

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461744

研究課題名(和文) 転写因子MATH2およびその下流遺伝子Prg1を介したうつ病治療メカニズムの解明

研究課題名(英文) A study on the therapeutic mechanisms of depression through a transcription factor MATH2 and its target gene Prg1.

研究代表者

山田 美佐 (YAMADA, Misa)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・科研費研究員

研究者番号：10384182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、転写因子MATH2とその下流遺伝子Prg1を介したシグナル伝達系がうつ病の治療機転に関与することを示唆した。本研究では、未だ明らかとなっていないPrg1の機能を検討した。その結果、Prg1の脱リン酸化基質であるLysophosphatidic acid (LPA) のマウス脳室内投与が不安/うつ様行動を惹起すること、Prg1はうつ病の治療機転に重要な神経新生のプロセスの中で生存に関与すること、神経幹細胞が神経細胞へと分化した後に発現し機能することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that Prg1, the target gene of a transcription factor MATH2, was induced after chronic treatment with SSRI in mouse hippocampus. In the present study, we have demonstrated that LPA (i.c.v.), a lipid mediator inactivated by Prg1, induced emotional behaviors in mice. Prg1 was regulating the survival of neurons in the process of neurogenesis, which plays an important role in the antidepressive action. Finally, Prg1 expression was observed in NeuN-positive neurons but not with Nestin-positive neuronal stem cells in mouse dentate gyrus.

研究分野：医歯薬学

キーワード：精神薬理学 転写因子 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

抗うつ薬の作用メカニズムは、抗うつ薬による臨床効果発現に数週間を要することから神経可塑的变化が関与すると考えられるが、未だ明らかとなっていない。近年、「抗うつ薬投与による転写因子 cAMP response element-binding protein (CREB)のリン酸化亢進とこれに続く brain derived neurotrophic factor (BDNF)等の下流遺伝子の転写調節、さらに BDNF による神経新生等の機能変化」の一連の流れがうつ病の治療につながるという報告が多数なされ、うつ病治療メカニズム仮説として一定の評価を受けている。この仮説は、抗うつ薬の臨床効果発現に数週間を要するという点については説明できるものの、BDNF の発現増加が種々の抗うつ薬に共通する現象ではない点など矛盾点もある。一方、これまで我々は、転写因子 MATH2 が転写制御する下流遺伝子として Plasticity related gene 1 (Prg1) を同定した(Yamada et al., 2008)。また、MATH2 及び Prg1 が、複数の抗うつ薬の慢性投与によりラット脳内で共通して発現増加するが、単回投与では発現増加が認められないこと、抗精神病薬、躁病治療薬投与では発現変化しないことから、抗うつ薬の奏効機転に特異的に関与する可能性を報告し、抗うつ薬作用のメカニズムに MATH2-Prg1 を介した脳内機能変化が関与することを示唆した(Yamada et al., 2009)。しかし、Prg1 の機能についてはほとんど明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、Prg1 の機能を *in vivo*、*in vitro* の側面から検討することにより、MATH2-Prg1 を介したうつ病治療メカニズムを探ることを目的とした。はじめに、*in*

*vivo* の側面からの検討では、Prg1 の脱リン酸化基質である脂質メディエーターのリゾホスファチジン酸(LPA)の情動行動における効果を明らかとした。また、*in vitro* の検討では、Prg1 がうつ病の治療機転に重要であると報告されている神経新生の過程の中で生存に関与することから、マウス脳切片を用いて、Prg1 の脳内分布と神経新生に関与するタンパクとの共局在を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) LPA のマウス脳室内投与による情動行動変化

C57BL6N マウスに LPA(0.15、1.5、1.5 nmol; Sigma-Aldrich)を脳室内投与し、30 分後にホールボード試験を行った。また、抗不安薬のジアゼパム、LPA 受容体拮抗薬の BrP-LPA (Echelon Bioscience)を LPA と併用投与し、30 分後にホールボード試験を行った。

### (2) Prg1 siRNA の *in vivo* transfection による情動行動変化

発現抑制および機能抑制が *in vitro* で確認できた Prg1 siRNA (Thermo Fisher Scientific)を *in vivo* 用に調製し、トランスフェクション試薬 (Thermo Fisher Scientific) と混合後、C57BL6N マウス脳室内に投与した。脳を摘出し、前頭葉皮質、海馬を分画し、real time RT-PCR 法により発現定量を行い、トランスフェクションの条件を検討した。また、同様にトランスフェクションしたマウスの情動行動変化を検討し、発現定量を行った。

### (3) 神経幹細胞を用いた Prg1 の機能の検討

Wistar ラット(E14)の終脳より単離しニューロスフェア法により増殖させた神経幹細胞を bFGF 除去により分化させて神経細胞を作成した。分化誘導 24 時間後に Prg1 siRNA

を導入し、48 時間後に生細胞数を計測し生存維持における Prg1 の役割を検討した。

#### (4)マウス海馬歯状回における Prg1 の発現の検討

灌流固定したマウス脳スライス (40  $\mu$ m) を作製し、Prg1 と、Nestin、BrdU、doublecortin、NeuN、Tuj1、MAP2 との共局在を蛍光免疫 2 重染色法により検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) LPA のマウス脳室内投与による情動行動変化

研究計画では、*in vitro* における発現抑制と機能変化が認められた Prg1 siRNA を用いて、マウスの情動行動における機能を検討することとした。しかし、*in vivo* トランスフェクションを行ったところ、発現低下が認められたが、情動行動に対する効果が見られなかった。これは、Prg1 の脱リン酸化基質として報告されている LPA が、障害時には増加するが正常時には低濃度の維持されているためであると考え、LPA による情動行動変化を明らかとした上で Prg1 siRNA の効果を調べることにした。そこで、LPA の脳室内投与を行い、情動行動の評価系であるホールボード試験を行った。その結果、LPA は運動量に影響することなく、投与 30 分後に濃度依存的に head dip count を増加させたことから、情動行動変化を誘発することが明らかとなった (図 1 A)。

一方、head dip count の増加は抗不安薬投与でも見られることから、抗不安様作用の指標であるという報告と、うつ/不安モデルの嗅球摘出ラットにおいて head dip count の増加がみられることから不安/うつ惹起を示唆するという報告がある。

そこで、LPA による head dip count の増加が、抗不安様作用またはうつ/不安惹起のどちらを示唆するのかを検討するため、抗不安薬のジアゼパムとの併用投与を行った。その結果、LPA による head dip count の増加は、ジアゼパムの併用により消失した(図 1 B)。このことから、LPA の head dip count の増加は不安/うつを惹起していることが示唆された。さらに、LPA の head dip count の増加は、受容体拮抗薬の BrP-LPA で拮抗されたことから、LPA 受容体を介していることが明らかとなった (図 1 C)。

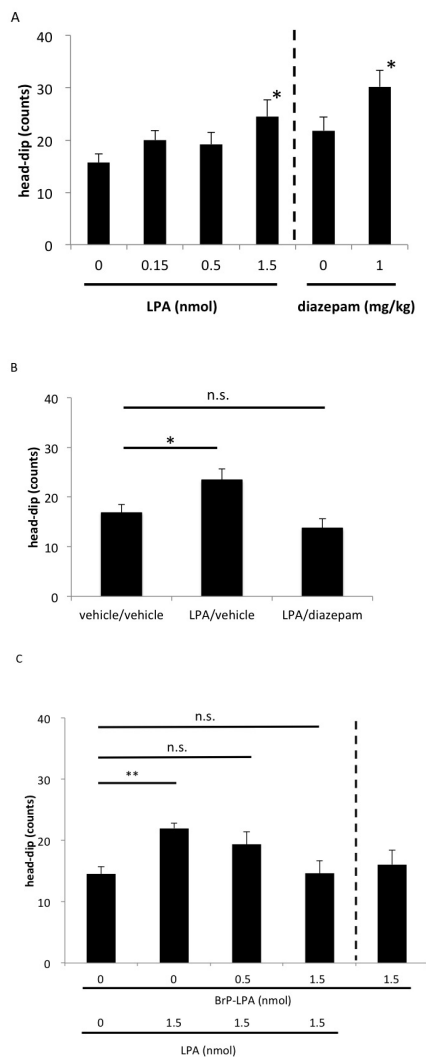


図 1 薬物の脳室内投与による情動行動変化 各薬物をマウス脳室内に投与し、30 分後にホールボード試験を行った。

## (2) Prg1 siRNA の *in vivo* transfection による情動行動変化

(1)で、LPA が情動行動変化を惹起することが明らかとなった。そこで、Prg1 発現を siRNA で低下させておくと、LPA による不安/うつがさらに悪化すると仮説を立て検討を行った。その結果、Prg1 発現の低下は認められたが、LPA により惹起された不安/うつ様行動のさらなる増悪は見られなかった。これは、LPA 単独での不安/うつ様作用が大きく、天井効果となっている可能性も考えられた。

## (3) 神経幹細胞を用いた Prg1 の機能の検討

Wistar ラット (E14) 終脳より単離した神経幹細胞を分化させることにより調製した神経細胞を使用して、生存維持における Prg1 の役割を検討した。分化誘導した神経細胞に Prg1 siRNA を導入し経時的に細胞数を計測した結果、24 時間後から生細胞数の減少が認められた。また、DNA の断片化が認められたことから、アポトーシスが起きていることが明らかとなった。

## (4) マウス海馬歯状回における Prg1 の発現の検討

マウス成熟脳における Prg1 の発現を蛍光免疫 2 重染色法により検討した。その結果、Prg1 は海馬歯状回の顆粒細胞に発現しており、Nestin、BrdU とは共局在しないが、doublecortin、NeuN、Tuj1、MAP2 と共局在することから、神経幹細胞が神経細胞へと分化した後に発現し機能すると考えられた (図 2)。

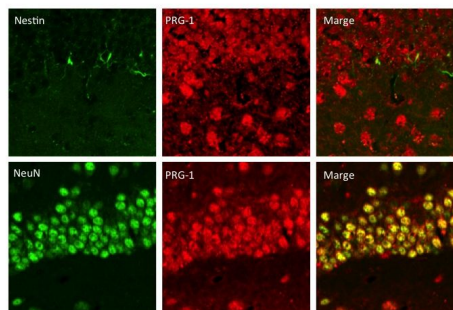


図 2 マウス成熟脳における Prg1 の発現  
灌流固定したマウス成熟脳スライスを作製し、Prg1 と、神経細胞の分化マーカーとの共局在を蛍光免疫 2 重染色法により検討した。

以上のことから、Prg1 の脱リン酸化基質である LPA が不安/うつ様行動を惹起すること、Prg1 はうつ病の治癒機転に重要な神経新生の中で生存に関与すること、神経幹細胞が神経細胞へと分化した後に発現し機能することが明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Lysophosphatidic acid induces anxiety-like behavior via its receptors in mice. Yamada M, Tsukagoshi M, Hashimoto T, Oka J, Saitoh A, Yamada M. J Neural Transm. 122, 487-94. 2015. DOI: 10.1007/s00702-014-1289-9. 査読有

(2) Plasticity-related gene 1 is important for survival of neurons derived from rat neural stem cells. Hashimoto, T., Yamada, M., Iwai, T., Saitoh, A., Hashimoto, E., Ukai, W., Saito, T. and Yamada, M. J. Neurosci. Res. **91**, 1402-1407. 2013. DOI: 10.1002/jnr.23269. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) Intracerebroventricularly injected LPA induces anxiety-like behavior in mice via its receptors -Possible roles of LPA in depression and anxiety disorders - Gotoh L, Saitoh A,

Yamada M., Tsukagoshi M, Oka J, Yamada M.  
2015.7.28-31. 第 38 回日本神経科学大会 神  
戸国際会議場

(2) リゾホスファチジン酸シグナル伝達系の  
情動行動に及ぼす検討 塚越麻衣、山田美佐、  
後藤玲央、岡淳一郎、斉藤顕宜、山田光彦  
2015.3.17. 第 24 回神経行動薬理学会若手研  
究者の集い 名古屋 名城大学

(3) Effects of lysophosphatidic acid on emotional  
behaviors in mice 塚越麻衣、山田美佐、岡淳  
一郎、斉藤顕宜、山田光彦 2014.11.20-22.  
第 24 回臨床精神神経薬理学会・第 44 回神経  
精神薬理学会 合同年会 名古屋国際会議場

(4) 気分障害における脂質メディエーター  
リゾホスファチジン酸の役割についての検  
討 後藤玲央、斉藤顕宜、塚越麻衣、山田美  
佐、岡淳一郎、山田光彦 2014.10.17-18. 第  
33 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会  
福岡県筑紫野市大丸別荘

(5) 脳室内投与されたリゾホスファチジン酸  
は受容体を介してマウスの不安様行動を誘  
発する 塚越麻衣、山田美佐、岡淳一郎、斉  
藤顕宜、山田光彦 2014.7.5. 第 130 回日本薬  
理学会関東部会 東京 星薬科大学

(6) Intracerebroventricular administration of LPA  
induced anxiety-like behavior in mice via LPA  
receptors 塚越麻衣、山田美佐、橋本富男、岡  
淳一郎、斉藤顕宜、山田光彦 第 87 回日本薬  
理学会年会 2014.3.19-21. 東北大学百周年記  
念会館川内萩ホール、仙台国際センター

(7) Prg1, an antidepressant-related gene, is an  
important factor for survival of neurons derived

from neural stem cells. 橋本富男、山田美佐、  
岩井孝志、斉藤顕宜、橋本恵理、鵜飼涉、齋  
藤利和、山田光彦 第 36 回日本神経科学会  
国立京都国際会館 2013.6.20-23

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 美佐 (YAMADA MISA)  
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究  
センター・精神保健研究所 精神薬理研究  
部・科研費研究員  
研究者番号：10384182

### (2) 研究分担者

斉藤 顕宜 (SAITOH AKIYOSHI)  
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研  
究センター・精神保健研究所 精神薬理研  
究部・室長  
研究者番号：00366832

橋本富男 (HASHIMOTO TOMIO)  
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研  
究センター・精神保健研究所 精神薬理研  
究部・流動研究員  
研究者番号：10610751  
(退職のため削除：平成 26 年 3 月 18 日)

山田 光彦 (YAMADA MITSUHIKO)  
国立研究開発法人国立精神・神経医療研  
究センター・精神保健研究所 精神薬理研究  
部・部長  
研究者番号：60240040