

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04895

研究課題名(和文) 次世代型の分子・神経ネットワーク基盤解析によるうつ病の病態解明

研究課題名(英文) Molecular and neural mechanisms of depression

研究代表者

渡辺 義文 (WATANABE, Yoshifumi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授(特命)

研究者番号：90182964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：我が国におけるうつ病の発症機序に関する基礎研究は欧米諸国に比べて圧倒的に不足している。本研究では、「側坐核・海馬・内側前頭前野皮質における神経回路の変容に伴う遺伝子発現異常がうつ病の発症機序となる」との仮説をたて、この妥当性を分子・神経回路レベルで検討した。その結果、これら各脳領域においてストレス対処行動に関わる分子を同定し、その分子を標的とした化合物の抗うつ作用を見出した。また、特定の脳領域の神経活動操作により影響をうける脳部位を同定し、この神経ネットワークがうつ様行動の発現に重要であることを見出した。本研究により、特定の脳部位におけるうつ病態の分子神経基盤の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate molecular and neural mechanisms of depression. To this end, we used an animal model of depression and analyzed the levels of a variety of mRNA. We found altered expression of CaMKIIbeta and HDAC4 in the hippocampus and medial prefrontal cortex, respectively. Viral-mediated gene transfer experiment revealed that these two molecules are critically involved in depression-like behaviors. In addition, gain- and loss-of-function CaMKIIbeta and HDAC4 within the hippocampus and medial prefrontal cortex affect neural activity in the nucleus accumbens, suggesting that neural networks from the hippocampus and medial prefrontal cortex to the nucleus accumbens may be associated with depressed symptom. Indeed, we used DREADDs technology to selectively inactivate these neural networks and found an altered behavioral response to chronic stress in mice.

研究分野：精神医学

キーワード：ストレス うつ病 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

うつ病の発症機序として、ストレス適応機構の構成要素である神経可塑性の障害が想定されている。すなわち、「うつ病患者は素因的にストレスに対する脆弱性を有し、通常では適応可能なストレス負荷に耐えられずに神経可塑性異常を生じ、うつ状態に陥る」というストレス脆弱性仮説が想定されている (Nestler and Hyman, Nat Neurosci 2010)¹⁾。

神経可塑性には遺伝子発現調節が重要な役割を担っている。うつ病における抑うつ状態の慢性化や抗うつ薬による治療効果発現までには週単位の時間がかかることなどから、気分障害の病態には持続的かつ可逆的な遺伝子発現調節異常が関与すると推測される。従って、ヒストンアセチル化などの DNA の塩基配列に依存しないエピジェネティックな遺伝子発現調節が気分障害の病態を説明できる可能性が考えられている。実際、うつモデルマウスやうつ病患者死後脳・末梢白血球におけるエピジェネティクス制御因子の発現・機能異常が多数報告されている。

我々の先行研究から、側坐核・海馬・内側前頭前野皮質におけるエピジェネティックな遺伝子発現変化がうつ病態に深く関与していることが推測されている。うつ病患者におけるこれら脳部位の機能異常は示唆されているものの、それら3部位の神経回路変容とその分子基盤についてはいまだ不明である。

2. 研究の目的

我が国におけるうつ病の発症機序に関する基礎研究は欧米諸国に比べて圧倒的に不足している。我々の先行研究から、「側坐核・海馬・内側前頭前野皮質における神経回路の変容に伴うエピジェネティックな遺伝子発現異常がうつ病の発症機序となる」との仮説をたて、この妥当性を分子・神経回路レベルの双方向から検討する。本研究により、特定の脳部位におけるうつ病態の分子機構の解

明のみならず、分子レベルと神経回路レベルでの解析を融合させることで、うつ病研究の新展開が期待できる。我々の先行研究結果から、「側坐核・海馬・内側前頭前野皮質における神経回路の変容に伴うエピジェネティックな遺伝子発現異常がうつ病の発症機序となる」との仮説をたて、その妥当性を分子・神経回路レベルで検証する。

3. 研究の方法

(1) マウス

8週齢の雄性 BALB/c (BALB)マウスを使用した。餌と水は自由摂取させ、12時間の明暗周期下で飼育した。動物使用に伴い、本学における動物実験指針及び動物実験規則等の指針に示される基準に適合することを確認し、使用許可を得た(承認番号 27-010、27-011)。

(2) 慢性ストレス負荷

マウスに社会性敗北ストレス (SDS) を負荷した。テストマウスを攻撃性の高い CD1 マウスと5分間同居させ (肉体的ストレス)、その後一晩、ケージ内に仕切りを置き直接接触できないようにした (心理ストレス)。これを5日間あるいは10日間連続して行った。

(3) 行動評価

Forced swim test: マウスを 22-23 ℓ の水の入ったシリンダー内に入れ、5分間における無動時間と最初に無動を示すまでの時間 (latency) を測定した (Higuchi et al., 2016)²⁾。

Novelty-suppressed feeding test: 一晩絶食したテストマウスを 30cm 四方の箱の隅に置いた。この箱の中央にはエサが置いてあり、マウスがエサを食べるまでの時間 (latency) を測定した。Latency が長いほど不安行動が増加していると考えられている (Abe-Higuchi et al., 2016)³⁾。

Social interaction test: はじめて接触するマウスと5分間同一ケージにいれ、相手マウスとの接触時間を測定した。

(4) 遺伝子発現解析

マウスから各脳部位を取り出し、総 RNA を抽出した。逆転写 PCR 反応により cDNA を調整し、SYBR Green Master Mix を用いたリアルタイム PCR 法にて目的 mRNA 発現量を定量解析した⁴⁾。内在性コントロールには GAPDH mRNA を使用した。

(5) 統計解析

2 群間比較には unpaired t-test を、3 群以上の比較には On-way ANOVA あるいは two-way ANOVA を使用した。有意差が認められた場合には、Bonferroni correction あるいは Tukey's post-hoc test 分析を行った。p 値が 0.05 未満を有意と判定した。

4. 研究成果

うつモデルマウスを用いた遺伝子発現解析結果から、海馬における CaMKIIbeta mRNA 発現量と内側前頭前野における HDAC4 の発現変動を確認した。そこで、これら 2 つの分子とうつ病態との関連を調べた。CaMKIIbeta のノックダウンが可能な shRNA を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)および CaMKIIbeta を過剰発現させる AAV を海馬特異的に投与したマウスを用いて、うつ様行動 (social interaction test、Forced swim test) と不安行動 (Novelty-suppressed feeding test) を評価した。その結果、CaMKIIbeta の機能低下によりうつ様行動は増加し、CaMKIIbeta の機能亢進によってうつ様行動は減少した。また、HDAC4 をノックダウンさせることが可能な shRNA を発現する AAV および HDAC4 を過剰発現する AAV を内側前頭前野皮質特異的に投与したマウスを用いて、上記同様、うつ様行動と不安行動を評価した。その結果、HDAC4 の機能亢進によりうつ様行動は増加し、HDAC4 の機能低下によってうつ様行動は減少した。

次に、ストレスによる CaMKIIbeta 発現低下の原因をエピジェネティクスの観点から検討した。その結果、ストレス負荷は海馬における CaMKIIbeta 遺伝子上の DNA メチル化

(5-hydroxymethylation) を低下させること、ならびにその原因として DNA 脱メチル化酵素 TET の発現・機能異常によるものであることを突き止めた。

また、HDAC4 の標的遺伝子の同定を試みた。非リン酸化型 HDAC 4 過剰発現マウスを用いてうつ病と関連する遺伝子群の発現をリアルタイム PCR 法により検討したところ、GDNF 遺伝子の有意な発現低下を認め、また、クロマチン免疫沈降法により HDAC4 は GDNF 遺伝子上にリクルートされていることを確認した。

神経基盤解析として、神経細胞を活性化させる hm3Dq あるいは抑制させる KORD を内側前頭前野に過剰発現させたマウスを作製した。これらマウスに人工受容体を刺激する薬剤を投与し、内側前頭前野で薬剤誘導的に神経活動を活性化・あるいは不活性化させた。これらマウスのストレス対処行動を評価した結果、内側前頭前野皮質 側坐核ネットワークを活性化したマウスはストレスレジリエンスを獲得していた。

内側前頭前野皮質と海馬における神経活動の変容に伴い、それらの投射先である側坐核において、エピジェネティックな変化が認められるかについて検討を行った。その結果、ストレス負荷後のマウス側坐核におけるヒストンアセチル化レベルやヒストンメチル化レベル、神経活動マーカー発現の変化を見出した。

以上の結果から、海馬と内側前頭前野において、うつ様行動に関わる分子の同定に成功した。さらに、これら分子の発現・機能を変化させたところ、その投射先の 1 つである側坐核における神経活動変容とエピジェネティクス変化を抽出できた。本研究により、うつ病態に関わる神経ネットワークとその基盤となる分子を同定した。これは、うつ病の新たな治療法につながる可能性がある。

<引用文献>

- 1) Nestler and Hyman: Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13:1161-1169, 2010
- 2) Higuchi F, Uchida S, Yamagata H, Abe-Higuchi N, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Shintaku T, Itoh Y, Suzuki T, Watanabe Y: Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. *The Journal of Neuroscience* 36(27): 7253-7267, 2016.
- 3) Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H, Higuchi F, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Watanabe Y: Hippocampal Sirtuin 1 Signaling Mediates Depression-like Behavior. *Biological Psychiatry* 80(11): 815-826, 2016.
- 4) Martel G, Uchida S, Hevi C, Chévere-Torres I, Fuentes I, Park YJ, Hafeez H, Yamagata H, Watanabe Y, Shumyatsky GP: Genetic demonstration of a role for statmin in adult hippocampal neurogenesis, spinogenesis, and NMDA receptor-dependent memory. *The Journal of Neuroscience* 36(4): 1185-1202, 2016.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計14件)

Uchida S, Shumyatsky GP. Epigenetic regulation of Fgf1 transcription by CRTC1 and memory enhancement. *Brain Res Bull* 2018 (in press). 査読有. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.02.016.

Uchida S, Yamagata H, Seki T, Watanabe Y. Epigenetic mechanisms of major depression: Targeting neuronal plasticity. *Psychiatry Clin Neurosci* 72: 212-227, 2018. 査読有. doi: 10.1111/pcn.12621.

Uchida S, Shumyatsky GP. Synaptically localized transcriptional regulators in memory formation. *Neuroscience* 370:4-13, 2018. 査読有.

doi:10.1016/j.neuroscience.2017.07.023.

内田周作: 非コードRNAによる脳機能制御とその破綻による精神疾患. *精神神経学雑誌* (印刷中). 2018. 査読無

内田周作: うつ病・不安障害におけるサーチインの役割と創薬への可能性. *日本生物学的精神医学会誌* (印刷中). 2018. 査読無

Yamagata H, Uchida S, Matsuo K, Harada K, Kobayashi A, Nakashima M, Higuchi F, Watanuki T, Matsubara T, Watanabe Y. Altered plasma protein glycosylation in a mouse model of depression and in patients with major depression. *Journal of Affective Disorders* 233:79-85, 2017. 査読有.

doi: 10.1016/j.jad.2017.08.057.

Yamagata H, Uchida S, Matsuo K, Harada K, Kobayashi A, Nakashima M, Nakano M, Otsuki K, Abe-Higuchi N, Higuchi F, Watanuki T, Matsubara T, Miyata S, Fukuda M, Mikuni M, Watanabe Y. Identification of commonly altered genes between in major depressive disorder and a mouse model of depression. *Scientific Reports* 8;7(1):3044, 2017. 査読有.

doi: 10.1038/s41598-017-03291-x.

Uchida S, Teubner BJW, Hevi C, Hara K, Kobayashi A, Dave RM, Shintaku T., Jaikhan P, Yamagata H, Suzuki T, Watanabe Y, Zakharenko SS, Shumyatsky GP. CRTC1 Nuclear Translocation Following Learning Modulates Memory Strength via Exchange of Chromatin Remodeling Complexes on the Fgf1 Gene.

Cell Reports 18(2):352-366, 2017. 査読有. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.052.

内田周作: ストレスに強い脳をつくる運動トレーニングの制御機構. 体育の科学 vol 67 (5): 315-319, 2017 杏林書院. 査読無.

<https://ci.nii.ac.jp/naid/40021181009>

内田周作: 注目の遺伝子「Sirtuin 1 遺伝子」. 分子精神医学 vol 17(3): 63-65, 2017 先端医学社. 査読無.

<https://ci.nii.ac.jp/nrid/9000362196690>

内田周作、渡邊義文: うつ病におけるヒストン脱アセチル化酵素の役割と新たな治療薬創出の試み. 精神医学 vol. 59, no. 11: 1045-1054, 2017 医学書院. 査読有.

<https://doi.org/10.11477/mf.1405205488>

Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H, Higuchi F, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Watanabe Y: Hippocampal Sirtuin 1 Signaling Mediates Depression-like Behavior. *Biological Psychiatry* 80(11): 815-826, 2016. 査読有.

doi: 10.1016/j.biopsych.2016.01.009.

Higuchi F, Uchida S, Yamagata H, Abe-Higuchi N, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Shintaku T, Itoh Y, Suzuki T, Watanabe Y: Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. *The Journal of Neuroscience* 36(27): 7253-7267, 2016. 査読有.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0319-16.2016.

Martel G, Uchida S, Hevi C, Chévere-Torres I, Fuentes I, Park YJ, Hafeez H, Yamagata H, Watanabe Y, Shumyatsky GP: Genetic demonstration of a role for stathmin in adult hippocampal neurogenesis, spinogenesis, and NMDA receptor-dependent memory. *The Journal of Neuroscience* 36(4): 1185-1202, 2016. 査読有.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.4541-14.2016.

〔学会発表〕(計 8 件)

内田周作. うつ病・不安障害におけるサーチュインの役割と創薬への可能性. 第 39 回日本生物学的精神医学会 第 47 回日本神経精神薬理合同年会. 2017 年

内田周作. 非コード RNA による脳機能制御とその破綻による精神疾患. 第 113 回日本精神神経学会. 2017 年

關友恵、内田周作. Altered expression of long noncoding RNAs in patients with major depression. 北米神経科学会. 2017 年

内田周作. MicroRNA profiling of the ventral hippocampus in stress-resilient and stress-susceptible mice. 北米神経科学会. 2017 年

内田周作. ストレス適応破綻からみたうつ病態における神経可塑性異常とその分子基盤. 第 38 回日本生物学的精神医学会 第 59 回日本神経化学会大会合同年会. 2016 年

内田周作. Genetic activation of stathmin impairs adult hippocampal neurogenesis, spinogenesis, and NMDA receptor-dependent memory. 北米神経科学会. 2015 年

内田周作. エピジェネティクスによるうつ病の分子・細胞基盤. 生物学的精神医学会. 2015 年

内田周作. レジリエンスの視点からうつ病の発症・回復の分子メカニズムを理解する. 生物学的精神医学会. 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 義文 (WATANABE, Yoshifumi)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90182964

(2) 研究分担者

内田 周作 (UCHIDA, Shusaku)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10403669

山形 弘隆 (YAMAGATA, Hirotaka)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10549934

樋口 文宏 (HIGUCHI, Fumihito)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60711249