

臨床・基礎研究のクロストークによる精神疾患の克服

名城大学 薬学部 病態解析学 I

毛利 彰宏

1. はじめに

うつ病とは慢性的な抑うつ気分、興味・喜びの消失、気力の減退、精神運動性の焦燥もしくは静止、無価値感・罪悪感、自殺念慮などの症状を示す病である。日本では年間 3 万人以上が自殺により命を絶っており、日本の自殺率はアメリカ合衆国の自殺率の2倍であり、自殺数の増加は国内でより深刻な社会問題になっている。うつ病の生涯有病率は約10~20%と非常に高く、自殺者の 70~90%が生前に精神疾患に罹患しており、そのうち60~70%がうつ病であると報告されている。そのため自殺対策への観点からも、うつ病の問題を軽視することはできない。

うつ病の病態にはセロトニンを中心としたモノアミンの神経伝達異常が関与するモノアミン仮説が提唱されている。その一因として、うつ病患者ではセロントランスポーターの機能の亢進が関与しており、セロントランスポーターを標的とした選択的セロトニン再取り込み阻害薬が抗うつ薬として開発されている。我々は、現在うつ病治療のターゲット分子となっているセロントランスポーターがユビキチン化を介して代謝されること、それにはMAGE-D1が関与し、MAGE-D1遺伝子欠損によりユビキチン化の低下によるセロントランスポーターの異常な亢進がうつ様行動に関与していることを世界に先駆けて明らかにし、それを基に特許を取得してきた。

本助成研究では、臨床・基礎研究のクロストークによるうつ病の病態解明および新規診断薬の開発を最終的な研究目的とし、基礎研究ではストレス負荷時におけるユビキチン化によるセロントランスポーターの調節機構を解析し、うつ病の新しい病態仮説を提唱するとともに、それを基盤とした新しい治療薬戦略を構築するため、1)培養細胞を用いたセロントランスポーターの機構機構の解明として、セロントランスポーターに対するユビキチンリガーゼの探索、2)薬理的うつ病モデル動物におけるセロントランスポーターの代謝機構への影響として、ストレス負荷時におけるユビキチン化によるセロントランスポーターの変化について検討を行った。一方、臨床研究ではうつ病患者におけるセロントランスポーターの代謝異常を検討し、セロントランスポーターの機能調節に注目した診断法の開発をめざすため、3)うつ病患者から単離した株化リンパ球におけるセロントランスポーターのユビキチン化の変化、4)健常者における血小板中のセロントランスポーターのユビキチン化と気質との関連比較について検討を行った。

2. 方法

2-1. 細胞培養：ラットセロントランスポーター恒常発現CHO細胞(チャイニーズハムスターの卵巣由来細胞)は、10% FBS、100単位/mlペニシリン、0.1 mg/mlストレプトマイシンを含むDMEMで37°C、5% CO₂の条件下で培養した。また、細胞への遺伝子導入はエレクトロポレーション法により行った。

2-2. マウスへの社会敗北ストレスの負荷：3週齢のC57BL/6J系雄性マウスに攻撃性を示すICR系雄性マウスに10分間接触させ、社会敗北ストレス負荷を行った。

2-3. うつ病患者由来リンパ芽球様細胞株の作製:うつ病患者および健常者から採血し、Ficoll-Paque液に重層し、遠心分離した。リンパ球細胞を含む中間層を採取し、再度、リン酸緩衝生理食塩水および液体基礎培地を加え、遠心分離により得られたリンパ球細胞の培養を開始した。培地に、エプスタイン・バールウイルスろ過液を添加し、株化を行った。継代は、最初は20% FBS 培地で培養し、その後10% FBS 培地を用いて培養を行った。

2-4. 末梢血からの血小板分画の抽出:健常者から採血し、ヘパースタイロード緩衝液を加え、遠心分離した。その上清にさらにヘパースタイロード緩衝液を加え、遠心分離により得られた沈殿を血小板分画として抽出した。

2-5. 社会性行動試験:オープンフィールドの端に空気穴を有する透明アクリル樹脂製のボックスが設置された装置を使用した。第1セッションでは、実験装置に設置されたボックス内は空の状態に侵入マウスを30分間自由に探索させた。その1分後の第2セッションでは、ボックス内に標的マウスを存在させた装置に被験マウスを入れ、5分間自由に探索させた。交流区域 (ボックスの周囲4 cmの区域) での滞在時間を測定した。

2-6. ウェスタンブロッティング法

社会敗北ストレス負荷24時間後、マウスの前頭皮質を摘出した。サンプルは溶解バッファー中で超音波破碎し、ホモジナイズし、遠心分離し、得られた上清を使用した。サンプルは10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、ポリビニリデンジフルオリド膜へ蛋白を転写し、3%牛血清アルブミンにてブロッキングした。PVDF膜に1次抗体および、2次抗体を加え、インキュベーションした。化学発光により特定のバンドを検出し、蛋白の発現量を算出した。

3. 結果 研究成果

3-1. セロトニントランスポーターの代謝機構の解明:セロトニントランスポーターに対するユビキチンリガーゼの探索:セロトニントランスポーター恒常発現CHO細胞にMAGE-D1を遺伝子導入した。そのライセートから免疫沈降によりセロトニントランスポーターを回収し、そこからMAGE-D1に対する抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、MAGE-D1が検出され、セロトニントランスポーターにMAGE-D1が直接結合していることが明らかとなった。さらに、MAGE-D1の一部分を過剰発現させることにより、MAGE-D1におけるMAGEホモロジドメイン (MHD) を介してセロトニントランスポーターと結合することに重要であることが明らかにした。標的タンパク質に対するユビキチン化はユビキチンシステムと呼ばれ、3つの酵素、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、さらにユビキチン転移酵素(ユビキチンリガーゼ) (E3) によって行われる。特にユビキチン修飾系の生理学的重要性はユビキチンリガーゼE3による状況に応じた選択的な基質識別に依存している。本研究において、MAGE-D1と結合するユビキチンリガーゼE3であるPraja-1をセロトニントランスポーター恒常発現CHO細胞に遺伝子導入したところセロトニントランスポーターの発現が有意に減少し、Praja-1がセロトニントランスポーターの代謝に関わることを明らかにした。

3-2. 薬理的うつ病モデル動物におけるセロトニントランスポーターの代謝機構への影響:ストレス負荷時におけるユビキチン化によるセロトニントランスポーターの変化

3週齢のC57BL/6J系雄性マウスに攻撃性を示すICR系雄性マウスに10分間接触させ、

社会敗北ストレス負荷を行った。ストレス負荷24時間後において、ストレス負荷されたマウスでは社会性行動試験の第2セッションにおいて、ボックス内に標的マウスが存在した状態では交流区域の滞在時間が有意に減少し、社会性行動の低下が認められた。ストレス24時間後において、ストレス負荷されたマウスの前頭皮質においてセロトニントランスポーターのユビキチン化量の低下が認められた。

3-3. うつ病患者から単離した株化リンパ球におけるセロトニントランスポーターのユビキチン化の変化: セロトニントランスポーターは中枢神経に限らず血小板およびリンパ球を含む白血球等からも検出され、そのセロニン再取り込み活性は脳との相関が認められる。そこで、うつ病患者の新鮮血液からリンパ球を単離し、株化によるリンパ球を含む白血球のメディウム中での培養によりユビキチン化セロトニントランスポーターの分析を行った。培養により血液内の抗うつ薬や身体の影響を解消した状態で、うつ病患者由来の株化リンパ球ではセロトニントランスポーターのユビキチン化が低下していること、プロテアソーム阻害剤により代謝を抑制してもセロトニントランスポーターの増加が認められないことが認められた。

3-4. 健常者における血小板中のセロトニントランスポーターのユビキチン化と気質との関連比較: 健常者から採血し、血小板を抽出し、セロトニントランスポーターのユビキチン化量を測定した。それと同時に健常者の性格を気質性格検査およびベック抑うつ尺度により評価を行った。セロトニントランスポーターのユビキチン化量とうつ病尺度であるベック抑うつ尺度とは関連性は認められなかったが、パーソナリティを評価する気質性格検査TCIではうつ病患者で気質に変化が認められる損害回避の中において男性においては予期概念、女性においては人見知りのスコアにおいてセロトニントランスポーターのユビキチン化と相関が得られた。

4. 考察 まとめ

以上の成果より、セロトニントランスポーターのユビキチン化にはPraj1が関わっていること、社会敗北ストレスによりセロトニントランスポーターのユビキチン化が低下すること、血小板由来のセロトニントランスポーターのユビキチン化はうつ病に関連した気質と相関が認められた。臨床・基礎研究のクロストークによりセロトニントランスポーターのユビキチン化による機能調節に注目したうつ病の診断マーカーの開発が期待できる。

5. 発表論文

1. Mouri A, Noda Y, Watanabe K, Nabeshima T. The roles of MAGE-D1 in the neuronal functions and pathology of the central nervous system. Rev Neurosci. 2013;24(1):61-70.
2. 毛利彰宏、鍋島俊隆 ユビキチン・プロテアソームとうつ病様行動——ユビキチン化セロトニントランスポーターを指標とした診断薬の開発 医学のあゆみ 244巻5号 2013年:485-489