

氏 名 東 幹人

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 974 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Mood stabilizing drugs increase neural stem cells in the
adult brain by activating Notch signaling

論文審査委員 主 査 教授 岡村 康司
教授 池中 一裕
教授 井本 敬二
教授 岡野 栄之(慶応義塾大学)

博士論文内容の要旨

Mood stabilizing drugs increase neural stem cells in the adult brain by activating Notch signaling.

Bipolar disorder has an overall prevalence of approximately 1% among the general population and remains a chronic psychiatric illness carrying substantial health care costs. Mood stabilizing drugs, lithium, valproic acid and carbamazepine are commonly used to treat for stabilizing mood and managing acute depressive and manic symptoms within the bipolar disorder. However, the molecular mechanisms underlying the therapeutic action of these drugs and the disorder itself are largely unknown. In the present study, he demonstrated that lithium increased the number of dividing cells in the adult subventricular zone and dentate gyrus, which subsequently enhanced neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus. Furthermore, using the colony-forming neurosphere assay, he firstly demonstrated that all mood stabilizers enhance self-renewal capability of neural stem cells and expand stem cell pool in the adult brain, and revealed the molecular mechanism of mood stabilizing drugs.

First, he demonstrated that administration of lithium to adult mice for 3 weeks resulted in increased number of dividing cells in subventricular zone of lateral ventricles and the dentate gyrus of hippocampus using two methods, BrdU incorporatin and colonyforming neurosphere assay. Furthermore, neural stem cell derived from lithium, valproic acid or carbamazepine treated mice dramatically activated its self-renewal capability, whereas maintained its multipotentiality. These data indicated that all three mood stabilizers have the effects on expansion of the neural stem cell pool in the adult brain.

Next, using *in vitro* colony-forming neurosphere assay, he demonstrated that mood stabilizing drugs at therapeutically-relevant concentrations in the cerebrospinal fluid, enhanced the formation of primary neurosphere and the resultant primary neurospheres produced more secondary neurospheres, whereas high dose of mood stabilizers decreased the number of primary neurospheres and attenuated self-renewal capability of neural stem cells. These data indicated that mood stabilizing drugs at therapeutically-relevant concentrations in the cerebrospinal fluid have ability to directly enhance self-renewal capability of neural stem cells.

Final and most importantly, he clarified the molecular mechanism of mood stabilizers. Many biochemical pathways have been implicated in the therapeutic actions of mood stabilizing drugs, including crucial roles for glycogen synthase kinase-3 β inhibition or inositol depletion. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition, however, was not detected in neurospheres treated with therapeutic doses of mood stabilizers. Inositol depletion was not the cause of the enhanced self-renewal capability of neural stem cells either, because exogenously added *myo*-inositol did not revert the effects of mood stabilizers on neural stem cells. On the other hand, treatment with all three mood stabilizers activated Notch signaling in the neural stem cells at therapeutically-relevant concentrations in the cerebrospinal fluid. Notch signaling is known to play critical roles in the maintenance of neural stem cell pool in the adult brain. He provided evidence for Notch signaling activation in the neural stem cell by means of quantitative RT-PCR analysis of target gene expression in this signal pathway, immunoblotting for an

active form of Notch receptor and *in situ* hybridization analysis of *Hes1/5* expression; treatment with mood stabilizers increased an active form of Notch receptor and upregulated its target genes in neural stem/progenitor cells both *in vivo* and *in vitro*, whereas co-culture with γ -secretase inhibitor or the presence of mutation in the *presenilin1* gene canceled the effects of mood stabilizers. These findings suggest that a shared pharmacological effect of mood stabilizing drugs is to enhance neurogenesis in the adult brain by activating Notch signaling in neural stem cells. Moreover, our results may lead not only to the clarification of the pathogenesis of bipolar disorder that is a burden of the society, but also to the development of new strategy to treat bipolar disorder patients.

論文の審査結果の要旨

気分安定薬であるリチウム、VPA (valproic acid)、CBZ (carbamazepine)は躁鬱病の治療に良く使われる薬剤であるがその分子機構は十分に理解されていない。リチウムについてはこれまで2つの分子作用機構が示唆され、イノシトールリン脂質の枯渇説と、GSK (glycogen synthase kinase) - β の抑制による β カテニンの核移行の促進説が有力とされてきたが、これらの結果は臨床的に用いられる髄液中でのリチウムの有効濃度よりはるかに高い濃度を用いて得られたものであるため、実際の有効濃度における作用についてはまだ明らかにされていなかった。また最近、気分安定剤の作用として神経新生を起こすことが報告され、神経幹細胞がこれらの薬物の作用ターゲットである可能性がでてきた。本研究は、これらの気分安定薬がニューロン新生を促進する現象をBrdUラベルの手法により詳細に記載するとともに、その分子機構を解析し、従来言われてきた分子経路とは異なり、Notchシグナル伝達の活性化の関与を明らかにした。

本研究では、まず、気分安定薬が成獣マウスの終脳の脳室下帯と海馬歯状回での神経系前駆細胞の分裂増加を起こすことを明らかにした。次に、ニューロスフェア形成アッセイ法を定量的に行い、すべての気分安定薬が神経幹細胞の自己複製能を増加させ、成獣マウスの脳での幹細胞プールを大きく増加させることを証明した。また、海馬歯状回においてニューロン新生が増加することを見出した。更に、*in vitro*でのニューロスフェア形成の培養条件において、気分安定薬が臨床的に効果を出す髄液有効濃度において一次ニューロスフェア、二次ニューロスフェアの両方の形成効率を増加させることを見出した。最後に、これらの現象にどのような分子経路が関わるかを薬理的に検討し、GSK β を介する経路、イノシトールリン脂質の枯渇による経路は、臨床上有効濃度での気分安定薬によって影響を受けないことからこれらの経路が関わっていないことが示唆された。一方、活性化型Notch1タンパク質のイムノプロットと*in situ hybridization*法による*Hes1/5*の遺伝子発現の解析により、臨床上有効濃度での気分安定薬によってNotchシグナル伝達が活性化されることが示され、さらに γ セクレターゼの阻害薬の投与下や*presenilin1*遺伝子の変異マウスでは気分安定薬の作用が消失することを見出した。以上の結果は、気分安定薬の作用により、神経幹細胞においてNotchシグナル伝達経路が活性化され、その自己複製能が誘導されることを示唆する。この発見は躁鬱病の治療薬の作用について新たな分子機構の可能性を提示した画期的な内容と言える。これらは躁鬱病の病態の理解と合理的な治療法を確立する上で基礎生物学的な基礎を与えうる優れた研究と位置づけられ、審査委員会の委員全員一致で、論文は学位取得に十分値すると判断された。