

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07929

研究課題名(和文) ストレス誘発うつ病の診断法確立に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for establishment of the diagnostics in stress-induced depression

研究代表者

船上 仁範 (FUNAKAMI, Yoshinori)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：70449833

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)：慢性ストレスが海馬神経新生にどのような影響を与えてうつ病を発症させているのか検討した。その結果以下の知見を得た。(1)慢性ストレスにより情動体験や記憶に関与する海馬神経新生を低下させる。(2)海馬神経新生に神経特異的RNA結合タンパク質Huが関与している。(3)慢性ストレスにより神経分化に必要なRNA結合タンパク質Huの発現が低下することが示唆された。すなわち、慢性ストレスはHuタンパク質の発現低下を介して、海馬神経新生を低下させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ストレスはうつ病や不安障害など精神系疾患を発症させる一要因であるが、その分子メカニズムの詳細が不明なため診断と治療を複雑化させている。この研究から、慢性ストレスによる神経分化に必要なRNA結合タンパク質Hu発現の低下を介して海馬神経新生を低下を誘発し、ストレスにより発症及び憎悪する可能性が明らかとなり、その診断と治療を向上させる一つの手段となり得ることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated how chronic stress affects hippocampal neurogenesis to cause depression. The following findings were obtained: (1) Chronic stress decreases hippocampal neurogenesis involved in emotional experience and memory. (2) Neuron-specific RNA-binding protein Hu is involved in hippocampal neurogenesis. (3) Chronic stress reduces the expression of RNA-binding protein Hu, which plays an important role in neuronal differentiation. These results suggest that chronic stress reduces hippocampal neurogenesis via decreased expression of Hu protein.

研究分野：生化学・薬理学

キーワード：慢性ストレス うつ 神経新生 RNA結合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代病であるストレスはうつ病や不安障害など精神系疾患を発症させる一要因であり、気分(感情)障害であるうつ病は、半数以上が不安障害も併発している。うつ病では、画像診断において情動を制御している大脳辺縁系の海馬が萎縮し、神経の器質的異常を示す。しかしながらこれらの異常がどのように生じるのかについての詳細な分子メカニズムは不明であり、診断と治療を複雑化させている。また、うつ病の診察は問診が主体であり、うつ病の検査法や確定診断の確立は急務である。

2. 研究の目的

これまで、うつ病においては、神経に対する器質的異常はないと考えられてきた。しかしながら、近年の画像診断技術の発達により、うつ患者における海馬の萎縮、すなわち神経の損傷による脱落(器質的異常)が認められた。また海馬で神経が新たに生まれる神経新生が示され、うつ病では神経新生に異常をきたし、神経脱落の補完ができず神経回路の異常を引き起こす海馬神経新生仮説が提唱されている。この海馬神経新生に着目し、慢性ストレスによる海馬神経新生における細胞レベルの機能変化、さらにはタンパク質発現などの分子レベルへの影響を検証する。また、神経への分化に必要な神経特異的 RNA 結合タンパク質である Hu タンパク質の海馬神経新生の過程における発現・分布を解析することで分子レベルでのストレス誘発うつ病の原因特定を試みた。

3. 研究の方法

(1) SART ストレスマウスおよび正常マウスにおける海馬神経新生への影響

実験動物として、体重約 20-30g (約 4 週齢) の ddY 系雄性マウス(日本 SLC)を使用した。

慢性ストレスとして SART ストレスを使用し、既報の方法に準じて行った¹⁾。すなわち、室温 24℃ の飼育室と庫内温度 4℃ の動物飼育用チャンバーの両方にマウス飼育用ケージを用意し、毎日 9 時から 16 時までの間は 1 時間ごとにマウスを両ケージ間に移し変え、16 時から翌朝 9 時までは 4℃ のチャンバー内で飼育するという環境温度変化に 7 日間曝すことによってマウスにストレスを負荷した。(Fig.1)

各種実験においては、SART ストレスマウスと正常マウスの 2 群を使用して比較した。

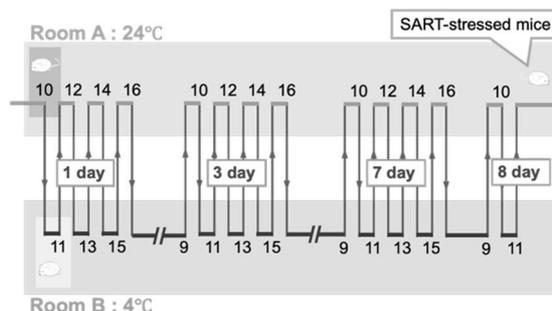


Fig.1 Time Schedule for SART Stress Loading

1) Hata T, Kita T, Itoh E, Harada N. Jpn J Psychosom Med 1984;24:257-266.

海馬歯状回における新生細胞数への SART ストレスの影響

マウスに新生細胞のマーカーとして EdU, 50mg/kg を、SART ストレス負荷終了前 3 日間、1 日 1 回連日腹腔内投与した。EdU 最終投与の翌日に 4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定を行い、海馬歯状回の標本を作製し、EdU を免疫染色した。

海馬歯状回の顆粒細胞下層において染色された EdU 陽性細胞数を計測した。

神経新生の評価

神経新生の指標として未熟神経細胞のマーカーである Doublecortin(DCX) を使用した。

と同様の方法で EdU を投与し、EdU 最終投与の翌日、4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定を行い、海馬歯状回の標本を作製し、EdU と DCX を蛍光免疫染色し、EdU と DCX が共染色された細胞数を計測した。

神経分化率は EdU 陽性細胞数に対する EdU と DCX が共染色された細胞数の割合を算出し、評価した。

(2) 慢性ストレスによる海馬神経新生低下への神経特異的 RNA 結合タンパク質 Hu の関与

海馬神経新生の過程において、神経幹細胞は神経前駆細胞を経て神経細胞に分化する。それぞれの細胞のマーカーとして、神経分化前の神経幹細胞は Musashi1 を、神経前駆細胞は MASH1 を、神経分化後の未熟神経細胞には DCX を使用した。SART ストレス負荷終了後、4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定して、海馬歯状回の標本を作製した。これらの神経新生関

連のマーカーと神経特異的 RNA 結合タンパク質 HuB および HuC をそれぞれ免疫染色し、海馬神経新生過程における HuB と HuC の分布と発現変化を検証した。さらに、HuB および HuC がそれぞれの神経新生過程におけるマーカーと共局在している割合を算出した。

4. 研究成果

慢性ストレス状態にある SART ストレスマウスはうつおよび不安様症状を示す。このストレスマウス海馬歯状回では新生細胞数の有意な増加が認められた。また EdU 陽性細胞数に対する EdU, DCX 両陽性細胞数の割合である神経への分化率は有意に減少していた。これらの結果から、SART ストレスにより海馬歯状回における新生細胞は神経細胞へ分化せずそのままの状態を維持あるいは消滅している可能性が示唆された (Fig.2)。

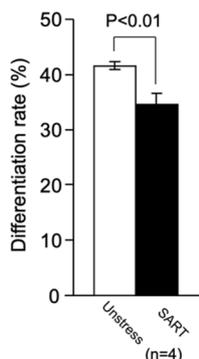


Fig.2 Influence of SART stress on hippocampal neurogenesis

海馬神経新生は、増殖能の有無で分類することができ、RNA 結合タンパク質の Musashi1 と神経特異的 Hu の発現量により調節されている。Hu タンパク質は哺乳類においては 4 種類存在するが、そのうち HuB, HuC, HuD が神経特異的に発現しており、神経特異的 Hu の発現増加に伴い、Musashi1 が減少することで細胞増殖と神経への分化を制御している。海馬神経新生過程における HuB および HuC の発現・分布を検討した。HuB は Musashi1, MASH1 と一部共局在しており、DCX との共局在は認められなかった。一方、HuC は神経新生過程における全てのマーカーと共局在しており、顆粒球上層の成熟神経細胞においても発現が認められた。つまり、神経新生過程において、HuB は神経幹細胞と神経前駆細胞の神経分化に関与し、HuC は神経新生のすべての過程に関与していることが考えられる。

次に慢性ストレスが海馬神経新生過程における HuB および HuC の発現・分布に与える影響について検討した。慢性ストレスによって、HuB は、Musashi1 との共局在率は上昇したが、MASH1 との共局在率には変化が認められず (Fig.3), HuC では Musashi1 に加えて DCX との共局在率は上昇した (Fig.4)。また、慢性ストレスにより、新生細胞が増加すること、また新生細胞の神経への分化率が減少することから、慢性ストレスによる神経の分化率低下を補うために、新生細胞は増殖し、また分化過程においては Hu がより早い段階に発現を開始し、分化を促進する方向に機能している可能性が考えられる。

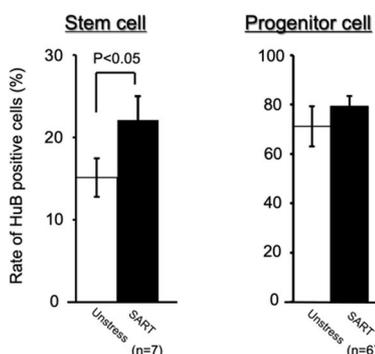


Fig.3 Influence of SART stress on the expression of Hu-B in hippocampal neurogenesis

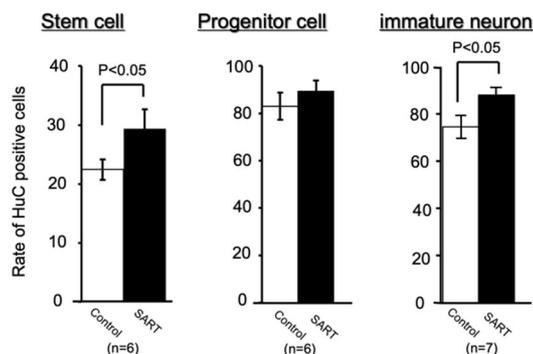


Fig.4 Influence of SART stress on the co-expression of Hu-C in hippocampal neurogenesis

つまり、慢性ストレスによる神経新生の低下を補うため、HuB, HuC が神経への分化をより促進している可能性が考えられ、慢性ストレスにより引き起こされるうつや不安様行動に対し抑制的に機能する可能性が示唆された。また、ストレス誘発うつ病の診断にこれらの Hu タンパク質がマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Otsuka H, Fukao A, Tomohiro T, Adachi S, Suzuki T, Takahashi A, Funakami Y, Natsume T, Yamamoto T, Duncan KE, Fujiwara T.	4. 巻 174
2. 論文標題 ARE-binding protein ZFP36L1 interacts with CNOT1 to directly repress translation via a deadenylation-independent mechanism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 49-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biochi.2020.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Otsuka H, Fukao A, Funakami Y, Duncan KE, Fujiwara T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Emerging Evidence of Translational Control by AU-Rich Element-Binding Proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2019.00332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀越 真緒、八木 瞳、船上 仁範、深尾 亜喜良、藤原 俊伸
2. 発表標題 血管内皮増殖因子（VEGF）mRNAのcap非依存的な翻訳開始機構
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田莉沙、永野可菜、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症（SMA）の病因タンパク質SMNの細胞質における機能解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 友廣 拓生、深尾 亜喜良、町田 幸大、船上 仁範、今高 寛晃、藤原 俊伸
2. 発表標題 翻訳開始因子eIF4BおよびeIF4HによるIRES依存的翻訳開始機構の制御
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西阪皓理、友廣拓生、深尾亜喜良、船上仁範、 藤原俊伸
2. 発表標題 ARE結合タンパク質AUF1による翻訳制御機構の解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船上 仁範
2. 発表標題 Influence of SART stress on hippocampal neurogenesis in mice
3. 学会等名 第16回 成体脳ニューロン新生懇談会・「個性」創発脳共催研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田莉沙、永野可菜、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症（SMA）の病因タンパク質SMNの細胞質における機能解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hikari Nishisaka, Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toshinobu Fujiwara
2. 発表標題 Analysis of translation regulation mechanisms by ARE-binding protein, AUF1
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kako Fukuzumi, Yuka Nakaema, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toshinobu Fujiwara
2. 発表標題 Functional interaction between the neuronal RNA-binding protein HuD and active Akt1
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平河 顕也、友廣 拓生、深尾 亜喜良、船上 仁範、藤原 俊伸
2. 発表標題 神経特異的RNA結合タンパク質による翻訳開始制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（横浜）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 満紀子、平川 顕也、友廣 拓生、深尾 亜喜良、藤原 俊伸、船上 仁範
2. 発表標題 成体海馬神経新生におけるRNA結合タンパク質Huの関与
3. 学会等名 日本薬学会第142年会(名古屋)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤原 俊伸 (FUJIWARA Toshinobu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------