

特集 気分障害の生物学的理解の最前線

うつ病の新たなメカニズム——エピジェネティクス——

森信 繁, 淵上 学, 山脇 洋輔, 山本 茂人, 倉田 明子, 山脇 成人

エピジェネティクスとは、塩基配列上の変化を伴わない機序での遺伝子転写の調節機構であり、ヒストン・アセチル化と DNA メチル化が代表的な機構である。うつ病の発症に密接に関連していると考えられている、ストレスによる脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現の減少に関して、筆者らは BDNF 遺伝子のプロモーター領域のヒストン・アセチル化の減少が関連していることを報告している。筆者らのグループ以外にも、ストレスや抗うつ薬が BDNF 遺伝子プロモーター領域のヒストン・アセチル化を変動させて、BDNF 発現を調整していることを示している報告もある。また多様な遺伝子発現を亢進させる作用のある、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬の一つである sodium butyrate (SB) を用いた研究から、SB は抗うつ効果を発揮する可能性があり、その脳内機序にトランスサイレチンの発現亢進が関与している可能性を報告した。このようなヒストン・アセチル化に関する研究結果は、うつ病の発症に關与する遺伝子発現の変動の、分子メカニズムを解明する意味でも、またこれまで開発されてきた抗うつ薬とは異なった作用機序をもつ、新たな抗うつ薬の開発を目指す意味からも、今後の HDAC 阻害薬を用いた行動学的・分子生物学的研究は必要であると思われる。

〈索引用語〉：エピジェネティクス、ヒストン・アセチル化、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、トランスサイレチン〉

I. エピジェネティクスとは

これまでの膨大なうつ病発症メカニズムに関する基礎的・臨床的研究の成果から、ストレスによる副腎皮質ホルモンの亢進や脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) などの変化が、うつ病発症の脳内メカニズムに密接に関連することが提唱されてきている¹⁻³⁾。うつ病の発症要因とされるストレス負荷による脳内遺伝子発現の変動の機序として、近年最も注目を集めているのが cAMP response element binding 蛋白 (CREB) など転写因子のストレスによる発現変化や活性化である²⁾。しかしながらその後の遺伝子転写の研究の進展から、転写因子の発現や活性化が亢進しても、ゲノム DNA への転写因子の特異的結合が阻害されていると、下流にある遺伝子の転写 (mRNA の発現) は亢進しない

ことが、エピジェネティクス分野の研究から明らかにされてきている⁵⁾。

なおエピジェネティクスという概念の意味するところは、DNA を構成する塩基の配列上の single nucleotide polymorphism (SNP) などの変化による遺伝子転写の調節ではなく、DNA メチル化のような塩基配列の変化とは無関係な塩基修飾によるクロマチン構造の変化を介した遺伝子転写の調節機構と要約されている。細胞内の核には DNA とヒストンと呼ばれる蛋白が、緻密に絡み合ってエピゲノムという複合体を構成しており、クロマチン構造の変化は転写因子の遺伝子のプロモーター領域への結合に大きく影響することがわかっている⁴⁾。クロマチン構造を変化させる機序としてこれまでに詳細な研究のなされている機構は、DNA メチル化とヒストンのアセチル化

の二つである⁵⁾。

DNA メチル化では DNA を構成する塩基の一つであるシトシンがメチル化されることにより、メチル化された部位に methyl CpG-binding protein2 (MeCP2) が結合し、transcriptional co-repressor SWI-independent 3A (Sin3A) と histone deacetylase (HDAC) が MeCP2 に結合する。その結果、クロマチン構造が密になり、転写因子のプロモーターへの結合が困難となり、遺伝子の転写の抑制される機構—DNA メチル化である⁵⁾。なおシトシンのメチル化は、DNA methyltransferase の活性化によって行われることはわかっているが、その逆の反応を司る酵素についての詳細はまだ未解明の状況である。

他方、ヒストン・アセチル化とはヒストン蛋白がアセチル化されることによって、クロマチンのヒストン蛋白を取り囲む構造が、物理的に変化してゆるく取り囲むことになり、その結果として遺伝子の転写が促進される現象である。逆にヒストンのアセチル化が減少することで、ヒストンを取り巻くクロマチン構造は緊密となり遺伝子の転写は抑制されることになる⁴⁾。ヒストンのアセチル化は histone acetyltransferase (HAT) という酵素が担っており、その逆の反応である脱アセチル化は histone deacetylase (HDAC) という酵素が司っている。このようなクロマチン構造を調節する機構は双方向的であり、メチル化およびアセチル化は定常状態ではホメオスタシスを保っていると考えられている。その上で何らかの刺激が細胞や組織に与えられた際には、細胞あるいは個体としての可塑的变化をもたらす形で上記のようなエピジェネティックな変化が導かれると考えられている。

II. エピジェネティクスからみたうつ病の病態

大うつ病や双極性障害の病態には、BDNF など複数の遺伝子の脳内での発現の変化することが、密接に関与すると考えられている。特に大うつ病の発症にはストレスの前駆することが多く、ストレス負荷によって脳内の多様な遺伝子の発現が変

化することは、多くの動物実験からよく知られた事実である。このようなストレスによる遺伝子発現の変動に、ヒストン・アセチル化などのエピジェネティック機構が関与していることは、容易に考えられる。またうつ病の病状は自然寛解することもよく知られており、海外での治験の結果でもプラセボにて寛解する症例も稀ではないことが報告されている。このような臨床経過は、うつ病という疾患のストレスに対する可塑性を示しており、この機序にヒストン・アセチル化や DNA メチル化といったエピジェネティックな変化が関与している可能性が提唱されている。この他、双極性障害の治療薬として使用されているバルプロ酸は、HDAC 阻害薬の一つであり、ヒストン・アセチル化を亢進させることが知られている。

直接的なエピジェネティック機構とうつ病との関連を示す研究としては、BDNF 遺伝子に関する動物実験の成果がある。大脳皮質前頭部や海馬での BDNF 発現の低下は、神経細胞の樹状突起スパインの形成を阻害してシナプス接続性の減少などを導き、うつ病の病態を形成することが提唱されている³⁾。このような BDNF 発現の低下に、次章にて紹介するストレス研究の成果はヒストン・アセチル化の低下の関与というエピジェネティックなメカニズムの可能性を報告している。一方、抗うつ薬や電気けいれん治療によって、脳内の BDNF 発現低下の修復されることが報告され、うつ病の治癒過程にも BDNF 発現が密接に関与していると推論されている^{9,10)}。この治癒過程に関する BDNF 発現亢進も、ラットを用いた抗うつ薬や電気けいれん処置の実験から、ヒストン・アセチル化の亢進を介した現象である可能性が示唆されている。

III. ストレスによる BDNF 遺伝子プロモーター上のヒストン・アセチル化の変動

BDNF mRNA 発現の減少は、拘束ストレス・社会敗北性ストレスなどのうつ病モデルで報告され、ストレスが関与するうつ病発症の重要なメカニズムと考えられている。その一方で、遺伝子転

写調節機構の解明から、転写因子や細胞応答以外に、プロモーター領域のクロマチン構造の変化が、転写機能に重要であることもわかってきた。このため筆者らは、ストレスによる海馬 BDNF mRNA および蛋白の発現変動の機序を解明する目的で、ラットに対して急性拘束ストレスを負荷し、mRNA 発現量、蛋白発現量の検討に加えて、BDNF 遺伝子プロモーター上のヒストン・アセチル化の解析を経時的に行った⁴⁾。また、ストレス反応の中心的役割を担うことが知られている血清コルチコステロンの変化も併せて計測した。

実験には 9 週齢雄性ラットに 2 時間の単回拘束ストレス負荷 (Single Immobilization Stress; SIS) を行い、直後および拘束開始後 4 時間 (SIS-4h)、24 時間 (SIS-24h) に海馬を取り出した。BDNF に関して total mRNA 発現量の検討、4 つのエクソン mRNA 発現量の検討、蛋白発現量の検討、各エクソンのプロモーター部位におけるヒストン・アセチル化の解析を real-time PCR 法およびクロマチン免疫沈降法、ELISA 法を用いて行った。各時点での血清コルチコステロン値は RIA 法にて測定した。

未処置ラット群に比して、SIS 群では血清コルチコステロン値の有意な亢進がみられ、同時に total BDNF mRNA, exon I, IV mRNA, プロモーター I, IV, VI 領域のヒストン H3 のアセチル化の有意な減少がみられた。なお各プロモーター領域のヒストン H4 のアセチル化には、有意な変化はみられなかった。拘束ストレス終了 2 時間後の SIS-4h 群では、BDNF 蛋白量の有意な減少がみられた。しかしながら拘束ストレス終了後 22 時間の SIS-24h 群では、未処置ラット群に比して、total BDNF mRNA, exon mRNA 発現に特に有意な差はみられなかった。

今回の単回拘束ストレスによる BDNF 遺伝子のエクソン mRNA の発現減少と、プロモーター領域のヒストン H3 のアセチル化の変化は概ね相関しており、BDNF mRNA および蛋白発現の減少に、特定のプロモーター領域のヒストン H3 アセチル化の減少の関与している可能性が示唆され

た。単回拘束ストレス負荷による BDNF mRNA 発現の減少やヒストン H3 のアセチル化の減少は、拘束ストレス終了後 22 時間の時点ではすでに回復していた。今回の拘束ストレス負荷による BDNF 発現の減少の機序に、コルチコステロンによる転写の制御機構の関与が考えられる。しかしながら、典型的な Glucocorticoid Response Element (GRE) はラットの BDNF 遺伝子プロモーター領域では明らかになっておらず、現時点ではコルチコステロンの直接的な作用を提唱するには根拠が不足している。またグルココルチコイドによる HDAC や HAT の活性の制御によるヒストン・アセチル化の減少も予想されるが、このメカニズムを立証するためには今後の研究が必要と思われる。

ストレスと BDNF 遺伝子のヒストンの修飾に関する研究は少ないが、慢性的な社会敗北性ストレスを用いた研究¹⁰⁾では、本研究の結果とは異なるエクソン mRNA の減少や、異なったプロモーター領域におけるヒストン H3 または H4 のアセチル化の変化が報告されている。このような先行研究と筆者らの研究の結果を合わせると、個体に対するストレスによる BDNF の発現変動の機序は、ストレスの種類によって異なり、その相異にはヒストン・アセチル化部位の違いに関係していることが示唆される。また、ヒストン・アセチル化の減少は 22 時間後には回復し、mRNA や蛋白の減少も回復していたことから、環境刺激による BDNF の発現調節に、ヒストンの可塑性が寄与していることも示唆された。クロマチン構造に変化をおよぼす主要な要因は、ヒストンの修飾に加えて、DNA メチル化や ATP 依存性クロマチン再構成因子もあり、今後様々なストレスによる遺伝子発現の変動の機序解明についてのエピジェネティクス研究が望まれる。

IV. HDAC 阻害薬投与による抗うつ効果の 脳内メカニズムの解析

これまでに行われてきた抗うつ薬の作用機序に関する研究から、抗うつ薬はノルアドレナリン・

セロトニン受容体の活性化を介して転写因子 CREB のリン酸化を導き、その結果脳内での BDNF などの遺伝子の発現の変化を導くことが、抗うつ効果と密接に関連していると考えられるようになってきている。先にも述べたようにヒストン・アセチル化の亢進は、遺伝子の転写を亢進させることから、HDAC 阻害薬の投与は抗うつ効果をもたらすことが考えられている。

これまでも HDAC 阻害薬である sodium butyrate (SB) を用いて抗うつ効果を解析した研究はあり、Schroeder ら⁸⁾ は SB 慢性投与によってマウスの尾懸垂テスト（強制水泳テストでは無効）で抗うつ効果が発揮されることや、フロキセチンと併用投与することで SB の抗うつ効果が増大することを報告している。これに対して Gundersen ら⁹⁾ は SB 慢性投与によって特に有意な抗うつ効果は発揮されないことを、強制水泳テストや novelty-induced hypophagia テストを用いて報告している。このような矛盾した結果は、SB の抗うつ効果に関してまだまだ実験が必要なことを意味していると考えられる。

そこで筆者らも SB 慢性投与をラットに行い、強制水泳テストなどでの行動評価にて、本剤の抗うつ効果を検証した。その上で SB 慢性投与によって有意に発現の亢進する遺伝子をマイクロアレイを用いて解析し、SB の抗うつ効果の作用機序の解析も行った。

実験には SB (1.2 g/kg) および対照群には生理食塩水 (Saline) を、単回・慢性 (1 日 1 回、7 日間) に Sprague-Dawley 雄性ラット (8 週齢) に投与した。抗うつ効果・抗不安効果・自発運動量への効果の評価は、強制水泳テスト (FST) ・高架式十字迷路 (EPM) ・オープンフィールドテスト (OFT) を用いて行った。その結果、SB 慢性投与 (単回では無効) によって FST にて有意な無動時間の減少をみた。なお SB 慢性投与では、特に OFT での自発行動量や EPM の open arm での滞在時間などに、有意な変化はみられなかった。行動実験での結果から、FST でみられた無動時間の減少は、運動量の増

大や不安行動の減少による影響ではなく、SB の抗うつ効果による現象と考えられた。

このため SB 慢性投与による抗うつ効果の作用機序を解析する目的で、Saline・SB 慢性投与群の海馬を対象に DNA マイクロアレイと real-time PCR 法を用いて、SB 慢性投与によって特異的に発現の亢進する遺伝子を探索した。その結果、SB 慢性および Saline 慢性投与群の海馬での DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の変化のスクリーニングから、Transthyretin (Ttr) の発現が顕著に SB 群で亢進していた。このため real-time PCR 法にて発現の差を検証した結果、Ttr 発現のみが有意に SB 群で亢進していることがわかった。この実験で見出された Ttr mRNA 発現機序を解析する目的にて、Ttr 遺伝子のプロモーター領域のヒストン・アセチル化の程度を、クロマチン免疫沈降法を用いて計測した。その結果、SB 慢性投与によって Ttr 遺伝子プロモーター領域の H4 ヒストンのアセチル化が亢進していることがわかった。今回の SB 慢性投与によって亢進の得られた Ttr の発現亢進が、抗うつ薬によってもみられる現象であるかを解析する目的で、イミプラミンの慢性投与を行い、海馬での Ttr mRNA 発現の変化を Saline 群と比較した。その結果、特に SB 群と Saline 群の間に有意な差はみられず、Ttr 発現の亢進は SB に特異的な作用と考えられた。

上述したように今回の行動実験の結果は、SB 慢性投与が抗うつ効果を発揮する可能性を示唆しており、その機序にはイミプラミンとは異なり、Ttr 遺伝子発現を亢進させることが関与していることが推測された。Ttr 発現亢進を介した抗うつ作用機序としては、中枢神経系での甲状腺ホルモンの輸送亢進や、retinoic acid の輸送亢進が考えられる。今回の研究結果は、ヒストン・アセチル化の亢進というエピジェネティックな機序を介した、新たな抗うつ作用の可能性を提唱する結果であると思われる。同時に本研究の結果は、Ttr 遺伝子発現の亢進が、新たな抗うつ薬の開発に寄与する可能性を示しており、難治性うつ病に対する

新規治療法の開発という点で興味深い実験結果であると思われる。

V. ま と め

エピジェネティック機構を一言でまとめると、塩基配列上の変化を伴わない機序での遺伝子発現の調節機構と称することができる。このようなエピジェネティックな機序での遺伝子発現の調節機構は、同じゲノム構造を持ちながらある細胞はニューロンに、別の細胞は肝細胞に分化するという表現型の違いをもたらすメカニズムとしても注目されている。精神科領域でのエピジェネティックな研究はまだ端緒についたばかりであり、現時点での成果に関しては、ストレスやうつ病治療法(抗うつ薬・電気けいれん処置)が、BDNF 遺伝子プロモーターのヒストン・アセチル化を変動させることによって、BDNF 発現を調節していることが報告されている程度である。今回の筆者らの HDAC 阻害薬の研究では、慢性投与によって抗うつ効果を示されたが、逆にこのような抗うつ効果を検出しなかった報告もある。これまで開発されてきた抗うつ薬とは異なった作用機序をもつ、新たな抗うつ薬の開発を目指す意味からも、今後の HDAC 阻害薬を用いた行動学的・分子生物学的研究は必要であると思われる。

文 献

- 1) Brunoni, A.R., Lopes, M., Fregni, F.: A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11; 1169-1180, 2008
- 2) Duman, R.S., Malberg, J., Thome, J.: Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*, 46; 1181-1191, 1999
- 3) Duman, R.S., Monteggia, L.M.: A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 59; 1116-1127, 2006
- 4) Fuchikami, M., Morinobu, S., Kurata, A., et al.: Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12; 73-82, 2008
- 5) Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E.: Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128; 635-638, 2007
- 6) Gundersen, B.B., Blendy, J.A.: Effects of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in models of depression and anxiety. *Neuropharmacol*, 57; 67-74, 2009
- 7) Moore, S.C., Ausio, J.: Major role of the histones H3-H4 in the folding of the chromatin fiber. *Biochem Biophys Res Comm*, 230; 136-139, 1997
- 8) Schroeder, F.A., Lin, C.L., Crusio, W.E., et al.: Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol Psychiatry*, 62; 55-64, 2007
- 9) Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., et al.: Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci*, 24; 5603-5610, 2004
- 10) Tsankova, N.M., Kumar, A., Nestler, E.J.: Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*, 9; 519-525, 2006

Epigenetic Mechanism of Depression

Shigeru MORINOBU, Manabu FUCHIKAMI, Yosuke YAMAWAKI, Shigeto YAMAMOTO,
Akiko KURATA, Shigeto YAMAWAKI

Department of Psychiatry and Neurosciences, Hiroshima University

Numerous epigenetic studies have revealed that the acetylated status of histone as well as methylated status of cytosine is closely involved in gene transcription. Preclinical and clinical studies demonstrate that changes in levels of various genes in the brain including BDNF, play a role in the pathophysiology of depression. It is well known that the levels of BDNF mRNA and protein in the rat brain, such as frontal cortex and hippocampus, was decreased in response to stress, but the precise mechanism of stress-induced downregulation of BDNF has yet to be characterized. In this context, we examined the influence of a single immobilization stress (SIS) on the levels of total BDNF mRNA with each exon mRNA by real-time PCR and acetylated histone at the promoters of the BDNF gene by chromatin immunoprecipitation assay in the rat hippocampus. SIS significantly decreased the levels of total BDNF mRNA with significant reduced levels of exon I and IV mRNA. Significant decreases in acetylated histone H3, but not H4, were found at the promoters of exons I, IV, and VI. On the other hand, antidepressant-like effects has been reported with sodium butyrate (SB), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, promoting gene transcription. We also found antidepressant-like effect of repeated administration of SB in the forced swim test using rats. In addition, we found that upregulation in transthyretin mRNA in the rat hippocampus is, at least in part, associated with this effect using DNA microarray and real-time PCR. Based on these findings, it is postulated that epigenetic regulation of the BDNF gene by stress and antidepressants may be involved in the pathophysiology of depression.

<Authors' abstract>

<**Key words**: epigenetics, histone acetylation, histone deacetylase inhibitor, brain-derived neurotrophic factor, transthyretin>