

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870256

研究課題名(和文)発光イメージングを利用したBDNF発現調節による神経精神疾患治療薬開発の基盤構築

研究課題名(英文)Bioluminescence imaging for monitoring the expression of BDNF gene; Toward drug development for neural and psychiatric disorders

研究代表者

福地 守 (Fukuchi, Mamoru)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：40432108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子BDNFは、記憶・学習などの高次脳機能発現に重要であり、様々な神経・精神疾患との関わりも深い。最近、我々はルシフェラーゼを利用してBDNF遺伝子発現変化を可視化可能なトランスジェニックマウス「BDNF-Lucマウス」を作成した。本研究では、このマウスを用いて、*in vitro*および*in vivo*におけるBDNF遺伝子発現変化の経時的なモニタリングに成功した。さらに、BDNF-Lucマウス由来大脳皮質ニューロンを利用してBDNF遺伝子発現を活性化させる薬剤を探索する多検体スクリーニング法を構築した。これら本研究の成果は、今後の創薬研究開発に貢献することが期待された。

研究成果の概要(英文)：Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays an important role in expressing long-lasting changes in neural functions such as learning and memory, and is associated with neural and psychiatric disorders. We recently generated a novel transgenic mouse strain, termed BDNF-Luc mouse, to visualize change in BDNF expression in living cells and in mice using bioluminescence imaging. In this study, I successfully detected bioluminescence signal and monitored time-dependent changes in the expression of BDNF gene *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, I constructed a novel screening system to identify compounds and drugs that induce the expression of BDNF gene in neurons. Because BDNF inducers are candidate drugs for psychiatric disorders like depression, these results obtained by this study would contribute to drug development for neural and psychiatric disorders in future.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：BDNF ルシフェラーゼ イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

脳由来神経栄養因子 BDNF は、神経細胞の生存や分化、シナプス機能の調節といった細胞レベルでの神経機能発現、さらには記憶や学習を含む高次脳機能発現において、根幹的な役割を担っている。脳・神経系における BDNF の多彩な生理機能から、BDNF 発現の異常は、さまざまな神経変性疾患・神経精神疾患と結びついていることが報告されている。例えば、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患やうつ病等の精神疾患において、BDNF 発現の低下が認められている。逆にてんかん発作や依存性薬物投与では、BDNF 発現の上昇が認められる。したがって、これら神経精神疾患で認められる脳内 BDNF 発現の異常を薬剤や外部刺激により正常なレベルにまで回復させることが可能となれば、これら疾患の治療に繋がることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ホタルの発光酵素であるルシフェラーゼを利用して BDNF 遺伝子発現変化を計測可能なトランスジェニックマウス「BDNF-Luc マウス」を用いたイメージングにより、脳・神経系における BDNF 発現変化と脳・神経系の発達や機能、さらには神経精神疾患等との関わりを以下の計画で解明する。

培養神経細胞で BDNF 発現を顕著に誘導する薬剤が発達段階のマウスの脳内 BDNF 発現およびその後の発達に与える影響。BDNF-Luc マウスより調製した培養神経細胞を用いた BDNF 発現誘導剤のスクリーニング。特に顕著な変化が認められた薬剤に関しては、マウス脳内においても同様の効果が認められるかを検討する。BDNF 発現異常と神経精神疾患との関連性をうつ病を例に解析する。うつ病モデルマウスでは、海馬での BDNF 発現低下が認められるが、この発現低下が発光イメージングにより検出可能か、マウスのうつ様行動と合わせて解析する。BDNF 発現誘導剤がうつ病モデルマウスの脳内 BDNF 発現およびうつ様行動に与える影響。

以上の解析により、BDNF 発現調節による神経精神疾患治療薬開発の基盤構築を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、BDNF 発現変化と脳・神経系の発達、疾患との関わりに着目し、発達段階での BDNF 発現異常が脳・神経系の発達に及ぼす影響、神経精神疾患における BDNF 発現低下、さらには疾患により低下した BDNF 発現の回復により症状の改善が認められるか、以上の点について解析を行う。具体的には、BDNF-Luc マウスを用いた *in vitro* および *in*

*vivo* 発光イメージング、およびマウス行動解析等を組み合わせて研究を遂行する。

*in vitro* 解析：96穴培養プレートに培養した神経細胞に目的の薬剤・化学物質を添加し、その後の発光強度の変化をルミノメーターで測定することにより、BDNF 遺伝子発現を活性化させる薬剤の探索法を確立する。また、ガラス底ディッシュに培養した神経細胞にあらかじめ基質となるルシフェリンを添加しておき、薬剤・化学物質を添加後の発光強度の変化を発光顕微鏡により測定する。培養プレートを用いた場合では、細胞集団での発光強度を測定することとなるが、多検体スクリーニングには適している。ガラス底ディッシュを用いた場合では、多検体スクリーニングには不向きであるが、発光顕微鏡を用いるため、個々の神経細胞における発光強度が測定可能である。この2つの方法を組み合わせることで、BDNF 発現誘導剤のスクリーニングを行う。

*in vivo* 解析：ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを吸入麻酔下で BDNF-Luc マウスに腹腔内投与し、高感度 CCD カメラにより頭部の発光強度を測定する。測定後に各薬剤を投与し、投与後、経時的に発光イメージングを行い、投与前との発光強度の比較を行う。

## 4. 研究成果

はじめに、BDNF-Luc マウスを用いた BDNF 遺伝子発現の可視化法の妥当性を検討するため、発光顕微鏡を用いて BDNF-Luc マウス由来大脳皮質ニューロン初代培養系における発光変化を解析した。神経細胞における BDNF 遺伝子発現は、細胞膜の脱分極により顕著に増加するが、実際に発光の増加も確認することができ、個々のニューロンにおける BDNF 遺伝子発現の活性化を可視化することに成功した。この手法を用いて、神経ペプチド PACAP による BDNF 遺伝子発現誘導に関する解析を行った。以前の研究により、大脳皮質ニューロンを PACAP で処理すると BDNF mRNA 発現の増加が認められることが明らかとなっていたが、発光イメージングで解析した結果、BDNF 遺伝子発現が増加するニューロンは予想に反してごく一部に限られていた。興味深いことに、ニューロンの成熟化に伴い NMDA 型グルタミン酸レセプター NMDAR が活動的になった状態では、PACAP は多くのニューロンにおいて BDNF 遺伝子発現を活性化することが明らかとなった。各種阻害剤を用いた薬理的解析の結果、PACAP は NMDAR の下流で活性化されるタンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの活性を選択的に増強し、転写制御因子 CREB のコアクチベーター CRT1 の核移行を促進することにより BDNF 遺伝子発現を効率よく誘導することが明らかとなった。さらに、この BDNF 遺伝子

発現誘導は、ドーパミンやアドレナリン、その他いくつかの神経ペプチドにより Gs または Gq 共役型の G タンパク質共役型レセプター-GPCR を活性化した場合においても共通的に認められた。GPCR は、記憶や学習、情動や報酬など様々な脳・神経系の機能発現に関わることが知られており、GPCR による制御系の異常や破綻は、統合失調症や薬物依存症などの神経・精神疾患の原因となることが指摘されている。BDNF は、脳・神経系の高次脳発現のマスターレギュレーターの一つであることを踏まえると、GPCR 活性化による BDNF 遺伝子発現誘導機構は、長期的な脳・神経系の高次脳発現に関わる重要な制御系であり、この制御系の異常が、様々な神経系の疾患発症の原因となることが示唆された。したがって、この制御系は今後の創薬研究開発を進める上で重要な知見となることが期待された (Fukuchi et al., *J Neurosci* (2015))。

一方、96 ウェルプレートを用いて BDNF-Luc マウス由来の大脳皮質ニューロンを培養し、目的となる薬剤や化合物添加後の各ウェルの発光強度を測定することで、発光増加を指標として BDNF 遺伝子発現を活性化させる薬剤の多検体スクリーニングが可能ではないかと考えた。実際に、神経伝達物質関連ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、BDNF 遺伝子発現を活性化させるアゴニストを同定することに成功した。これらの多くは、ドーパミン関連のアゴニストであり、上記の結果 (Fukuchi et al., *J Neurosci* (2015)) の結果を支持するものであった。さらに本アッセイは、化合物ベースのライブラリーだけでなく、天然物エキスなどのライブラリーも使用可能であった。実際に、120 種類の生薬エキスをライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、いくつかの生薬エキスに BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められた。そのうちのいくつかについては、予備的な結果ではあるが、マウスの記憶力をわずかに亢進させる可能性を示すデータが得られており、今後さらなる検討が必要である。

また、生体 BDNF-Luc マウスに基質であるルシフェリンを投与することで、発光を検出することに成功した。しかし、BDNF 発現は脳特異的ではなく、皮膚などの末梢組織にも認められるため、脳領域の発光を計測するためには、皮膚を予め除去する必要がある。以前より、痙攣誘発剤であるカイニン酸は、BDNF 発現を顕著に活性化させることが知られている。そこで、BDNF-Luc マウスにカイニン酸を投与し、その後の頭部の発光変化を計測したが、カイニン酸投与後の顕著な発光増加は認められなかった。カイニン酸投与後の内在性の BDNF 遺伝子発現変化を解析した結果、特に海馬においては顕著な BDNF 遺伝子発現誘導が認められたが、大脳皮質ではわずかに増加する程度であった。ルシフェリンとの反応で得られる発光は、組織透過性が悪いため、脳の表面である大脳皮質由来の発光は

検出されるが、大脳皮質よりも深部に位置する海馬由来の発光は、光散乱によりほとんど検出されないことが示唆された。これについては、組織透過性の高い長波長の発光が得られる新規ルシフェラーゼ基質を用いた解析を現在進めている。

生体 BDNF-Luc マウスを用いた解析の過程で、興味深いことに高体重のマウスほど腹部の発光が強いことが明らかとなった。そこで、このマウスの脂肪組織を単離し、内在性 BDNF mRNA 発現変化を検討した結果、確かに高体重マウス由来の脂肪組織では BDNF mRNA 発現が高いことが明らかとなった。そこで、BDNF-Luc マウスに高脂肪食または通常食を与え、その後の体重変化及び腹部の発光変化を経時的に計測した。その結果、体重増加と発光増加に強い相関性があることが明らかとなった。したがって、BDNF は脂肪組織において何らかの役割を果たしている可能性が考えられ、現在、その可能性について解析を進めている。

以上の研究により、BDNF-Luc マウスを用いることで、*in vitro* および *in vivo* における BDNF 遺伝子発現変化を計測可能であり、BDNF 遺伝子発現誘導能を指標とした創薬研究開発の基盤を構築することに成功した。また、脂肪組織などの末梢組織における特徴的な BDNF 遺伝子発現変化など当初予想していなかった興味深い結果が得られた。したがって、BDNF-Luc マウスは、神経・精神疾患だけでなく、代謝疾患などを解析する上でも非常に有用なツールであることが期待される。

## 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7件)

1. Fukuchi M, Kanesaki K, Takasaki I, Tabuchi A, Tsuda M (2015) Convergent effects of  $Ca^{2+}$  and cAMP signals on the expression of immediate early genes in neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 466(3):572-577. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.084.
2. Fukuchi M, Tabuchi A, Kuwana Y, Watanabe S, Inoue M, Takasaki I, Izumi H, Tanaka A, Inoue R, Mori H, Komatsu H, Takemori H, Okuno H, Bito H, Tsuda M (2015) Neuromodulatory effect of G<sub>s</sub>- or G<sub>q</sub>-coupled G-protein-coupled receptor on NMDA receptor selectively activates the NMDA receptor/ $Ca^{2+}$ /calcineurin/cAMP response element-binding protein-regulated transcriptional coactivator 1 pathway to effectively induce brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *J Neurosci*, 35(14):5606-5624. doi:

- 10.1523/JNEUROSCI.3650-14.2015.
3. Fukuchi M, Nakashima F, Tabuchi A, Shimotori M, Tatsumi S, Okuno H, Bito H, Tsuda M (2015) Class I histone deacetylase-mediated repression of the proximal promoter of the activity-regulated cytoskeleton-associated protein gene regulates its response to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, 290(11):6825-6836. doi: 10.1074/jbc.M114.617258.
  4. Fukuchi M, Tsuda M (2015) GABA-driven excitatory neurotransmission: gene regulation by excitatory GABA and its possible role in the developing brain. *Neurotransmitter*, 2:e480. doi: <http://dx.doi.org/10.14800/nt.480>.
  5. Fukuchi M, Kirikoshi Y, Mori A, Eda R, Ihara D, Takasaki I, Tabuchi A, Tsuda M (2014) Excitatory GABA induces BDNF transcription via CRTG1 and phosphorylated CREB-related pathways in immature cortical cells. *J Neurochem*, 131(2):134-146. doi: 10.1111/jnc.12801.
  6. Takasaki I, Oose K, Otaki Y, Ihara D, Fukuchi M, Tabuchi A, Tsuneki H, Tabuchi Y, Kondo T, Saitoh A, Yamada M, Tsuda M (2013) Type II pyrethroid deltamethrin produces antidepressant-like effects in mice. *Behav Brain Res*, 257:182-188. doi: 10.1016/j.bbr.2013.09.044.
  7. Xu G, Shen J, Ishii Y, Fukuchi M, Dang TC, Zheng Y, Hamashima T, Fujimori T, Tsuda M, Funahara K, Sasahara M (2013) Functional analysis of platelet-derived growth factor receptor- in neural stem/progenitor cells. *Neuroscience*, 238:195-208. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.021.

[学会発表](計21件)

1. 雑賀美友紀, 福地守, 田淵明子, 津田正明. 異なる翻訳開始点から合成される BDNF タンパクの相違. 日本薬学会北陸支部第127回例会; 2015 Nov 15; 富山.
2. 渡邊漠, 福地守, 市村美奈, 越智雄基, 田淵明子, 津田正明. 神経ペプチド PACAP 誘導性 CRE 依存的転写活性化におけるアンカータンパク質 AKAP150 の役割. 日本薬学会北陸支部第127回例会; 2015 Nov 15; 富山.
3. 渡辺藍, 岡田卓哉, 福地守, 合田浩明, 栗原崇, 宮田篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一郎. 新規鎮痛薬の開発を目指した PAC1 受容体アンタゴニストの創出と薬理的評価. 日本薬学会北陸支部第127回例会; 2015 Nov 15; 富山.
4. Saika M, Fukuchi M, Tabuchi A, Tsuda M.

- Difference in a translation start site in BDNF exon I and exon IX. 第58回日本神経化学学会大会; 2015 Sep 11-13; さいたま.
5. Watanabe B, Fukuchi M, Ichimura M, Ochi Y, Tabuchi A, Tsuda M. PACAP induces Bdnf expression through selective activation of NMDA receptor/calcineurin pathway in neurons. 第58回日本神経化学学会大会; 2015 Sep 11-13; さいたま.
  6. Fukuchi M, Tabuchi A, Tsuda M. Regulation of BDNF gene expression and its possible role in neural functions and diseases. 第58回日本神経化学学会大会; 2015 Sep 11-13; さいたま.
  7. 福地守, 中島布久美, 田淵明子, 奥野浩行, 尾藤晴彦, 津田正明. クラス HDAC は Arc 遺伝子プロモーターの近傍領域を介して BDNF 誘導性 Arc 発現を抑制する. 第38回日本神経科学大会; 2015 Jul 28-31; 神戸.
  8. 福地守. G タンパク質共役型受容体活性化による遺伝子発現制御機構. 日本生化学会北陸支部第33回大会; 2015 May 23; 富山.
  9. 福地守, 前畑陽祐, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 高崎一郎, 竹森洋, 田淵明子, 津田正明. GPCR 活性化による NMDA レセプター/カルシニューリン/CRTG1/CREB 経路を介した BDNF 遺伝子発現誘導. 日本薬学会第135年会; 2015 Mar 25-28; 神戸.
  10. 津田正明, 福地守, 田淵明子. GABA 作用薬が脳神経系発達に影響を及ぼす理由; その分子生物学的考察. 第4回日本情動学会; 2014 Nov 29; 名古屋.
  11. 福地守, 前畑陽祐, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 田淵明子, 津田正明. GPCR 活性化による NMDAR/カルシニューリン/CRTG1 経路の選択的活性化を介した遺伝子発現誘導. 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会合同年会; 2014 Sep 29-Oct 1; 奈良.
  12. 福地守, 前畑陽祐, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 田淵明子, 津田正明. PACAP による BDNF 遺伝子発現誘導 - 生物発光イメージングを利用した解析. 第37回日本神経科学大会; 2014 Sep 11-13; 横浜.
  13. 福地守, 田淵明子, 前畑陽祐, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 津田正明. 発光イメージングを用いた神経ペプチド PACAP による脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子発現誘導機構の解析. 日本生化学会北陸支部第32回大会; 2014 May 24; 富山.
  14. 津田正明, 福地守, 田淵明子. 広範囲調節系が遺伝子発現に与える影響と情動記憶. 日本情動学会第3回大会; 2013 Dec 7; 京都.
  15. 大瀧雄基, 高崎一郎, 伊原大輔, 福地守, 田淵明子, 津田正明. 2型ピレスロイド系殺虫剤デルタメトリンのマウス海馬 BDNF 発現に与える影響と抗うつ様効果についての解析. 第36回日本分子生物学会年会;

- 2013 Dec 3-6; 神戸.
16. 福地守, 田淵明子, 津田正明. G タンパク質共役型受容体 (GPCR) による  $Ca^{2+}$ /カルシニューリン/CRTC1 経路の特異的な活性化を介した遺伝子発現誘導機構. 第36回日本分子生物学会年会; 2013 Dec 3-6; 神戸.
  17. 前畑陽祐, 福地守, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 田淵明子, 津田正明. 生物発光を利用した培養大脳皮質ニューロンにおける脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子発現変化の可視化. 第36回日本分子生物学会年会; 2013 Dec 3-6; 神戸.
  18. 福地守, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 前畑陽祐, 津田正明. 生物発光を利用したマウス脳内における脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子発現変化の解析. Neuro2013 (第36回日本神経科学大会 第56回日本神経化学学会大会 第23回日本神経回路学会大会 合同大会); 2013 Jun 20-23; 京都.
  19. 津田正明, 福地守, 高崎一朗, 竹森洋, 田淵明子. G タンパク質共役型受容体 GPCR 活性化による  $Ca^{2+}$ /カルシニューリン経路を介した活動依存的な遺伝子発現制御系に関する解析. Neuro2013 (第36回日本神経科学大会 第56回日本神経化学学会大会 第23回日本神経回路学会大会 合同大会); 2013 Jun 20-23; 京都.
  20. 福地守, 田淵明子, 津田正明. G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 活性化による NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA-R) を介した遺伝子発現誘導機構に関する研究. 日本生化学会北陸支部第31回大会; 2013 May 25; 金沢.
  21. 福地守, 田淵明子, 津田正明. G タンパク質共役型受容体 (GPCR) による NMDA 型グルタミン酸受容体を介した遺伝子発現誘導機構に関する研究. 第10回 GPCR 研究会; 2013 May 10-11; 東京.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 脳由来神経栄養因子遺伝子発現誘導剤及び組成物

発明者: 津田正明, 福地守, 森寿

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-247942

出願年月日: 2015年12月18日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/bioche1/index-j.html>

報道関連情報

富山新聞: 富大研究グループ 記憶の仕組み解明へ 細胞内情報伝達経路を発見 認知症、うつ病の創薬期待

北陸中日新聞: 長期間 記憶を活発に 富大名誉教授ら酵素発見

北日本新聞: 記憶に必須 タンパク質の生成 富山大 仕組み解明 新薬開発に貢献期待

(Fukuchi et al., (2015) The Journal of Neuroscience の研究内容に関する新聞記事、いずれも2015年4月18日朝刊)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福地 守 (MAMORU FUKUCHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・助教

研究者番号: 40432108