

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460102

研究課題名(和文) 海馬神経細胞新生促進を目指した精神疾患予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of hippocampal neurogenesis-promoting drugs as a target for the treatment and prevention of psychiatric disorders

研究代表者

中川西 修 (NAKAGAWASAI, Osamu)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50296018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：嗅球摘出(OBX)マウスの精神関連異常行動に対する新規ジテルペノイドのスカプロニンのメチルエステル体(SG-ME)の効果及びそのメカニズムを検討した。OBXマウスの脳室内にSG-MEを投与した際、記憶関連行動障害の改善が認められた。SG-MEのその改善効果には、脳由来神経成長因子の増加とそれに伴う神経細胞におけるTrkB受容体-ERK-CREB経路の活性化を介した海馬歯状回における神経新生細胞数増加が関与する可能性を証明した。本研究からSG-MEが神経栄養因子を増加させ神経新生を促進し記憶改善効果を有する化合物であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to explore the effects and underlying mechanisms of a newly synthesized scabronine G-methylester (SG-ME) on memory impairment in olfactory bulbectomized (OBX) mice, experimental animal models of depression and dementia. We observed that the memory impairment in OBX mice was improved at 24 hours after an intracerebroventricular (i.c.v.) injection of SG-ME. The present study has shown that SG-ME has anti-dementia effect, and the SG-ME activity to improve impaired memory is accompanied by enhancement of hippocampal cell proliferation mediated via activation of brain-derived neurotrophic factor-extracellular signal-regulated kinase-cAMP-response element binding protein (BDNF-ERK-CREB) signal pathway on neuronal cells. These results indicate that SG-ME may become a potential leading compound for drug development for Alzheimer's disease.

研究分野：中枢薬理学

キーワード：神経新生 認知症 うつ病 脳由来神経栄養因子 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の研究では、成長後も海馬歯状回顆粒下細胞層や側脳室外壁の脳室下帯で、神経新生が生じることが証明されている (Ming and Song, 2005)。三環系抗うつ薬や選択的セロトニン再取り込み阻害薬の投与だけではなく、電撃痙攣や持続的な運動により、海馬の神経新生が促進される。一方、精神疾患で認められる睡眠の障害によって神経新生が抑制されることも指摘されている (Sportiche et al., 2010)。従って、精神疾患の予防・治療には神経新生を促進する方法や薬物の開発が急務である。

(2) ヒナダシタケ目イボタケ科に属する担子菌ケロウジから単離された新規ジテルペノイドであるスカプロニン G (SG) の薬理活性試験を行った。SG はグリア細胞における神経成長因子 (NGF) の遺伝子発現が誘導され、NGF タンパク質の分泌を濃度依存的に促進した。さらに、新たに SG のメチルエステル化した誘導體 (SG-ME) を作製した結果、誘導體の方が SG と比較し、NGF の合成、分泌作用が 2 倍強いことを明らかにした。SG-ME は、グリア細胞においてプロテインキナーゼ C (PKC) を直接活性化させ転写因子である NF- κ B を介し NGF を発現させている可能性を報告してきた (Obara et al., 2001)。さらに、SG-ME は神経新生に関与している脳由来神経成長因子 (BDNF) レベルを促進することも予試験で確認していた。

(3) 認知症及びうつ病の動物モデルとしての嗅球摘出 (OBX) マウスは、吸引により嗅球を摘出するがその摘出 2~3 週間後に記憶学習障害やうつ様行動 [尾懸垂試験 (tail suspension test) における無動時間の延長や sucrose preference test により無快感症 (anhedonia) 等] といった異常行動を示す (Sato et al., 2010)。さらに、OBX マウスの海馬歯状回における神経新生の抑制がこのマウスの異常行動の発現に関与していることも報告されていた (Shioda et al., 2010)。

2. 研究の目的

この様な背景をもとに、本研究では精神疾患動物モデルである OBX マウスの異常行動及び海馬神経新生抑制に対する BDNF の役割及び SG-ME の効果について行動薬理学、分子薬理学、免疫組織学的並びに電気生理学的観点から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用動物；実験には体重 28~32g の ddY 系雄性マウスを使用した。

(2) 嗅球摘出 (OBX) 法；ペントバルビタール Na の腹腔内投与によって麻酔した後、マウスを脳定位装置に固定し、嗅球の真上の頭蓋骨に歯科用ドリルで 2ヶ所穴を開け、吸引

によって嗅球の 2/3 以上を摘出した。その後、止血のために摘出箇所を spongel を埋め込み、実験に用いた。OBX 手術による影響を検討する為に吸引による OBX は行わず、OB に傷をつけないように頭蓋骨に穴を開け、spongel で穴を塞いだだけのマウスをコントロールとして偽手術 (Sham) 群を作製し実験に用いた。

(3) 使用薬物及び投与方法；SG-ME を Passive avoidance test の Test trial 24 時間前に OBX 処置したマウス (術後 13 日目) の脳室内に投与した。尚、脳室内投与は、ペントバルビタール Na で麻酔させ 1 匹当たり 5 μ l を投与した。

各種阻害剤に関して、抗 BDNF 抗体は 100 倍に希釈し、SG-ME または溶媒と同時に脳室内投与した。BDNF が作用する TrkB 受容体拮抗薬の ANA12 は 0.5mg/kg を腹腔内投与後、SG-ME を脳室内投与した。Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 阻害薬 U-0126 は 3nmol/mouse を SG-ME または溶媒と同時に脳室内投与した。これら各種阻害剤の投与は SG-ME 同様、いずれも OBX 処置から 13 日後に実施した。また、溶媒として 10% DMSO を用いた。海馬における BDNF の生理機能を探る目的で麻酔下において BDNF を OBX マウスの両側背側海馬に微量注入した。

(4) Passive avoidance test；Passive avoidance 装置の明室にギロチンドアに背を向ける形で入れると、マウスはドアを通過して暗室へ移動する。移動したマウスの四肢が完全に金属グリッドに乗っているのを確認したうえで電気刺激 (1mA, 500msec) を負荷し、これを学習試行 (Learning trial) とした。その後、OBX 処置を行った。嗅球摘出後 14 日目に Learning trial 同様、OBX マウスを明室に入れ、暗室に入るまでの時間 (反応潜時間；Latency time) を測定し、これを試験試行 (Test trial) とした。Learning trial 及び test trial の cut-off time は 300sec とした。

(5) ウェスタンブロッティング；SG-ME 脳室内投与 24 時間後にマウスを断頭にて屠殺後、摘出した脳をブレインスライサーにより海馬を切り出し、CellLytic MT Lysis Reagent 中で十分にホモジナイズした。遠心分離後、上清を取り出し、タンパク質量を一定にし、サンプルバッファーを加え、加熱処理後、サンプルとした。10~15% SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、1 次抗体と反応させた。タンパク質の発現レベルは ECL Plus Western blotting detection system により化学発光を増強することで解析した。

(6) 免疫染色；マウスに麻酔を施し、灌流脱血直後、4% paraformaldehyde により組織固定を行った。背側海馬を含む脳切片はクリオ

スタットにより 40 μm の凍結切片を作製した。二抗体法による免疫組織化学的染色を行い、得られたサンプルは共焦点レーザー顕微鏡によって海馬の神経新生を測定した。

4. 研究成果

脳内の神経細胞の生存や成長、シナプス発達、海馬の神経新生の促進などに関与する BDNF を OBX マウスの両側背側海馬へ微量注入することにより OBX マウスの異常行動（記憶関連行動障害やうつ様行動）が改善することを行動薬理的に証明した。さらに、OBX マウスは、コントロール群と比較し、神経新生細胞数が海馬歯状回において顕著に抑制されていた。BDNF の海馬微量注入は、OBX 群で認められた海馬歯状回での神経新生細胞数の減少を改善させた。さらに、その BDNF 微量注入による神経新生促進作用は ERK / cAMP response element binding protein (CREB) シグナル経路を活性化していることをウエスタンブロット法により明らかにした。従って、BDNF 投与による OBX マウスの神経新生促進には ERK/CREB シグナル経路が関与していることが示唆されたため、BDNF の生合成・分泌促進効果のある SG-ME を用いて OBX マウスの精神関連異常行動及び神経新生に対する効果を検討した。

OBX マウスの脳室内に SG-ME を 20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 投与した際、投与直後ではなく投与 24 時間後に記憶関連行動障害の改善が認められた（図 1）。さらに、OBX マウスのうつ様

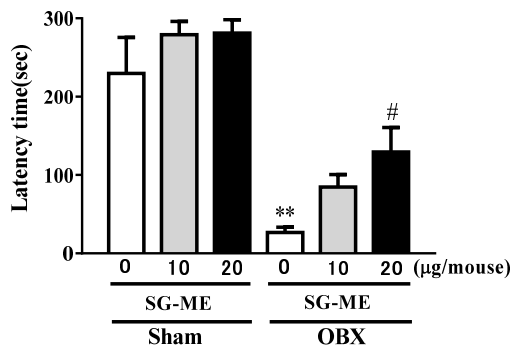


図 1 OBX 誘発性記憶関連行動障害に対する SG-ME の効果

行動も SG-ME 投与により改善した。その SG-ME の記憶関連行動改善効果は、BDNF 抗体、BDNF の受容体である TrkB 受容体アンタゴニスト ANA12、TrkB 受容体下流の ERK1/2 阻害薬である U-0126 をそれぞれ SG-ME と前処理又は同時投与することにより SG-ME による記憶関連行動改善効果が抑制された。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を使用し、海馬歯状回における新生細胞の変化を観察したところ、OBX マウスでは著しい新生細胞の減少が認められたが、SG-ME を脳室内投与した OBX マウスの新生細胞は増加した（図 2）。ウエスタンブロット法により OBX マウスの海馬では BDNF 量及び CREB 活性化の低下を認め、

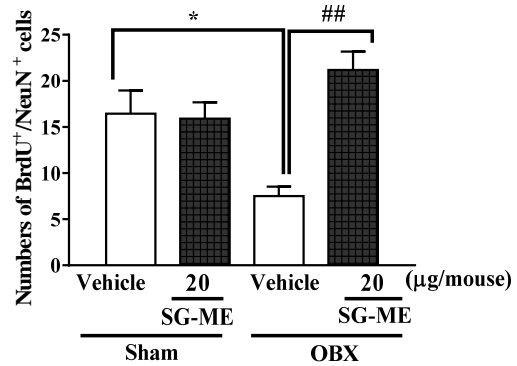


図 2 OBX マウス海馬歯状回における神経新生抑制に対する SG-ME の効果

これらの低下は SG-ME 脳室内投与により改善した。SG-ME 投与時のその CREB の活性化は神経細胞でのみ認められることを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。さらに、SG-ME 投与後の海馬スライスを用いシナプス伝達効率の上昇現象である長期増強作用を示すことを電気生理学的手法により証明した。

これらの行動薬理的、分子薬理的、免疫組織学的並びに電気生理学の結果から、OBX の記憶関連行動障害に対する SG-ME の改善作用は、BDNF を遊離し、その BDNF が TrkB 受容体に結合し ERK1/2 を介して海馬の歯状回で神経新生を促進している可能性を示唆した。

本研究から SG のリード化合物が神経栄養因子を増加させ神経新生を促進し記憶改善効果や抗うつ効果が *in vivo* で認められたことから、今後、神経変性に基因した認知障害やうつ病患者を対象とした臨床応用に大きな一歩を踏み出した。

<引用文献>

Ming GL, Song H, Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28, 2005, 223-50.

Sportiche N, Suntsova N, Methippara M, Bashir T, Mitrani B, Szymusiak R, McGinty D, Sustained sleep fragmentation results in delayed changes in hippocampal-dependent cognitive function associated with reduced dentate gyrus neurogenesis, *Neuroscience*, 170, 2010, 247-58.

Obara Y, Kobayashi H, Ohta T, Ohizumi Y, Nakahata N, Scabronine G-methyl ester enhances secretion of neurotrophic factors mediated by an activation of protein kinase C-zeta, *Mol Pharmacol*, 59, 2001, 1287-97.

Sato A, Nakagawasai O, Tan-No K, Onogi H, Niijima F, Tadano T, Effect of non-selective dopaminergic receptor

agonist on disrupted maternal behavior in olfactory bulbectomized mice, Behav Brain Res, 210, 2010, 251-6.

Shioda N, Yamamoto Y, Han F, Moriguchi S, Yamaguchi Y, Hino M, Fukunaga K, A novel cognitive enhancer, ZSET1446/ST101, promotes hippocampal neurogenesis and ameliorates depressive behavior in olfactory bulbectomized mice, J Pharmacol Exp Ther, 333, 2010, 43-50.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Takahashi K, Nakagawasai O, Nemoto W, Nakajima T, Arai Y, Hisamitsu T, Tan-No K, Alterations in behavioral responses to dopamine agonists in olfactory bulbectomized mice: relationship to changes in the striatal dopaminergic system, Psychopharmacology, 査読有, 233 巻, 2016, 1311-1322
DOI: 10.1007/s00213-016-4224-y.

Nakagawasai O, Nemoto W, Onogi H, Moriya T, Lin J-R, Odaira T, Yaoita F, Ogawa T, Ohta K, Endo Y, Tan-No K, BE360, a new selective estrogen receptor modulator, produces antidepressant and antimentia effects through the enhancement of hippocampal cell proliferation in olfactory bulbectomized mice, Behav Brain Res, 査読有, 297 巻, 2016, 315-322
DOI: 10.1016/j.bbr.2015.10.033.

〔学会発表〕(計16件)

高橋 浩平, 嗅球摘出マウスのうつ様行動に対するメマンチンの効果, 日本薬学会第137年会, 2017年3月25日~27日, 東北大学川内キャンパス(宮城県・仙台市)

小野 涼太郎, 嗅球摘出マウスのうつ様行動に対する Angiotensin 変換酵素阻害薬 Captopril の効果, 第26回神経行動薬理若手研究者の集い, 2017年3月14日, 福岡大学メディカルホール(福岡県・福岡市)

高橋 浩平, 嗅球摘出マウスにおける線条体 Dopamine 受容体機能変化とそれに及ぼす抗うつ薬の影響, 第67回日本薬理学会北部会, 2016年9月30日, 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

中川西 修, 精神疾患モデル動物作製とその発現機序の解明, 生体機能と創薬シンポジウム2016, 2016年8月25日~26日, 東北大学川内キャンパス(宮城県・仙台市)

小平 貴代, スカブロニン G-メチルエステ

ルの認知障害改善作用とその機序について, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2016, 2016年8月24日, 東北大学川内キャンパス(宮城県・仙台市)

中川西 修, うつ病モデルマウスの脳内ドパミン神経機能変化について, 第20回活性アミンに関するワークショップ, 2016年8月20日, ホテルマークワンつくば研究学園(茨城県・つくば市)

林 嘉蓉, スカブロニン G-メチルエステルは認知障害やうつ様症状を海馬の神経新生促進作用により改善する, 第19回活性アミンに関するワークショップ, 2015年8月20日~21日, 小名浜オーシャンホテル及び LATOV (福島県・いわき市)

Lin Jia-Rong, Scabronine G-methylester attenuates hippocampal neurogenesis impairment and the memory deficits induced by olfactory bulbectomy, 第24回神経行動薬理若手研究者の集い, 2015年3月17日, 名城大学名駅サテライト(愛知県・名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川西 修 (NAKAGAWASAI, Osamu)
東北医科薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 50296018

(2)研究分担者

小野木 弘志 (ONOGI, Hiroshi)
東北福祉大学・健康科学部・講師
研究者番号: 50610200

根本 互 (NEMOTO, Wataru)

東北医科薬科大学・薬学部・助手
研究者番号: 80635136

(3)連携研究者

丹野 孝一 (TAN-NO, Koichi)
東北医科薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 20207260

小原 祐太郎 (OBARA, Yutarou)

山形大学・医学部・准教授
研究者番号: 40400270