

「精神・神経疾患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

平成 21 年度  
実績報告

小島 正己

(独)産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門  
バイオインターフェース研究グループ長

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

本研究課題では、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難治化を引き起こすと考え、基礎研究者と精神科医の連携チームが難治化うつ病の分子病態の解明とその診断技術と治療法の開発を目指す(小島正己、*Depression Frontier* 2010)。

平成21年度は、基礎研究者と臨床研究者の双方が共有すべき問題点を全体会議でよく把握しながら、各グループが研究計画を遂行した。実施概要は次のようになったが、計画していた実施内容だけでなく、予想を超えた研究進捗や新たな方向性も見いだされた。

- 1 研究代表者が有する BDNF プロセッシング障害マウス(BDNF<sup>pro/pro</sup> マウス)について、うつ病難治化モデルとしての妥当性を検証した。
  - (1)複数の抑うつ行動試験から抑うつ様行動を確認し、連日の強制水泳が与えるストレスが抑うつ症状を亢進することを見いだした。
  - (2)セロトニン神経繊維密度が著しく低下していた。
- 2 proBDNF が神経伝達に重要な構造スパインの密度を著しく低下させることを発表し、うつ病における神経可塑性仮説の検証に有用な細胞モデルの作製に成功した。
- 3 分担研究者が有する難治性うつ病モデル動物(母子分離モデルラット、SNAP-25 機能不全マウス、BDNF 分泌制御因子 CAPS-2 遺伝子欠損マウス)に、様々な BDNF 機能障害(プロセッシング障害、発現量の異常、分泌障害)を見いだした。
- 4 うつ病発症前環境要因であるストレスホルモンに関する研究では、DEX/CRH テストの診断応用の妥当性、ストレスと BDNF 機能障害に関する分子細胞生物学的知見が得られた。

- 5 fMRI の脳画像研究では、うつ病脳に見られる領域間ネットワークの障害診断に応用できる脳賦活課題の作成し、健常人を被検者としてその妥当性を検証した。
- 6 難治性うつ病の治療診断を目指したイノベーションシーズの創出研究では、BDNF 各分子種特異的抗体の作製と有効性の検証、多型研究から難治性うつ病のリスク遺伝子候補50個を同定した。

以上の実施内容から、うつ病患者およびモデル動物には様々な BDNF 機能障害が伴うことが判明した。しかし、うつ病とは極めて多様な臨床症状が混在した難治性疾患であることを再認識したとき、これらの BDNF 機能障害(生物学的中間表現型)と複雑な臨床症状のクロストークをより詳しく解明することが、うつ病の生物学的診断治療技術を創出していくためにも、今後の重要な課題である。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「産業技術総合研究所 (産総研)」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
  - 1) BDNF プロセッシング障害マウスの難知性うつ病モデルとしての妥当性
  - 2) うつ病難治化因子 proBDNF によるスパイン退縮のメカニズム
  - 3) BDNF isoforms 特異的抗体の作製と有効性評価
  - 4) BDNF pro-peptide の生理作用を発見: 新たなうつ病難治化因子の可能性

### (2)「広島大学・大学院医歯薬学総合研究所 (広大 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) 難治性うつ病の危険因子と BDNF の相互作用の研究
  - 2) 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
  - 3) うつ病発症に関連する BDNF 遺伝子メチル化パターン解析

### (3)「国立精神・神経センター (神経セ)」功刀グループ

- ① 研究分担グループ長:功刀 浩(国立精神・神経センター神経研究所、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検討
  - 1) うつ病患者における DEX/CRH テストによる HPA 系の評価、うつ病の遺伝子解析
  - 2) ストレスホルモン(グルココルチコイド)の BDNF 機能への影響に関する細胞生物学的検討
  - 3) BDNF や低親和性受容体 P75 に着目したうつ病動物モデルの解析

**(4)「北里大学医学部（北里大）」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

**(5)「独立行政法人 理化学研究所（理研）」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・大学院医歯薬学総合研究所（広大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

ヒト(健常者、うつ病)を対象とした脳構造画像および脳機能画像解析

**(7)「京都大学 生命科学系キャリアパス形成ユニット(京大)」高雄グループ**

① 研究分担グループ長:高雄 啓三(京都大学、講師)

② 研究項目

1) 難治性うつ病モデルマウスの網羅的行動テストバッテリーのセットアップ

2) BDNF プロセッシング障害モデルマウスの行動解析

### § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

**産業技術総合研究所（産総研）小島グループ**

**1)BDNF プロセッシング障害マウスの難知性うつ病モデルとしての妥当性**

研究代表者が有する BDNF プロセッシング障害マウス(BDNF<sup>pro/pro</sup>)は、proBDNF→mBDNF の反応効率が著しく低下しており、抗うつ薬スクリーニングに使用される尾懸垂試験での不動時間(抑うつ症状の指標)が長い。本年度は、様々な研究手法を用いて、当該マウスの難治性うつ病モデルとして妥当性を評価した。

- BDNF<sup>pro/pro</sup> マウスの抑うつ症状は強制水泳と尾懸垂の両試験から確認された。(両試験は逃避不可能なストレスを負荷した時の活動低下を測定する)
- ヘテロ接合体(BDNF<sup>pro/+</sup>)の不動時間は BDNF<sup>+/+</sup>と BDNF<sup>pro/pro</sup> の中間となり、モデルマウスの抑うつ症状には導入遺伝子の用量依存性が見いだされた。

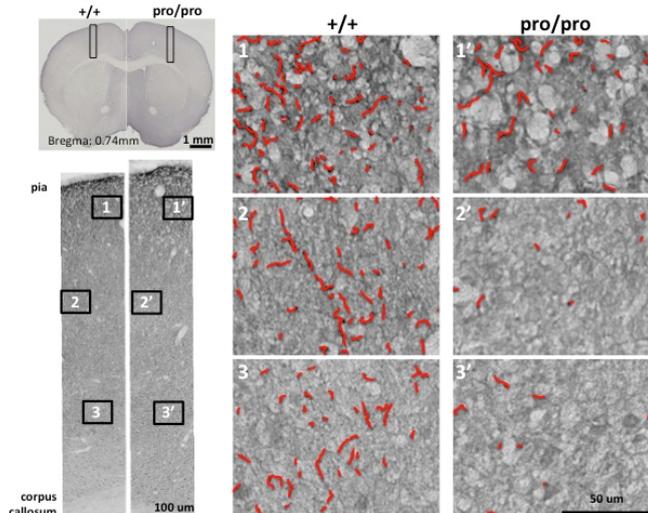
- 連日の強制水泳によるストレスがヘテロ接合体マウス(BDNF<sup>pro/+</sup>)の抑うつ症状を亢進し、proBDNFがうつ病発症リスクである可能性を示唆した。

- BDNF<sup>pro/pro</sup>マウスのセロトニン神経繊維密度は顕著に減少しており(図1:pro/proの赤)、抗うつ薬抵抗性モデルの可能性を示唆した。

- 複数メーカーのBDNF抗体を用いたウエスタンブロット解析から、BDNF<sup>pro/pro</sup>マウス脳の

proBDNF発現過剰を確認し、神経回路形成の異常や細胞内シグナル伝達の障害を見いだした(Kojima et al.論文修正中, Koshimizu et al., 2010<sup>A-1</sup>)。

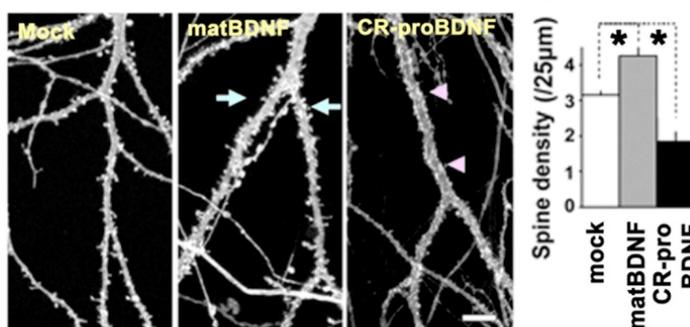
図1: Serotonergic fiber density of BDNF<sup>pro/pro</sup> cortex



## 2) うつ病難治化因子 proBDNF によるスパイン退縮

うつ病における神経可塑性仮説が提唱されている(Krishnan & Nestler, Nature, 2008; 熊ノ郷晴子、水井利幸、高橋正身、小島正己 実験医学 2010)。研究グループはproBDNFが培養海馬神経細胞のスパイン密度を顕著に低下させることを報告した(図2)<sup>A-2</sup>。シナプス形態のtime-lapse imaging研究では、proBDNFはスパイン構造を急速に

図2 proBDNF(CR-proBDNF)はスパイン密度を著しく減少させる



(Koshimizu et al., 2009)

不安定化させることを見だし(Mizui et al., 論文準備中)、この結果はさらに支持された。本成果に関する論文A-2は、ジャーナルのEditor pick of 2009に選出された。proBDNF自身に関しては最近特許が成立し(登録番号 特許第 4457216 号 登録日H22/02/19)、技術移転を進めている。

## 3) BDNF isoforms 特異的抗体の作製と有効性の評価

よく認知されているにも関わらず、BDNF分子種(proBDNF, mBDNF, BDNF pro-peptide)に対する特異的抗体の作製は世界的に遅れている。本年度は、これらに対する特異的抗体の作製と有効性評価を北里大学・広島大学と共同で進めた。組織中の内在性BDNFの検出やELISA反応を指標に有用と思われる複数のモノクローナル抗体候補を見いだした。

## 広島大学・大学院医歯薬学総合研究所（広大A） 山脇グループ

### 1) 難治性うつ病の危険因子とBDNFの相互作用の研究

母子分離(NI)ラットの学習性無力(LH)状態が、正常飼育ラットの LH 状態に比べて長期に持続することから、NI + LH ラットが遺伝子操作を用いないタイプの難治性うつ病モデルとなることを発見した。また、LH 状態となったラットでは母親となった後のその育児に問題があり、その子供の LH テストの結果にも影響した<sup>B-1</sup>。NI ラットの海馬及び大脳皮質前頭部での、BDNF, proBDNF 量を免疫沈降法と Western blot 法を用いて計測した結果、BDNF, proBDNF 量が海馬で亢進しており、BDNF プロセッシング障害が難治化に関与する可能性を示した。

### 2) 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

ラット末梢血からの血清及び血漿を材料に、免疫沈降法と Western blot 法を用いて、BDNF 及び proBDNF 量の計測方法を開発した。BDNF, proBDNF とも血清中に比べて血漿中の量は顕著に少なく、バイオマーカーの解析には血清 BDNF, proBDNF が適しているとわかった。

## 国立精神・神経センター（神経セ） 功刀グループ

### 1) うつ病患者における DEX/CRH テストによる HPA 系の評価、遺伝子解析

これまでに、うつ病患者と健常者を中心に 290 名の被験者に対して DEX/CRH テストを施行し、うつ病患者では HPA 系の非抑制が多いこと、また、健常者でストレス症状が高い者は HPA 系の過剰抑制が多いことを明らかにした(2009 年世界精神医学会で発表)<sup>C-1</sup>。

抗うつ薬への反応性を規定する遺伝子多型に関する全ゲノム解析(37万 SNPs)のデータに基づき、難治性うつ病と関連する遺伝子をスクリーニングした(重要と思われる50遺伝子を選定した)。

### 2) ストレスホルモン(グルココルチコイド)の BDNF 機能への影響に関する細胞生物学的検討

ストレスホルモン下では BDNF によって細胞死が誘導されること、その際、p75 の発現が上昇することなどを明らかにした(論文準備中)。また、p75 のミスセンス多型がうつ病と関連するメカニズムを解明した。

### 3) BDNF や低親和性受容体 P75 に着目したうつ病動物モデルの解析

ステロイドホルモン剤プレドニゾロンをマウス投与することによってうつ病モデルができることを行動薬理的に明らかにした。その海馬のマイクロアレイ解析の結果、アポトーシス関連遺伝子が発現上昇していることが明らかになった<sup>C-2</sup>。

難治性うつ病に有効とされるドーパミンアゴニストの前臨床研究を行い、抗うつ効果と海馬における BDNF-MAPK 系の活性上昇を明らかにした(The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP)にて発表、論文投稿・修正中)。

p75 に結合する低分子化合物の行動薬理学検討と p75 脳特異的過剰発現マウスの作成に成功しさらに解析を進めている。

## 北里大学医学部（北里大） 高橋グループ

### 1) 難治性うつ病の分子/細胞病態の解明

SNAP-25 変異マウスの脳では BDNF や proBDNF の著しい発現上昇が起きていると共に、うつ病患者にしばしば見られる不安様行動の亢進や拒食症状を示すという際だった特徴を持っている。このような多様な変化が、何故 SNAP-25 のリン酸化部位の変異で引き起こされるかを明らかにするため、生後発達期の行動変化と脳内変化を詳細に検討した。その結果、SNAP-25 のリン酸化は生後2週頃から急激に増加し、生後3週頃に最大となること、BDNF の発現上昇や情動異常の発症も、生後3週頃から出現することなどが明らかとなった。さらに野生型マウスに強いストレスを加えると SNAP-25 のリン酸化が上昇し、リン酸化が起こらない SNAP-25 変異マウスでは、ストレスへの適応に異常が生じていることも明らかとなった。正常マウスにピロカルピンを投与し、てんかん重積を引き起こさせると、数日後に BDNF の一過的な発現上昇が見られた後に、不安感の亢進という情動異常が生じることが明らかとなった。生じた情動異常は非常に強固に保持されており、数ヶ月経過しても同じように見られた。これらのマウスの脳内で生じている変化をさらに詳細に調べることにより、難治性の情動異常の発症機序を明らかにすることが出来ると考えられる。

## 2) BDNF 作用メカニズムの研究

BDNF のプロセッシングや分泌機構を明らかにし、それらがどのような要因によって障害されるかを明らかにするために必要な特異抗体の作製を行った。21年度は成熟体と前駆体 BDNF を共に認識する3つのモノクローナル抗体の作成に成功した。さらに前駆体特異的なモノクローナル抗体についてもハイブリドーマ作製を行いさらにスクリーニングを行っている。

## 3) 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の検証

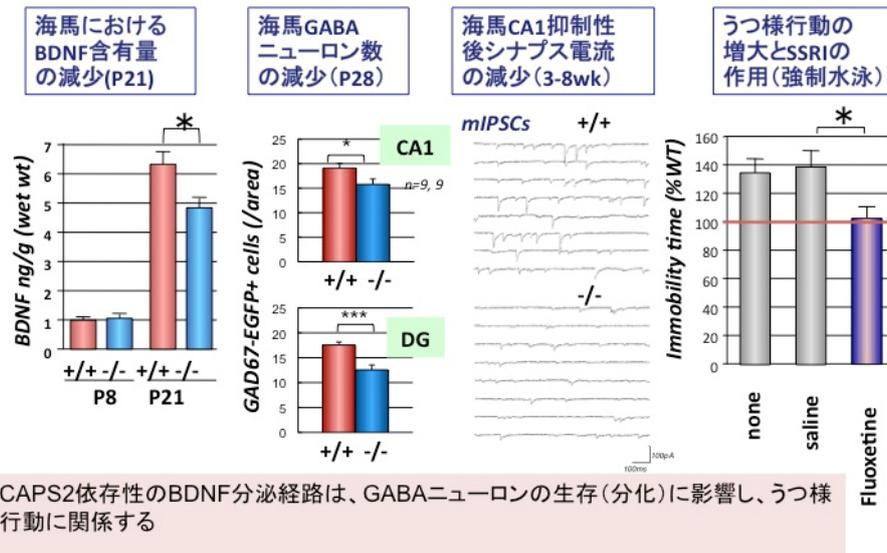
本分担研究の役割は、モデルマウスを用いて脳内異常を反映する血中バイオマーカーの候補分子を検索し、その定量法を確立することである。本年度は野生型およびホモ変異型マウス海馬のプロテオーム解析で顕著な移動度の変化を見せたタンパク質を解析し、リン酸化状態に大きな変化が生じている可能性を見いだした。

## 独立行政法人 理化学研究所（理研） 古市グループ

### 1) 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

CAPS2 による BDNF 分泌制御の欠損と難治性うつ病との関連性を明らかにするために、CAPS2 KO マウスの海馬における BDNF 分泌活性、ニューロンの微細形態、抑制性シナプス電流やシナプス可塑性(長期増強)、脳波などの解析、および不安様・うつ様など行動を解析した。その結果、KO マウスでは BDNF 分泌活性が低下しており、GABA 作動性抑制性ニューロンネットワークの異常が示唆された。また、各種行動テストで、不安様行動の有意に増加し<sup>D-1</sup>、ストレス負荷によるうつ様症状も観察された。さらに、CAPS2 に関連する分泌小胞の産生のプロテオミクス解析を行い、CAPS2 がトランスゴルジ経路にも関与することが示唆された(図3)。今後は、CAPS2 による BDNF 分泌動態のメカニズム、KO マウスにおけるカテコールアミン系の分泌変化、およびうつ様症状発症の脆弱性などについてさらに詳細な解析を進める。

図3 CAPS2 KOマウス: BDNF量の減少、GABAニューロンの減少と抑制性後シナプス電流の低下、うつ様行動の増大



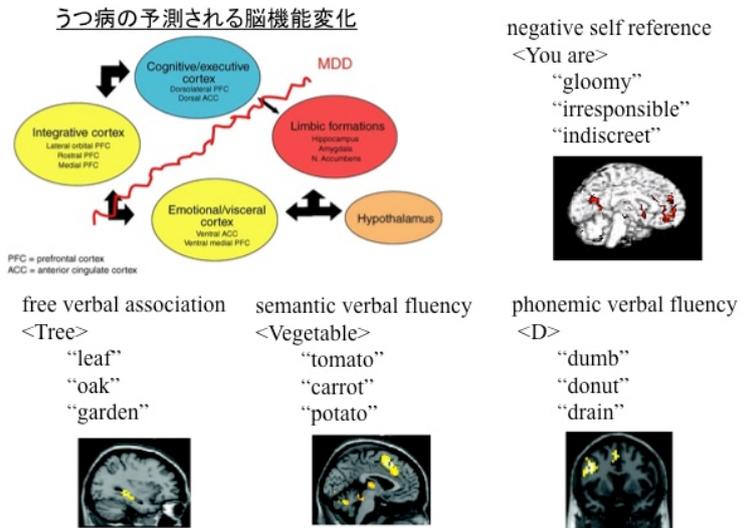
CAPS2依存性のBDNF分泌経路は、GABAニューロンの生存(分化)に影響し、うつ様行動に関係する

広島大学大学院歯薬学総合研究科 (広大B) 岡本グループ

1) ヒト(健常者、うつ病)を対象とした脳構造画像および脳機能画像解析

これまで使用してきた 1.5T の MRI から、S/N 比の向上を目的として 3.0T の MRI のセットアップを行い、実験に利用できるよう準備を行った。structural MRI に関しては、SPM5 を用いた Voxel-based morphometry(VBM)を習得し全脳を対象とした構造測定が可能となった。さらに海馬・扁桃体体積に関してはマニュアルトレースによる測定技法を習得し、現在、信頼性の検討を行っている。

図4 脳賦活課題の作成および妥当性の検証



うつ病の予測される脳機能変化に合致した脳賦活課題の作成が終了

spontaneous BOLD fluctuation analysis を用いて、activated state だけでなく覚醒休息状態 (resting state)に関連した脳活動/脳内ネットワークを推定することが可能となった。functional MRI に関しては、うつ病で重要と考えられる異なる脳領域、背外側前頭前野、前帯状皮質、内側前頭皮質、腹内側前頭皮質、海馬などの機能を評価するための複数の脳賦活課題を作成し、若年健常者を被検者として妥当性を検証した(図4)<sup>E-1</sup>。

## 京都大学 生命科学系キャリアパス形成ユニット(京大) 高雄グループ

### 1) 難治性うつ病モデルマウスの網羅的行動テストバッテリーのセットアップ

京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニットにおいて、遺伝子改変マウスの網羅的行動テストバッテリーを行うためのセットアップを行い、スクリーニングのために最低限必要な実験を行うことが可能となった。

### 2) BDNF プロセッシング障害モデルマウスの行動解析

産総研小島グループで開発した BDNF プロセッシング障害モデルマウスのホモ接合体について網羅的行動解析を行い、うつ様行動の増加を確認した。さらに、Y迷路においてアームの選択不能に陥るといった精神運動抑止あるいは decision-making の異常も見いだされた。

ヘテロ接合体についても同様の網羅的行動解析を行った。強制水泳試験は最も一般的なうつ様行動試験であるが、ホモ接合体はこの試験に適応できないことに対し、ヘテロ接合体はうつ様行動の増加を見だし、今後は抗うつ薬によるレスキュー実験などを予定している。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

#### 産業技術総合研究所 (産総研) 小島グループ

A-1) Koshimizu, H., Hazama, S., Hara, T., Ogura, A. & Kojima, M. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett.* 473, 229-232, 2010. DOI:10.1016/j.neulet.2010.02.055

A-2) Koshimizu, H. Kiyosue, K. Hara, T. Hazama, S. Suzuki, S. Uegaki, K. Nagappan, G. Zaitsev, E, Hirokawa, T, Tatsu, Y. Ogura, A. Lu, B and **Kojima, M**: Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Molecular Brain* 2:27, 1-19, 2009. DOI: 10.1186/1756-6606-2-27

#### 広島大学・大学院医歯薬学総合研究所 (広大A) 山脇グループ

B-1) Kurata A, Morinobu S, Fuchikami M, Yamamoto S, **Yamawaki S**: Maternal postpartum learned helplessness (LH) affects maternal care by dams and responses to the LH test in adolescent offspring. *Horm Behav.* 56: 112-120, 2009. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2009.03.016

#### 国立精神・神経センター (神経セ) 功刀グループ

C-1) Kajiyama Y, Iijima Y, Chiba S, Furuta M, Ninomiya M, Izumi A, Shibata S, **Kunugi H**: Prednisolone causes anxiety- and depression-like behaviors and altered expression of apoptotic genes in mice hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 34(1): 159-165, 2010. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.10.018

C-2) Hori H, Ozeki Y, Teraishi T, Matsuo J, Kawamoto Y, Kinoshita Y, Suto S, Terada S, Higuchi

T, Kunugi H. Relationships between psychological distress, coping styles, and HPA axis reactivity in healthy adults. *J. Psychiatr Res.* 2010 Mar 22. in press.

独立行政法人 理化学研究所（理研） 古市グループ

D-1) Sadakata, T. and **Furuichi, T**: Developmentally-regulated Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) is involved in BDNF release and is associated with autism susceptibility.

*The Cerebellum* 8:312-322, 2009. DOI: 10.1007/s12311-009-0097-5

広島大学大学院歯薬学総合研究科（広大B） 岡本グループ

E-1) Yoshimura S, **Okamoto Y**, Onoda K, Matsunaga M, Ueda K, Suzuki SI, Yamawaki S: Rostral anterior cingulate cortex activity mediates the relationship between the depressive symptoms and the medial prefrontal cortex activity. *J Affect Disord.* 122, 76-85, 2010 DOI:

doi:10.1016/j.jad.2009.06.017