

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700414

研究課題名(和文) 新たな躁鬱病モデル動物を用いたオフラベル薬の評価

研究課題名(英文) Off-label drug evaluation on the newly generated animal model mice for the bipolar disorders

研究代表者

上田 洋司 (Ageta, Hiroshi)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：40416649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、TGFファミリーの1つである内分泌ホルモンアクチビンの脳内における量的変化がシナプス構造、不安行動、神経新生、長期型 LTP、記憶形成に影響を及ぼす事を報告している。脳内アクチビンの下流因子を探索するために、独自に作製したアクチビン依存性躁鬱病モデルマウスを用いた網羅的解析を行った。その結果、多数の変動タンパクを同定し、翻訳後修飾の違いを見出した。更に、mRNA及びmiRNAアレイ解析を行った結果、多数の変動因子を見出した。今後は、オフラベル薬投与による変動分子群の影響を調べ、新たな躁鬱病治療薬を再定義する事を目指す。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the level of activin (one member of the TGF-beta super family) regulates the synaptic structure, anxiety-related behavior, adult neurogenesis, late-phase LTP and memory formation. To elucidate the downstream of activin signaling in the brain, we performed comprehensive analysis of activin-dependent animal models for bipolar disorders. As a result, we detected molecular variations and posttranslational modification on the brain of these mice. Furthermore, we performed DNA array analyses for mRNA and miRNA on these mice and detected fluctuating molecules. As a next step, we will assess these factors on the treatment of off-label drugs to activin-dependent animal models, and redefine a compound as new potential therapeutics for bipolar disorder.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学-融合基盤脳科学

キーワード：モデル動物 アクチビン 躁鬱病 プロテオミクス miRNA

1. 研究開始当初の背景

鬱病は生涯罹患率が約 10%と高い精神疾患であり、自殺へも繋がる疾患であるため重大な社会問題として提起されている。しかしながら、現行のセロトニン系やノルアドレナリン系の制御による抗鬱病薬では患者全体の 40%には効果がない。そのため、新たな機序の抗鬱病薬開発は社会的にも強い要望がある。

申請者は、TGFβ ファミリーの 1 つである内分泌ホルモンアクチビンの脳内における量的変化がシナプス構造、不安行動、神経新生、長期型 LTP、記憶形成に影響を及ぼし(JCS 2007, PLoS ONE 2008, Learning and Memory 2010)、前脳特異的アクチビン及びフォリスタチン(アクチビン阻害タンパク)過剰発現マウスが新規の躁鬱病モデルマウスになる事を報告した (PLoS ONE 2008)。アクチビンは脳内において多機能因子である事が分かっているが、アクチビンが脳内で作用する下流因子は不明である。申請者が独自に作製した前脳特異的フォリスタチン過剰発現マウス(以下 FSM)は、前脳特異的にアクチビン機能を阻害し不安行動を誘導する。逆に、前脳特異的アクチビン過剰発現マウス(以下 ACM)は、多動性を示し抗不安行動を示している。

本研究課題「新たな躁鬱病モデル動物を用いたオフラベル薬の評価」を行うために、FSM の脳をアクチビン機能が低下した鬱病モデルマウスの脳として使用し、ACM の脳をアクチビン機能が亢進した躁病モデルマウスの脳として使用する。コントロールとしては、ACM 及び FSM の同腹の野生型マウスを使用する。つまり、アクチビン機能の向上と低下という 2 方向にアクチビンレベルを変動させたマウス脳を使用する事で、アクチビンにより影響を受ける分子群を網羅的且つ非特異的な変動を排除した形で解析を行う事が可能である。

2. 研究の目的

新たな躁鬱病治療薬開発を目的として、次の 2 つの事を行う。申請者が作製した新規のアクチビン依存型躁鬱病マウスを用い網羅的プロテオミクス解析に基づいたバイオインフォマティクス解析を行う事で、躁鬱病に関わる変動因子の探索を行う。ヒトでの使用が認可されているが精神疾患薬としては未認可の経口投与且つ脳内作用可能な様々なオフラベル薬をアクチビン依存型躁鬱病マウスに投与し、上記解析で同定した変動分子群を指標とした薬物評価をする

3. 研究の方法

新たな躁鬱病治療薬開発を目的として、我々のグループが独自開発した脳内アクチビン依存性躁鬱病モデルマウスを用いて、網羅的解析を行った。使用する動物は、野生型(WT)、アクチビン過剰発現マウス(ACM)、アクチビン阻害マウス(FSM)の 3 群である。

タンパクレベルの解析として、新たな解析技術である iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification)解析、Blue Native page 及び OFFGEL 電気泳動、Phos-Tag 解析法を駆使して行った。

iTRAQ 解析は、ショットガン型のプロテオミクス解析である。タンパク同定と比較解析が同時に行えるという特徴がある。

Blue Native page による二次元電気泳動ではタンパク複合体を維持したままでの展開が可能であり、複合体形成の差異を判定する事が可能である。

通常の二次元電気泳動では高分子量の分離が難しい。OFFGEL 電気泳動法では、溶液状態で等電点移動を行うため、高分子も二次元展開が可能となる。

通常のプロテオミクス解析ではリボソーム、細胞骨格、プロテアソーム、ミトコンドリア成分などの因子がほとんどを占め、シグナル因子の差分同定が難しいという問題点がある。そこで、サンプル調製方法として、シナプス部位の変化を知るために、各種モデルマウスから P2 分画を精製し、ランダムペプチドカラムを用いて希少タンパクを濃縮した後解析サンプルとして使用した。

リン酸化部位が特定されていない分子に対しては、通常のエスタンプロット法では検討が難しい。Phos-Tag が含まれた電気泳動ゲルを使用することで、リン酸化レベルの差異を知る事が可能となるため、Phos-Tag ゲルによる解析手法も試みた。

アクチビンの下流因子が Smad 転写因子であることから RNA レベルの解析も行った。そして、Smad 転写因子が miRNA プロセッシング分子に作用する事から miRNA に対する網羅的アレイ解析を行った。

4. 研究成果

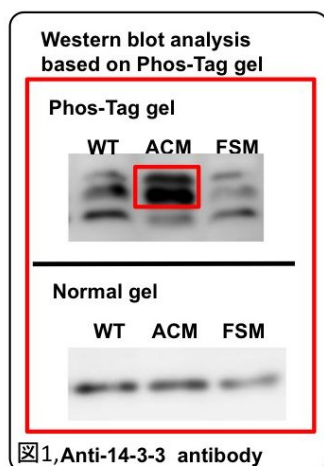
(1)アクチビン過剰発現マウスである ACM とアクチビン阻害タンパク過剰発現マウスである FSM から海馬を取り出し、シナプス部位での希少タンパクを iTRAQ 解析した所、アクチビン減弱に応じて増えるタンパクとして 85 個が同定され、アクチビン増加に伴って増加するタンパクとして 48 個が同定された。その中には、リン酸化酵素や細胞骨格制御因子のみならず、膜タンパクも含まれていた。

(2)(1)と同様に ACM と FSM 由来の海馬シナプスタンパクを Blue Native page により、複合体形成比較を行ったところ目立った差分は検

出されなかった。

(3)OFFGEL 電気泳動法による二次元電気泳動での比較において、11個のタンパクにおいて量的変動が確認された。さらに、アクチン、チューブリン、14-3-3などのタンパクが脳内アクチビン量依存的に、等電点移動することを見出した。

(4)上記、OFFGEL 電気泳動法で見られた脳内アクチビンに依存した等電点移動を、更に詳細に解析するために、Phos-Tag ゲルを用いたウェスタンブロット法による解析を行った。その結果、アクチンとチューブリンでは Phos-Tag ゲルによるバンドシフトを観察することは出来なかったが、14-3-3ではACMにおいて強いバンドシフトを観察することができた。このことから14-3-3での等電点移動はリン酸化によるものであることがわかった(図1)。



(5)WT, ACM, FSMから海馬 mRNAを精製し、アレイ解析を行った結果、多数の変動因子を同定できた。変動分子に対するパスウェイ解析から Wnt シグナルや Hedgehog シグナルとの関与が示唆された。そして、DNAアレイ解析とプロテオミクス解析で共通して変動する分子に対して、リアルタイムPCRによる検定を行ったが、再現よく有意変動する分子は見出せなかった。しかし、DNAアレイ解析で変動幅が大きい分子は、リアルタイムPCRにおいても再現よく脳内アクチビンに依存した変動を示した。この事は、mRNAでの変動と、タンパクレベルでの変動及び、翻訳後修飾による変動は独立した現象である事を示唆している。

以上の結果から、脳内アクチビンの量によって、多数分子がRNA及びタンパクレベルで変動するだけでなく、翻訳後修飾にまで影響を及ぼす事が判明した。さらに、今回の解析に

より、アクチビンシグナルカスケードが、14-3-3シグナル系へ影響を及ぼす可能性が新たに見出された。14-3-3はリン酸化タンパクを認識しシャトリングを行う分子として知られている。今回の研究により、アクチビンシグナルによって14-3-3自身がリン酸化される可能性が出てきた。14-3-3シグナルカスケードが細胞のサバイバル制御に関与していることから、アクチビン阻害によって海馬での神経新生が阻害されることとの関連性について、今後の研究が必要である。

本研究により、脳内アクチビン依存的に変動する分子群の同定が終了したので、今後は、これら変動分子群を指標にしたオフラベル薬の影響を調べ、論文投稿を行うことで、新たな躁鬱病治療薬を再定義する事を目指す。

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1件)

Daiki Ikeda, Hiroshi Ageta, Kunihiro Tsuchida, Harumoto Yamada
iTRAQ-based proteomics reveals novel biomarkers of osteoarthritis
Biomarkers,
査読あり, 2013 Nov;18(7):565-72.,
DOI:10.3109/1354750X.2013.810667

[学会発表](計3件)

Daiki Ikeda, Hiroshi Ageta, Kunihiro Tsuchida, Harumoto Yamada
iTRAQ-based proteomics reveals novel biomarkers of osteoarthritis
Osteoarthritis Research Society International,
2013年4月18-21日、Philadelphia, USA

上田洋司、高崎昭彦、井ノ口馨、
土田邦博
新しい躁鬱病モデルマウスに対する網羅的解析
日本RNAi研究会、2013年8月29-31日、広島、日本

Hiroshi Ageta, Tomoaki Kahyo, Mitsutoshi Setou, Kunihiro Tsuchida
The functional role of UBL3 in the brain.
ASCB Annual Meeting,
2013年12月14-18日
New Orleans, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 洋司 (AGETA, Hiroshi)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・
助教
研究者番号：40416649

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し