

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870461

研究課題名(和文)線維芽細胞増殖因子(FGF)の新規薬理作用としての抗うつ効果発現機序の解析

研究課題名(英文)The role of Fibroblast growth factor (FGF) signaling on the novel pharmacological action of antidepressants.

研究代表者

中島 一恵(久岡一恵)(HISAOKA-NAKASHIMA, KAZUE)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：20393431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗うつ薬の新たな治療ターゲットとして、グリア細胞において線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor; FGF)シグナル伝達系に着目し、抗うつ薬によりFGFシグナル伝達系がいかんして制御され、抗うつ薬の治療効果に寄与するかを明らかとすることを目的として研究を行った。三環系抗うつ薬(アミトリプチリン)がGタンパクを介してFGFシグナル伝達系を活性化し、神経栄養因子の産生に寄与することを明らかにした。また、ラット初代培養アストロサイトにおいて、抗うつ薬が転写因子EGR1(early growth response1)の産生を介してFGF2を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the effect of amitriptyline (a tricyclic antidepressant) on the fibroblast growth factor (FGF) signaling in glia. We reported that the amitriptyline-induced FGF signaling activation following glial cell line derived-neurotrophic factor production is occurred by Gi/o activation (Hisaoka-Nakashima K et al., J Biol Chem 290(22): 13678-13691, 2015). Furthermore, we reported that amitriptyline increases FGF2 mRNA expression through EGR1 production in rat primary cultured astrocytes (Kajitani N et al., J Neurochem 135 (1): 27-37, 2015).

研究分野：薬理学

キーワード：抗うつ薬 神経栄養因子 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

従来、抗うつ薬はシナプス間隙のモノアミン量を増加することで治療効果を発揮すると考えられてきた。しかしながら、脳内の細胞外モノアミン濃度は抗うつ薬の投与数時間後に増加するのに対し、臨床における治療効果発現までには数週間の慢性投与が必要とされ、抗うつ薬の治療効果発現メカニズムは未だ明らかとされていない。近年、脳機能の画像解析研究と死後脳を用いた研究の進歩により、海馬組織の委縮や脳の特定部位におけるグリア細胞の減少などの形態学的異常とうつ病との関係が報告されている。さらに、抗うつ薬が神経およびグリア細胞の新生促進作用や神経栄養因子・成長因子群の増加作用も併せもつことが報告された。したがって、うつ病患者でみられる脳の形態学的異常に対して、抗うつ薬が神経およびグリア細胞新生や神経栄養因子・成長因子群を介して可塑的变化を促す結果、治療効果を発現する可能性が注目されている。

神経栄養因子・成長因子群の一種である線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor; FGF) には現在までに構造が異なる22種類のリガンドと4種類の受容体が存在することが報告されている。FGF リガンドおよび受容体は中枢神経系において幅広く発現しており、神経細胞とグリア細胞の両方に発現が認められている。近年、うつ病患者死後脳において、複数の FGF リガンドと FGF 受容体が健常対照群と比較して低下しているとの報告がなされた (Evans et al., 2004)。また、ラット海馬においてリガンドのひとつである FGF-2 をノックダウンすると不安行動が惹起され (Eren-Kocak et al., 2011)、ラット脳室内に FGF-2 を投与すると強制水泳試験において抗うつ効果を示すという報告がある (Turner et al., 2008)。さらに興味深いことに、うつ病モデル動物におけるうつ様行動とグリア細胞数の減少が抗うつ薬投与により回復するのに FGF シグナル伝達系が関与するとの報告がなされた (Elsayed et al., 2012)。

一方、研究代表者らのこれまでの研究からも、グリア細胞において現在臨床で使用されている抗うつ薬がモノアミンとは関連のない新規薬理作用を介して FGF-2 を遊離し FGF 受容体 1 (FGFR1) に作用することで FGF シグナル伝達系を活性化させ、この作用がグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) の産生に重要な役割を果たしていることを見出している (Hisaoka et al., 2011)。GDNF はうつ病患者血液および死後脳において健常対照群と比較して低下していることが報告されていることから (Takebayashi et al., 2006; Michel et al., 2008; Otsuki et al., 2008; Zhang et al., 2008)、GDNF の産生に重要な役割を果たす FGF シグナル伝達系がうつ病の病因・病態に関連する可能性が推測される。したがって、グリア細胞における FGF シグナ

ル伝達系の制御はうつ病の新しい治療ターゲットになる可能性が期待される。しかしながら、抗うつ薬による FGF シグナル伝達系の活性化はモノアミンとは関連しない未知の薬理作用を介するため、その活性化の上流に存在するメカニズムは全く不明であり、抗うつ効果との関連も明らかでない。そこで、本研究は研究代表者のこれまでの研究成果に基づいて、抗うつ薬との関連性が示唆されている FGF-2 と FGFR1 を介する FGF シグナル伝達系に着目し、グリア細胞において抗うつ薬が FGF シグナル伝達系を活性化するメカニズムを解明する。さらに、動物実験で抗うつ薬による FGF シグナル伝達活性化機構がいかんにして抗うつ薬の治療効果に寄与するかを明らかにする。本研究から得られた結果より、最終的には新たな薬理作用を有する新規抗うつ薬の創製に貢献することを目的とする。

2. 研究の目的

近年、うつ病患者の死後脳において FGF リガンドと FGF 受容体の低下が報告され、抗うつ薬の治療効果と FGF シグナル伝達系との関連が注目されている。本研究は、現在臨床で使用されている抗うつ薬の新たな治療ターゲットとして、グリア細胞における FGF シグナル伝達系に着目し、抗うつ薬により FGF シグナル伝達系がいかんにして制御され、治療効果に寄与するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) グリア細胞における抗うつ薬の FGF シグナル伝達活性化機構の検討
実験にはグリア細胞 (正常ヒトアストロサイト、ラット初代培養グリア、グリア由来ラット C6 細胞) を用いた。本研究では FGF シグナル伝達活性化に関与する分子として G タンパクに着目して検討を行った。抗うつ薬による G タンパクの活性化は CellKey システム (Molecular Devices 社) を用いて検討した。CellKey は生細胞内外の高周波に対する電気抵抗変化を測定することにより、薬剤添加による G タンパク活性化などのシグナル伝達を解析するシステムである (Schroder et al., 2010)。

三環系抗うつ薬アミトリプチリン処置による FGF シグナル伝達活性化に対する各種 G タンパクサブタイプ選択的阻害薬の影響を検討した。FGF シグナル伝達活性化について、FGF-2 遊離、FGFR1 と細胞内情報伝達分子 (FRS2、ERK、CREB) のリン酸化および GDNF 産生を指標にして解析を行った。FGFR と細胞内情報伝達分子のリン酸化はウエスタン法で、FGF-2 遊離と GDNF 産生は ELISA 法で定量した。

CellKey システムを用いてアミトリプチリン処置による各 G タンパクサブタイプの活性化を検出し解析した。

(2) グリア細胞における抗うつ薬による

FGF シグナル伝達活性化に関与する G タンパクサブタイプの同定

阻害剤を用いた結果からアミトリプチリンの作用と関連が推測される G タンパクサブタイプに選択的な siRNA を用いて、アミトリプチリン処置により誘導される FGF シグナル伝達活性化よりも上流に位置するカスケードの同定と各分子の重要性を検索する。

(3) グリア細胞における抗うつ薬誘導性 FGF-2 産生機構の解明

実験にはラット初代培養グリアを用いた。これまでの研究代表者らの研究から、アミトリプチリンによる FGF-2 産生には新規タンパク質の合成が関与している可能性が示唆されている。そこで、本研究ではアミトリプチリンにより誘導されるタンパク質として転写因子 (EGR-1) に着目して検討を行った。

アミトリプチリンをはじめとする複数の抗うつ薬が EGR-1 の発現におよぼす作用を検討した。

アミトリプチリンによる FGF2 産生に対する EGR-1 siRNA の影響を検討した。

細胞内情報伝達阻害薬を用いて、アミトリプチリンによる EGR-1 および FGF2 産生メカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1) アストログリア細胞 (ラット大脳皮質初代培養アストロサイト、ラットアストログリア由来 C6 細胞) において、三環系抗うつ薬アミトリプチリン処置による FGF 受容体シグナル伝達系の活性化をウエスタン法により検出した。G タンパクサブタイプ (Gs, Gi/o, Gq) にそれぞれ選択的な阻害薬を用いて、アミトリプチリンによる FGF 受容体シグナル活性化には Gi/o が関与する可能性が示唆された。

(2) アストログリア細胞に発現している Gi/o タンパクサブタイプに特異的な siRNA を用いて、アミトリプチリンによる FGF 受容体シグナル活性化には Go, Gi3 が関与することが示された。

(3) CellKey システムを用いて、アストログリア細胞におけるアミトリプチリン誘導性 Gi/o タンパクの活性化を検出した。また、アミトリプチリン以外の複数の種類の抗うつ薬でも同様に Gi/o の活性化が確認できた。

(4) ラット大脳皮質初代培養アストロサイトにおいて、アミトリプチリン処置による FGF2 産生には ERK の活性化を介する転写因子 EGR1 の生合成が必要であることが示された。

(5) 複数の種類の抗うつ薬 (三環系、四環系、SSRI、SNRI) 処置により、ラット大脳皮質初代培養アストロサイトにおいて、EGR1 と FGF2 の誘導が確認され、これらの発現量は相関していた。

(6) アミトリプチリンによる FGF2 産生にはマトリックスメタロプロテアーゼの活性化による受容体リガンドの遊離を介する受容体型チロシンキナーゼ (FGF 受容体、EGF

受容体) シグナルが関与する可能性が示唆された。

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5件)

1. Amitriptyline induces brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression through ERK-dependent modulation of multiple BDNF mRNA variants in primary cultured rat cortical astrocytes and microglia.

Hisaoka-Nakashima K, Kajitani N, Kaneko M, Shigetou T, Kasai M, Matsumoto C, Yokoe T, Azuma H, Takebayashi M, Morioka N, Nakata Y.

Brain Res、査読有、Vol 1634、2016、pp57-67
DOI: 10.1016/j.brainres.2015.12.057.

2. Fibroblast growth factor 2 mRNA expression evoked by amitriptyline involves extracellular signal-regulated kinase-dependent early growth response 1 production in rat primary cultured astrocytes.

Kajitani N, Hisaoka-Nakashima K, Okada-Tsuchioka M, Hosoi M, Yokoe T, Morioka N, Nakata Y, Takebayashi M.

J Neurochem、査読有、vol 135、2015、pp27-37
DOI: 10.1111/jnc.13247.

3. Tricyclic antidepressant amitriptyline-induced glial cell line-derived neurotrophic factor production involves pertussis toxin-sensitive G i/o activation in astroglial cells.

Hisaoka-Nakashima K, Miyano K, Matsumoto C, Kajitani N, Abe H, Okada-Tsuchioka M, Yokoyama A, Uezono Y, Morioka N, Nakata Y, Takebayashi M.

J Biol Chem、査読有、vol 290、2015、pp13678-91

DOI: 10.1074/jbc.M114.622415.

4. グリアと抗うつ薬

中島一恵、森岡徳光、仲田義啓、竹林実
分子精神医学、査読無、vol 14、2014、pp9-14

5. History of the G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Assays From Traditional to a State-of-the-Art Biosensor Assay.

Miyano K, Sudo Y, Yokoyama A, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Takebayashi M, Nakata Y, Higami Y, Uezono Y.

J Pharmacol Sci、査読有、vol 126、2014、pp302-309

DOI: 10.1254/jphs.14R13CP.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Antidepressants activate matrix metalloproteinase (MMP) in astroglial cells: involvement in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression

Abe H, Hisaoka-Nakashima K, Kajitani N, Okada-Tsuhioka M, Itagaki K, Morioka M, Nakata Y, Takebayashi M.

45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 21 October 2015, Chicago U.S.A

2. ラットアストログリア細胞において三環系抗うつ薬アミトリプチリンは MMP-9 活性化を介してグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) mRNA 発現を増加させる

安倍 裕美、中島 一恵、梶谷 直人、岡田 麻実、板垣 圭、森岡 徳光、仲田 義啓、竹林 実
第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会、2015 年 9 月 24-26 日、東京

3. 気分障害のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) に着目したバイオマーカーおよび創薬に向けた研究

竹林 実、柴崎 千代、安倍 裕美、板垣 圭、梶谷 直人、岡田 麻実、中島 一恵、森岡 徳光、仲田 義啓
第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会、2015 年 9 月 24-26 日、東京

4. アミトリプチリンはアストロサイトにおいて Gai/o を活性化しグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) を産生する

中島 一恵、宮野 加奈子、松本 千枝、梶谷 直人、安倍 裕美、岡田 麻実、横山 明信、上園 保仁、森岡 徳光、竹林 実、仲田 義啓
第 127 回日本薬理学会近畿部会、2015 年 6 月 26 日、岐阜市

5. A novel assay for detecting the activation of G protein-coupled receptors using cellular dielectric spectroscopy

Miyano K, Sudo Y, Yokoyama A, Nishimura H, Kawaida M, Sato S, Nemoto E, Hisaoka-Nakashima K, Takebayashi M, Morioka N, Shiraishi S, Higami Y, Fujii H, Nakata Y, Uezono Y.

第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18-20 日、名古屋

6. Tricyclic antidepressant amitriptyline acts on astrocytes leading to the increase in the FGF2 expression: A role of early growth response 1 signaling

Kajitani N, Hisaoka-Nakashima K, Okada-Tsuhioka M, Hosoi M, Shibasaki C,

Morioka N, Nakata Y, Takebayashi M
44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 17 November 2014, Washington DC U.S.A.

7. アミトリプチリンによるグリア細胞株由来神経栄養因子産生メカニズムの解明: マトリックスメタロプロテアーゼの関与

安部 裕美、中島 一恵、岡田 麻実、梶谷 直人、板垣 圭、森岡 徳光、竹林 実、仲田 義啓

第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2014 年 11 月 8-9 日、広島

8. ラット初代培養ミクログリアにおいて三環系抗うつ薬アミトリプチリンが脳由来神経栄養因子 (BDNF) mRNA 発現に及ぼす効果の検討

重藤 貴大、中島 一恵、梶谷 直人、竹林 実、森岡 徳光、仲田 義啓

第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2014 年 11 月 8-9 日、広島

9. ラット初代培養ミクログリアにおける脳由来神経栄養因子 (BDNF) 発現に対する三環系抗うつ薬アミトリプチリンの影響

重藤貴大、中島一恵、梶谷直人、竹林 実、森岡徳光、仲田義啓

第 125 回日本薬理学会近畿部会、2014 年 6 月 20 日、岡山

10. ラット大脳皮質培養アストロサイトにおける amitriptyline 誘導性 FGF-2 産生に対する EGR-1 の関与

梶谷直人、竹林 実、中島一恵、安倍裕美、柴崎千代、岡田麻実、森岡徳光、仲田義啓

第 124 回日本薬理学会近畿部会、2013 年 11 月 1 日、京都

11. ラット大脳皮質初代培養アストロサイトにおいて三環系抗うつ薬 amitriptyline は Egr-1 を介して FGF-2 の発現を増加させる

梶谷直人、竹林 実、中島一恵、安倍裕美、柴崎千代、岡田麻実、森岡徳光、仲田義啓

第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会・合同大会、2013 年 10 月 24-26 日、沖縄

12. ラット大脳皮質初代培養アストロサイトの BDNF exon mRNA 発現に対するモノアミンの影響

葛西美穂、中島 (久岡) 一恵、梶谷直人、重藤貴大、竹林 実、森岡徳光、仲田義啓

第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会・合同大会、2013 年 10 月 24-26 日、沖縄

13. 初代培養ラット大脳皮質アストロサイトにおいて三環系抗うつ薬アミトリプチリンは MEK/ERK カスケードを介して BDNF exon mRNA の発現を調節する

中島(久岡)一恵、金子将弘、葛西美穂、梶谷直人、安部裕美、森岡徳光、柴崎千代、仲田義啓、竹林 実、

第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会・合同大会 (Neuro2013)、2013 年 6 月 20-23 日、京都

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/pha/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 一恵 (久岡 一恵)

(NAKASHIMA KAZUE)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：20393431