68:196-204, 2014. (査読有) DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.013.

5. Katsuyama M, Iwata J, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Clioquinol induces DNA double-strand breaks, activation of ATM, and subsequent activation of p53 signaling. *Toxicology*. 299:55-59, 2012. (査読有) DOI: 10.1016/j.tox.2012.05.013.
6. Matsuno K, Iwata K, Matsunomoto M, Katsuyama M, Cui W, Murata A, Nakamura H, Ibi M, Ikami K, Zhang J, Matoba S, Jin D, Takai S, Matsubara H, Matsuda N, Yabe-Nishimura C. NOX1/NADPH oxidase is involved in endotoxin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 53:1718-1728, 2012. (査読有) DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.590.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ibi M, Liu J, Yabe-Nishimura C. The involvement of NOX1/NADPH oxidase in the depressive-like behavior. The 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology. July 16, 2014. Cape town, South Africa.
2. Ibi M, Yabe-Nishimura C. The involvement of NOX1/NADPH oxidase in anxiety- and depressive-like behaviors induced by stress. 2014 Gordon Research Conferences on NOX Family NADPH Oxidases From NOX Mechanisms to Disease. May 19,20, 2014. Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy.
3. 衣斐督和、劉俊傑、矢部千尋 . うつ様行動における NOX1/NADPH オキシダーゼの役割 . 第 87 回日本薬理学会年会 . 2014 年 3 月 20 日 ; 仙台 .
4. 衣斐督和、松野邦晴、内牧弘祐、矢部千尋 . 不安様行動における NADPH オキシダーゼの役割 . 第 86 回日本薬理学会年会 . 2013 年 3 月 22 日 ; 福岡 .
5. Ibi M, Matsuno K, Uchimaki H, Yabe-Nishimura C. NOX1/NADPH oxidase is involved in the stress-induced anxiety-like behavior. Gordon Research Conference on NOX Family NADPH Oxidases-NOX biology and its translation to human disease and therapy. 2012. June 6; Waterville Valley, NH, USA
6. 衣斐督和、松野邦晴、松本みさき、矢部千尋 . NOX1/NADPH oxidase はモルヒネの鎮痛作用と耐性形成に関与する . 第 85 回日本薬理学会年会 . 2012 年 3 月 15 日 ; 京都 .

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pharmaco/gyoseki.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

衣斐 督和 (IBI MASAKAZU)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 10336539