平成20年度
実績報告

「精神・神経の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成20年度採択研究代表者

小島 正己

（独）産業技術総合研究所　関西センター
セルエンジニアリング研究部門 研究グループ 長

ＢＤＮＦ機能障害仮説に基づいた難治性うつ病の診断・治療法の創出

1. 研究実施の概要

本提案課題は、BDNFの前駆体(proBDNF)から成熟体(mBDNF)へのプロセッシング障害および分泌障害がうつ病の難治化を引き起こすと考え、BDNF 研究を専門とする基礎研究者とうつ病研究を専門とする精神科医が難治化うつ病の分子病態の解明とその知見に基づいた難治化うつ病の診断技術と治療法の開発を目指す。

平成20年度は、全年度における準備期間として、proBDNF 過剰発現難治性うつ病モデルマウスの解剖学的解析と網羅的行動テストバッテリー研究、BDNF分泌制御因子CAPS2ノックアウトマウスの行動薬理研究、母子分離難治性うつ病モデルラットの proBDNF 発現解析、proBDNF/mBDNF 特異的抗体の作製、血中バイオマーカー探索研究としてのプロテオーム解析系の作製と BDNF 遺伝子メチル化部位の同定、デキサメサゾン／CRH 負荷テストを指標としたうつ病患者データベースの構築、難知性うつ病診断のための Structual/Functional MRI 測定法の最適化 を実施した。その結果、うつ病難治化因子proBDNFの分子病態理解と難治性うつ病診断治療に向けた有用リソースの準備が進んだ。

2. 研究実施内容

研究 1) 難治性うつ病の分子/細胞病態の解明

1) BDNF プロセッシング障害マウスの意思決定障害（小島 G）

BDNF プロッシング障害モデルマウス（$BDNF^{pro/pro}$）のうつ病難治化に関する行動表現型を知るために、ホモ変異マウス（$BDNF^{pro/pro}$）の網羅的行動解析研究を宮川剛／高雄啓三博士（藤田保健衛生大／JST CREST）と共同で進めた。テールサスペンジョンテストで見いだしていた意欲低下に加え、本モデルマウスには著しい decision-making 障害が見出された（図1）。しかし、統合失調症試験であるプレパルスインヒビションはネガティブであった。つまり、ヒト血中 proBDNF 測定結果に一致して、$BDNF^{pro/pro}$マウスの表現型は統合失調症ではなく難治性うつ病であることが支持された。同時に進めた神経病理研究では、脳湿重

量の減少、p75 受容体を介した海馬歯状回神経細胞の樹上突起数の減少を定量的に明らかにした（投稿中）。今後は、うつ病難治化の脳内責任部位と分子病態の解明、難治化うつ病と意思決定障害の関係の解明を目指す。

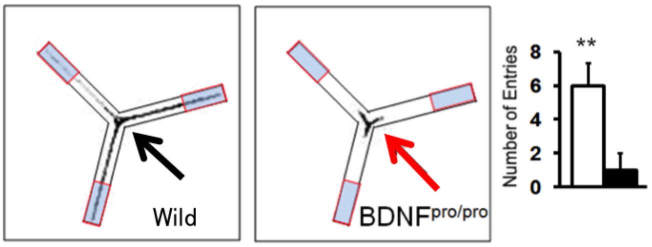

図1 BDNFプロセッシング障害マウスのDecision-Making異常 10分間の十字型迷路試験における両マウスの移動軌跡。実験開始後、Wildマウスは速やかなクローズドアーム逃避行動を示すが（黒矢印）、mutantマウスは逃避を示さずに装置中央部で多く滞留する（赤矢印）。

2）CAPS2 による BDNF 分泌制御の欠損と難治性うつ病との関連（古市 G）

CAPS2 KO マウスの神経病理と行動形質を解析した。方法としては、GFP による細胞染色、シナプス電気生理、電子顕微鏡による微細形態観察、不安・情動・学習などの各種行動テストを用いた。その結果、KO マウスでは GABA 作動性ニューロン数の変化、海馬シナプスの微細形態とシナプス小胞の変化、海馬シナプス可塑性の変化とBDNF による部分的な回復、および各種テストにおける不安様行動が亢進した。また、シナプス関連分子として Homer の役割も明らかにした[2)]。以上のことから、CAPS2 の欠損はシナプスの発達と機能、および GABA 系神経ネットワークに影響し、不安様形質増大につながることが示唆された。今後は、BDNF 分泌変化を生化学的に解析し、発症機序解明を目指す。

3）SNAP-25 変異マウスにおける BDNF の分子病態（高橋 G）

顕著な情動異常を示 す SNAP-25 変異マウスは、mBDNF と proBDNF が高発現となりアストロサイト活性化が見いだされる。本年度は、panBDNF 抗体を用いたイムノブロット解析から、SNAP-25 変異マウスの脳での BDNF の発現が生後 3～10 週頃に大きく増加することを定量的に明らかにした。

研究 2）難治性うつ病の危険因子と BDNF の相互作用の研究

1）母子分離による難治性うつ病モデルラットの脳内 BDNF 情報系の解析（山脇 G）

母子分離を受けたラット（生後 50 日）に、学習性無力(LH)試験（2 週間間隔、2 回）を行い、LH 状態（うつ病モデル）の遷延化した難治性うつ病モデルを作製した。このときの海馬 BDNF の発現を Western blot 法で調べたところ、proBDNF 発現の上昇を見いだした。今後は例数を増やした定量解析と受容体 p75 および TrkB の活性化状態を調べる。

2）グルココルチコイドと BDNF に関する細胞生物学的解析（功刀 G）

グルココルチコイドに急性暴露された培養神経細胞では BDNF 刺激に対して TrkB→PLC/Ca^{2+}シグナル経路の特異的阻害が起こり BDNF 依存的グルタミン酸放出が低下していた。しかし、グルココルチコイド慢性暴露(4-5 days)では、もうひとつの受容体 p75 が発現上昇し BDNF 依存的に細胞死が誘発された。つまり、慢性的グルココルチコイド暴露は、TrkB 優位の細胞内シグナルから p75 優位の細胞内シグナルへスイッチする可能性が示唆された。

研究3） BDNF 作用メカニズムの研究

1）mBDNF/proBDNF 特異的抗体の作製（小島 G／高橋 G）

BDNF のプロセッシング／分泌機序を解明しそれらに障害をもたらす疾患要因を見出すためには、mBDNF および proBDNF 特異的抗体作製が重要である。本年度は、proBDNF に対するモノクローナル抗体候補、mBDNF に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の作製を進めた。

研究4） 難治性うつ病血液診断用血中バイオマーカーの検索と有効性検証

1）難治性うつ病患者を基盤としたバイオマーカー開発（山脇 G）

BBDNF 遺伝子 promoter 上の 81 個の CpG についてそのメチル化状態を指標にした新たな難治性うつ病診断法（MassARRAY System）を確立した。

2）難治性うつ病血中バイオマーカーの検索研究（高橋 G）

難治性うつ病血中バイオマーカーを確立するために、SNAP-25 ホモ変異型マウス海馬のタンパク質のプロテオーム解析を行い、変異マウス特異的に変動するタンパク質を複数同定した。さらに、18 週齢変異型マウスの血清を2次元電気泳動法で展開し変動スポットを見いだしつつある。

研究5） 脳構造・機能を基盤とした難治性うつ病の診断法の確立

1）Structural MRI を用いた海馬構造測定（岡本 G）

国立がんセンター策定の海馬・扁桃体体積測定基準を参照しマニュアルトレース測定法の修得と確立、さらには信頼性検討を行っている。信頼性検討のために 1.5 Tesla MRI による 3D-SPGR シークエンスにより撮像した脳画像を準備し、左右をランダムにするため右海馬の反転画像を作成した。

2）Functional MRI を用いた海馬機能の測定（岡本 G）

難治性うつ病の客観的診断法の確立に向けて、海馬機能を評価するための連合記憶課題を作成し、若年健常者を用いて課題妥当性を検証した。その結果、符号化及び想起プロセスの両方で海馬の頑健な賦活が確認され、今回作成した課題は、海馬機能の測定に用いることができると考えられた。

研究6） In silico スクリーニングを用いた創薬開発研究

1）proBDNF/p75 相互作用に関する情報工学的解析（小島 G）

神経栄養因子とその受容体の立体構造をもとに、proBDNF シグナルを阻害する化合物候補を検索中である。

3. 研究実施体制

（1）「独立行政法人産業技術総合研究所：小島」グループ

①研究分担グループ長：小島　正己（（独）産業技術総合研究所、研究グループ長）

②研究項目　　BDNF 機能障害の分子病態の解明と難治化うつ病の診断・治療法の創出

(2)「広島大学 A：山脇」グループ

①研究分担グループ長：山脇　成人（広島大学、教授）

②研究項目

1) 母子分離による難治性うつ病モデルラットの脳内 BDNF 情報系の解析

2) 難治性うつ病患者を基盤としたバイオマーカーの開発

(3)「北里大学：高橋」グループ

①研究分担グループ長：高橋　正身（北里大学、教授）

②研究項目　モデルマウスを用いた難治性うつ病の病態機序の解明と新規診断法の開発

(4)「国立精神・神経センター：功刀」グループ

①研究分担グループ長：功刀　浩（国立精神・神経センター、部長）

②研究項目　うつ病における HPA 系と BDNF 機能の役割に関する研究

(5)「独立行政法人理化学研究所：古市」グループ

①研究分担グループ長：古市　貞一（（独）理化学研究所、チームリーダー）

②研究項目　CAPS2 による BDNF 分泌動態制御とうつ病神経ネットワーク障害の解析

(6)「広島大学 B：岡本」グループ

①研究分担グループ長：岡本泰昌（広島大学、講師）

②研究項目　脳構造・機能を基盤とした難治性うつ病の診断法の確立

4. 研究成果の発表等

（1）論文発表（原著論文）

1. Sadakata, T. and Furuichi, T. (2009) Developmentally-regulated Ca2+-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) is involved in BDNF release and is associated with autism susceptibility. The Cerebellum in press.
2. Shiraishi-Yamaguchi, Y., Sato, Y., Sakai, R., Mizutani, A., Knopfel, T., Mori, N., Mikoshiba, K., and Furuichi, T. (2009) Interaction of Cupidin/Homer2 with two actin cytoskeletal regulators, Cdc42 small GTPase and Drebrin, in dendritic spines. ***BMC Neurosci***. 10(1):25.

（2）特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）