

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461709

研究課題名(和文) 体内時計機能の脆弱化による気分障害発症と海馬ニューロン新生亢進機序の究明研究

研究課題名(英文) Mechanism underlying the biological clock dysfunction-induced onset of mood disorder and hippocampal neurogenesis upregulation

研究代表者

栗田 征武 (Kurita, Masatake)

東北大学・薬学研究科・分野研究員

研究者番号：10423790

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)：生体リズムの異常と気分障害には深い関係性があることが指摘されているが、体内時計の異常が気分障害発症の一因であるかどうかはわかっていない。本研究では、気分障害の発症に深くかかわることが知られている海馬ニューロン新生に対する影響を調べ、その変化の分子基盤を明らかにすることを目的とした。その結果、Clock変異マウス躁病様行動異常が観察され、同時に神経幹細胞の増殖因子EGFに対する応答性が増強していた。また、神経幹細胞の増殖亢進には、Clockタンパク質が細胞周期関連因子の発現レベルに影響することに起因している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that the circadian rhythm dysregulation is associated with onset of mood disorder in human. In this study, we investigated the effects of clock gene mutation on the hippocampal neurogenesis and tried to clarify the underlying molecular mechanism. We found that clock mutant showed the mania-like behaviour of mice and hypersensitivity to EGF of cultured neural stem cells. The detailed assay revealed that clock mutation altered EGF-induced acute changes in clock-related genes as well as the cell cycle-related genes in the neural stem cells. These findings suggest that the molecular clock in the neural stem cells causally involve the onset of mood disorder via regulation the cell cycle conditions.

研究分野：精神神経薬理学

キーワード：時計遺伝子 Clock 気分障害 神経幹細胞 海馬ニューロン新生

1. 研究開始当初の背景

大うつ病や双極性感情障害、季節性感情障害などの気分障害の病態には、睡眠やホルモン分泌などの日内リズムの異常が観察され、体内時計の機能異常が気分障害発症の一因になっている可能性が指摘されている (Monteleone et al., *Biol Psychiatry* 35:1569-, 2011)。また、気分障害などの治療に用いられる睡眠剥奪療法や光療法が体内時計を調節する作用をもつことや、抗うつ薬や気分安定薬のリチウムが体内時計の機能を調節する作用をあらわすことも知られている。さらに、生体リズムの形成に重要な時計遺伝子の一塩基多型と気分障害の発症頻度および症状の間には高い相関性がみられることが明らかになり、体内時計の機能障害が気分障害などの精神疾患の発生要因であると考えられるようになった。したがって、体内時計の機能異常に伴う気分障害発症のメカニズムを解明し、それを治療法開発に応用することは喫緊の課題であるが、体内時計のどのような機能異常が気分障害を発症させる要因になっているのかについては全く明らかになっていない。

私たちはこれまで、神経栄養因子である BDNF の低下が双極性障害の発症に関係することを明らかにしてきた。さらに気分安定薬のバルプロ酸が培養アストロサイトの BDNF 遺伝子発現と細胞外分泌を促進することを報告し、気分障害の発症・治療に BDNF が深く関与していることを明らかにしてきた。BDNF は脳内ではニューロン新生を担う神経幹細胞の増殖や生存、ニューロン分化に重要であるが、近年、成体海馬におけるニューロン新生の低下が気分障害の原因の一つであり、抗うつ薬の治療効果には神経幹細胞の活性化(増殖促進)が必要であることが証明され (Santarelli et al., *Science*, 2003)、気分障害の病態に海馬ニューロン新生の異常が関与していることが明らかになった。

近年、海馬歯状回の神経幹細胞の増殖は特定の時刻に好発することが報告され (Tamai et al., *PLoS One*, 2008)、私たちも夜行性のマウスでは神経幹細胞の DNA 合成 (S 期) は明期 (休息期) に活発になり、引き続く有糸分裂は暗期 (覚醒期) に多くみられることを観察しているが、神経幹細胞の増殖における日内リズム形成の分子メカニズムは全く明らかになっていなかった。ところで十数種類の時計遺伝子はそのほとんどが転写調節因子をコードしており、相互の転写調節作用の結果として形成される転写・翻訳のフィードバックループが日内リズム形成の駆動力として働いており、時計遺伝子制御エレメントを有する多くの下流遺伝子の発現が日内リズムを示す。このような「時計支配下遺伝子」には細胞周期関連遺伝子も多く含まれていることから、海馬歯状回における神経幹細胞の増殖リズム形成のメカニズムとして、

「時計遺伝子が細胞自律的に神経幹細胞の増殖における日内リズムを作り出している」ことが予想された。私たちはこの作業仮説を証明すべく、生体から切り離れた培養下の神経幹細胞を用いて検討したところ、増殖因子 EGF の刺激により神経幹細胞の増殖に約 24 時間の周期性が認められ、これが時計遺伝子による周期的な制御によってもたらされることを報告した (Moriya et al., *Neuroscience* 146:494-498, 2007)。また、国外のグループから時計遺伝子 *Per2* の変異マウスでは海馬の神経幹細胞の増殖が亢進していることが報告され (Borgs et al., *BMC Neurosci.*, 2009)、神経幹細胞の増殖リズムは時計遺伝子の分子時計の制御によって形成されることが *in vivo* および *in vitro* の両面から明らかになった。一方、私たちはヒトの時計遺伝子 *CLOCK* の SNP (3111 T/C) と双極性障害の躁相に関連があるとの報告 (Benedetti et al., *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144:631-635, 2007) を受け、*Clock* 遺伝子に着目して検討を進めた。ところで、*clock* 19 変異マウスは化学変異誘導剤と行動リズムスクリーニングによって見出された長周期リズムを示すマウスであり、転写活性化を担う Q リッチ領域の部分的欠損により E-box を介した転写活性化能が低下することが知られているが、最近、*clock* 19 変異マウスは躁様の行動変化を示すことが報告された (Roybal et al., *PNAS* 104:6406-6411, 2007)。私たちは *clock* 19 変異マウスでは海馬ニューロン新生を担う神経幹細胞の細胞分裂が亢進していることを見出した。このような背景から私たちは、*clock* 遺伝子の変異に伴う体内時計機能の脆弱化がどのような仕組みで海馬・神経幹細胞の細胞分裂を亢進し、それが双極性障害などの気分障害の発症に寄与しているのかどうかを明らかにしていく必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「*clock* 遺伝子による神経幹細胞の細胞分裂制御機構を明らかにし、神経幹細胞における体内時計の機能異常が気分障害の発症の一因になっている可能性を検討する」ことである。この目的を達成するために、1) *Clock* 19 変異が海馬ニューロン新生に与える影響、2) *clock* 遺伝子による細胞周期制御機構の解明、3) *Clock* 19 変異による躁様行動発現に対する気分安定薬の改善効果の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 成体マウス海馬神経幹細胞の増殖活性に対する *clock* 変異の影響
明暗環境下(明期 12 時間、暗期 12 時間)の 1 日の様々な時刻で脳をサンプリングし(3 時間毎のサンプリング)、海馬歯状回の神経幹細胞の増殖活性およびニューロン・アストロサイト分化を詳細に解析し、*clock* 変

異の影響を時刻依存性を考慮しながら解析する。また、母マウスの育児能力などの発達環境が発育後の海馬ニューロン新生に与える影響を最小限に抑えるために、Clock 19ヘテロ変異マウスの雄雌の交配によって得られたマウス(野生型 = +/+マウス、ホモ変異マウス = clock/clockマウスと表現)を用いる。具体的には、8週令の雄性+/+マウスおよび clock/clockマウスを明暗環境下で2週間以上飼育し、その後、1日の様々な時刻[ZT2、ZT5、ZT8、ZT11、ZT14、ZT17、ZT20、ZT23(ZT0を明期開始時刻、ZT12を暗期開始時刻と定義する)]においてインフルランによる過剰吸入麻酔によってマウスを安楽死させた後に、4%パラホルムアルデヒド溶液にて心還流固定し、脳をサンプリングする。また、DNA複製期の神経幹細胞を評価する場合には、サンプリングの2時間前にチミジンアナログのプロモデオキシウリジン(BrdU、50 mg/kg)を腹腔内投与しておく。海馬歯状回を含む厚さ20 μmの冠状切片を作成し、各種増殖マーカー[BrdU = DNA複製期(S期)マーカー、リン酸化ヒストン H3 = 有糸分裂期(M期)マーカー]に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法を行う。神経幹細胞は海馬歯状回の顆粒細胞層と門領域の境界領域である顆粒細胞下層に存在するので、この領域の陽性細胞を海馬歯状回全体に渡って定量し、神経幹細胞の増殖に対するclock変異の影響を確定させるとともに、変異による増殖亢進が1日の時刻全体に渡って見られるのか、増殖における日内リズムが変容している(ピーク時刻がシフトしている)のかを見極める。

(2) 培養神経幹細胞の細胞周期解析

ニューロスフィア法を用いて神経幹細胞を分離培養し、実験に用いる。まず、ヘテロ変異マウス雌雄を一夜交配させ、妊娠15.5日目の妊娠マウスより胎仔マウスを取り出す。1匹ずつ海馬神経幹細胞をフラスコに培養し、RT-PCR法を用いたジェノタイピングを行い、+/+およびclock/clockの神経幹細胞を5~8日間培養する。各種plateに播種し、増殖因子で2日間刺激し、その増殖の程度をWST-8アッセイおよびBrdU取込みアッセイを用いて評価し、神経幹細胞自身のclock変異が増殖亢進に寄与していることを確認する。増殖因子としてはEGFを用いる。また2日間の増殖後に1%FCSで分化を誘導し、ニューロン・アストロサイト分化に与えるclock変異の影響を検討する。Clock変異による増殖亢進機序の一つとして、Clockタンパク質の認識配列であるE-boxを有し、かつ細胞周期に抑制的に働くp21やp27など遺伝子発現が低下している可能性が考えられる。そこで、EGF刺激後の神経幹細胞からRNAを抽出、逆転写後、PCRアレイ法(キアゲン、細胞周期関連遺伝子)によってclock変異によって発現変化する遺伝子を網羅的に検索

する。候補遺伝子の発現が培養条件下で概日リズムを示すのかをRT-qPCR法により確認し、clock下流の細胞周期因子を確定する。

(3) Clock 19変異による躁様行動発現の解析

Clock 19変異マウスの躁様行動が双極性障害の躁状態モデルとして妥当なのかどうかを強制水泳試験および高架式十字迷路試験で評価する。1)と同様に対象とするマウスはClock 19ヘテロ変異マウスの雄雌の交配によって得られたマウス(野生型 = +/+マウス、ホモ変異マウス = clock/clockマウス)を用いる。また、薬物投与は行動試験開始30分前に行うが、効果が著しくない場合には6日間の連続投与を行い、これらの慢性投与の影響を検討する。

4. 研究成果

まず、Clock 19変異が海馬ニューロン新生に与える影響を個体レベルの解析によって検討した。その結果、野生型マウスではBrdU標識細胞数は海馬歯状回・顆粒細胞下層において明期開始11時間後をピークとする日内リズムを、また、有糸分裂期(M期)マーカーのリン酸化ヒストン H3陽性細胞数は海馬歯状回・顆粒細胞下層において暗期開始11時間後をピークとする明瞭な日内リズムを示した。Clock 19変異においては、BrdU標識細胞数およびリン酸化ヒストン H3陽性細胞数はいずれのサンプリング時間においても野生型マウスに比較して高かった。つまり、Clock 19変異の影響は一日の時刻に関係なく、観察された。また、細胞死マーカーの活性化カスパーゼ3レベルや、ニューロンやアストロサイトへの分化率に対してはClock 19変異を与えなかった。このことより、時計遺伝子Clockは海馬歯状回の神経幹細胞の細胞周期を一日の時刻非依存的に抑制的に制御していることが明らかになった。さらに、高架式十字迷路試験によりマウスの不安水準を解析したところ、Clock 19変異マウスはオープンアームへの侵入回数や滞在時間が野生型マウスに比較して多く、clock変異マウスは危険を顧みない躁様の行動を示すことが明らかになった。

次に、Clock 19変異が分離培養した神経幹細胞の増殖に与える影響を解析した。胎生マウス前脳由来の培養神経幹細胞を用いた生細胞数アッセイやBrdU免疫染色により評価したところ、Clock変異マウス由来の神経幹細胞は野生型に比較してEGFによる増殖が亢進していた。さらに、PCRアレイにより細胞周期関連遺伝子のmRNA発現レベルを比較したところ、Clock変異マウス由来神経幹細胞において、野生型マウス由来とは発現パターンの異なるいくつかの細胞周期関連遺伝子を見出した。具体的には、細胞周期の進行に対して正に働く、ccnd2やmdm2、shc1のmRNAレベルを統計学的に有意に上昇してい

た。また、低濃度血清刺激による分化誘導後にニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトへの分化に対する clock 変異の影響を各細胞マーカーを用いた免疫染色によって解析したところ、clock 変異はニューロンやアストロサイトへの分化には影響しなかったものの、オリゴデンドロサイトへの分化を 30%程度にまで抑制した。これらの結果より、体内時計の分子的本体である時計遺伝子の Clock は、細胞周期関連遺伝子の発現を直接的あるいは間接的に制御することで、神経幹細胞の細胞分裂を調節し、さらに分化運命決定においては重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに、Clock タンパク質とヘテロダイマーを形成し、E-box に結合し転写促進因子として機能する Bmal1 に着目し、この遺伝子欠損マウス由来の神経幹細胞の EGF 応答性を検討したが、Clock 変異マウスとは対称的に EGF 応答性が低下していた。したがって、Clock 変異細胞の EGF 応答性は分子時計に非依存的な Clock の機能変異によってもたらされてい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4件)

Okuda-Tanino A, Sugawara D, Tashiro T, Iwashita M, Obara Y, Moriya T, Tsushima C, Saigusa D, Tomioka Y, Ishii K, Nakahata N, Licochalcones extracted from Glycyrrhiza inflata inhibit platelet aggregation accompanied by inhibition of COX-1 activity, PLoS ONE, 査読有、12、2017、e0173628

DOI: 10.1371/journal.pone.0173628.
eCollection 2017.

Kurita M, Moriya T, Nishino S, Hirata E, Hirasawa N, Okubo Y, Sato T, Non-24-hour sleep-wake syndrome improved by low-dose valproic acid: a case report, Neuropsychiatr Dis Treat, 査読有、12、2016、3199-3203

DOI: 10.2147/NDT.S115648

Takeyoshi K, Kurita M, Nishino S, Teranishi M, Numata Y, Sato T, Okubo Y, Yokukansan improves behavioral and psychological symptoms of dementia by suppressing dopaminergic function, Neuropsychiatr Dis Treat, 査読有、12、2016、641-649

DOI: 10.2147/NDT.S99032

Nakagawasai O, Nemoto W, Onogi H, Moriya T, Lin JR, Odaira T, Yaoita F, Ogawa T, Ohta K, Endo Y, Tan-No K, BE360, a new selective

estrogen receptor modulator, produces antidepressant and antidementia effects through the enhancement of hippocampal cell proliferation in olfactory bulbectomized mice, Behavioural Brain Research, 査読有、297、2016、315-322
DOI: 10.1016/j.bbr.2015.10.033

[学会発表](計13件)

四方田 亮、茂木 明日香、平澤 典保、守屋 孝洋、上皮成長因子(EGF)受容体を介した分子時計の位相同調作用機序の解明研究、日本薬学会第137年会、2017年03月25日~2017年03月27日、東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)

對馬 千沙都、小林 拓美、四方田 亮、佐々木 崇志、竹生田 淳、茂木 明日香、鈴木 登紀子、平澤 典保、小林 正樹、太田 英伸、守屋 孝洋、ガストリン放出ペプチド受容体刺激による体内時計のリセット機構の解析、日本薬学会第137年会、2017年03月25日~2017年03月27日、東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)

小林拓美、沢内美穂、桑田英文、井上莉香、對馬千沙都、太田英伸、程 肇、平澤典保、原田悦守、守屋孝洋、多機能性タンパク質ラクトフェリンによる体内時計の光同調促進作用機序の解析、日本薬学会第137年会、2017年03月25日~2017年03月27日、東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)

Moriya T, Kobayashi T, Kuwata H, Tsushima C, Sawauchi M, Hirasawa N, Harada E, The potentiating action of lactoferrin on the photic entrainment of the circadian clock in mice, 日本薬理学会第90回年会、2017年03月15日~2017年03月17日、長崎ブリックホール他(長崎県長崎市)

守屋孝洋、がん治療における時間薬物療法の現状と課題、第11回東北大学病院がんセミナー(招待講演)2017年02月16日、東北大学病院(宮城県仙台市)

對馬千沙都、佐々木 崇志、小林拓美、竹生田 淳、茂木明日香、鈴木登紀子、平澤 典保、小林正樹、太田英伸、守屋孝洋、ガストリン放出ペプチド(GRP)受容体刺激による体内時計の同調機構の解析、第23回日本時間生物学会学術大会、2016年11月12日~2016年11月13日、名古屋大学本山キャンパス(愛知県名古屋市)

小林拓美、桑田英文、井上莉香、對馬千沙都、沢内美穂、太田英伸、程 肇、小林正樹、平澤典保、原田悦守、守屋孝洋、ラクトフェリンによるマウス体内時計の光同調促進作

用機序の解析、第 23 回日本時間生物学会学術大会、2016 年 11 月 12 日～2016 年 11 月 13 日、名古屋大学本山キャンパス（愛知県名古屋市）

井上莉香、Bastos Gilmara、鈴木登紀子、太田英伸、平澤典保、守屋孝洋、恒明光環境下の発育が成長後のマウスにおける光マスキング効果に与える長期的な影響の解析、第 23 回日本時間生物学会学術大会、2016 年 11 月 12 日～2016 年 11 月 13 日、名古屋大学本山キャンパス（愛知県名古屋市）

守屋孝洋、小林拓美、桑田英文、井上莉香、對馬千沙都、沢内美穂、太田英伸、程 肇、平澤典保、原田悦守、マウス体内時計の光同調に対する牛由来ラクトフェリンによる促進作用機序の解析、日本ラクトフェリン学会第 7 回学術集会、2016 年 10 月 30 日～2016 年 10 月 30 日、昭和大学旗の台キャンパス（東京都）

守屋孝洋、佐々木崇志、對馬千沙都、松岡功、中畑則道、細胞外 ATP レベルの概日リズム形成機序とプリン受容体を介した細胞時計シンクロ機構、Japan Purine Club2016、2016 年 10 月 26 日～2016 年 10 月 27 日、東京慈恵会医科大学（東京都）

木村隼也、吉田寛伸、竹生田 淳、Bastos Gilmara、鈴木登紀子、吉川雄朗、根本 互、中川西 修、丹野孝一、谷内一彦、平澤典保、守屋孝洋、ニューロン新生マーカー・BrdU の脳内分布における拡散型ヌクレオシドトランスポーター1 (ENT1) の役割の解明、第 67 回日本薬理学会北部会、2016 年 09 月 30 日～2016 年 09 月 30 日、北海道大学学術交流会館（北海道札幌市）

守屋孝洋、体内時計が生み出す薬物作用の概日リズム、第 71 回医薬品相互作用研究会シンポジウム（招待講演）2016 年 05 月 21 日～2016 年 05 月 22 日、ホテルハマツ（福島県郡山市）

Takoda J、Sudo S、Mogi A、Fukuzawa H、Kurita M、Suzuki T、Shibata S、Moriya T、ROLE OF CLOCK GENE IN THE HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS、The 2nd Taiwan-Tohoku university Neuroscience Workshop for Young Scientists、2014 年 12 月 07 日～2014 年 12 月 10 日、宮城県蔵王町

〔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〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 征武 (KURITA, Masatake)

東北大学・大学院薬学研究科・分野研究員

研究者番号：1 0 4 2 3 7 9 0

(2) 研究分担者

守屋 孝洋 (MORIYA, Takahiro)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：8 0 2 9 8 2 0 7