

令和元年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07090

研究課題名(和文)ヘテロクロマチン因子HP1欠損による精神疾患モデルマウスの確立と原因の解明

研究課題名(英文) Establishment of new mental disease model mouse by heterochromatin factor HP1 deficiency

研究代表者

吉原 亨 (Yoshihara, Toru)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00401935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティックな制御機構が破綻することによって、自閉症、双極性障害、うつ等の様々な精神疾患の発症につながるものが広く知られてきている。本研究ではこれまで報告の少ないヒストン修飾因子の一つである、ヘテロクロマチンプロテイン1(HP1)に着目し、HP1欠損マウスを新たな精神疾患モデルマウスとして確立し、エピジェネティック制御機構と病因との関連を解明しようと試みた。網羅的行動解析からは、このマウスが不安・うつ様の症状を持つこと、抗不安薬や抗うつ薬ではなく、ドーパミン神経系に関わる薬物が不安・うつ様の行動を改善することを行動薬理的解析から見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患を生じる危険因子として、遺伝子発現のエピジェネティック制御機構の破綻に注目が寄せられている。本研究ではヘテロクロマチンプロテイン1(HP1)と呼ばれる遺伝子に着目して、この遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスの新たな精神疾患モデルマウスとしての妥当性と、このマウスを用いることで精神疾患の病因理解に新たな切り口をもたらすことを目的とした。その結果、この遺伝子欠損マウスは不安・うつ様の行動を持つこと、その行動障害はドーパミン神経系に作用する薬物によりコントロールマウスのレベルまで改善されることを見出すことができ、ドーパミン神経系障害に基づく精神疾患モデルになり得ることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Recently, failure of epigenetic regulatory mechanisms causes various mental disorders such as autism, bipolar disorder and depression. In this study, we focused on heterochromatin protein 1 (HP1), one of the histone modification factors. We tried to establish an HP1-deficient mouse as a new mental disorder model mouse and also applied to this gene deficient mouse to understand the relationships between epigenetic regulatory mechanism and pathogenesis. Based on the phenotypes related by comprehensive behavioral analysis, we found that this mouse has anxiety and depression-like behavioral traits. These behavioral traits were improved to almost the same level of control mice by drugs related to the dopaminergic nervous system, but not anti-anxiety drugs and antidepressants. Biochemical analysis also showed that the contents of monoaminergic neural transmitters, genes related to neural transmission system, exocytosis were not changed.

研究分野：行動神経科学

キーワード：マウス 精神疾患モデル 行動解析 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとは、塩基配列の変化を伴わない機序での遺伝子発現の制御機構を示す。具体的には、DNA のメチル化やヒストン修飾によって、染色体の構造や核内配置が変化して、転写因子や転写抑制因子の DNA への結合能が変化することによって、遺伝子発現が制御されている。近年、この制御機構の破綻が精神疾患や発達障害などの精神病態の発症において重要なリスクファクターとして注目され始めている。

広く知られるエピジェネティック制御機構は DNA メチル化とヒストン修飾である。本申請で扱う HP1 はヒストン修飾を認識する分子である。一般的にヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) および 27 番目のリジン (H3K27) のメチル化は、染色体が凝集したヘテロクロマチン構造を作ることを助け、転写因子の DNA への結合を妨げることで転写抑制、すなわち遺伝子発現の低下を引き起こすと考えられている。様々なヒストン修飾因子が知られているが、安定的に染色体を凝集させるためにはメチル化 H3K9 を認識して結合する HP1 が必須であることが示唆されている (Jacobs et al., 2001)。

ヒト死後脳を用いた解析では、統合失調症やうつ病患者脳において DNA メチル化異常が報告されているが (Mill et al., 2011)、健常者とのメチル化程度の差異はわずか数パーセントに過ぎず、実際の臨床症状に直接的に結びついているか否かは未だ明確な報告がない。これに加えて、DNA メチル化は遺伝的要因によるものばかりでなく、環境要因による影響も大きく (Iwamoto, et al., 2011)、ヒト試料を用いた解析には限界があると考えられる。他方、エピジェネティック制御機構の破綻による精神疾患モデルマウスがいくつか報告されている。メチル化 CpG 結合タンパク (MeCP2) 変異マウスがレット症候群様の発達障害を持つこと (Luikenhuis et al., 2004)、グルコルチコイドレセプターのプロモーター領域のメチル化は、ストレス反応系の機能障害や不安・うつ様の行動特性を呈すること (Weaver, et al., 2004) など、やはり DNA メチル化に注目した研究が多く、ヒストン修飾、特にヘテロクロマチン化機構の異常による精神疾患動物モデルの報告は極めて少ないのが現状であった。本研究ではヘテロクロマチン化に重要な役割を果たすと考えられているヘテロクロマチンプロテイン 1 (HP1) γ に注目し、その遺伝子改変マウスを対象として行動学薬理的、組織学的、生化学的解析を行うこととした。

2. 研究の目的

この申請以前に、我々は全身で HP1 γ を欠損したマウスを作成したが、このマウスは出生後致死であったため、本申請では Nestin 依存的に Cre 組換え酵素を発現するマウスと HP1 γ flox マウスとの交配により、神経系特異的 HP1 γ 欠損マウス (HP1 γ cKO マウス) を用いることとした。すでに cKO マウスを対象としてテストバッテリー方式の行動解析を行い、1) 新奇場面での低活動性 (図 1)、2) 強制水泳場面での無動時間の増

大など、一般的に不安・うつ様とされる行動特性を持つことを確認したことから、本申請ではこれらの行動特性の物質的基盤を探索することを大きな目的とし、以下のような目的を設定した。

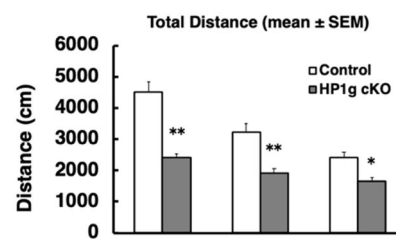


図 1 オープンフィールドテストにおける低活動性。cKO マウスの移動活動量はテスト 3 日間を通じて、コントロールマウスより常に低下していた。

1) HP1 γ cKO マウスの行動薬理的解析

ヒトの不安・うつを改善する薬物として用いられるベンゾジアゼピン系薬物（ジアゼパム）、セロトニン系薬物（SSRI:フルオキセチン）、活動性に関わる神経伝達物質であるドーパミン神経系に作用する薬物（メタンフェタミン、D1 レセプターアゴニスト）を投与することで、cKO マウスの行動変容を検討して、cKO マウスの低活動性に関わる神経伝達物質の同定をこころみる。

2) 脳領域における神経伝達物質関連遺伝子の mRNA 発現量の解析

大脳皮質、線条体、海馬等、精神疾患と深く関与する脳領域において、神経伝達物質制御に関わる、レセプター、トランスポーター、合成酵素、分解酵素などをコードする遺伝子について、mRNA の発現解析を行い、それらの変動を検討する。

3) 神経伝達物質の開口分泌に関わる遺伝子の mRNA 発現量の解析

既に、cKO マウス脳内のセロトニン、ドーパミン、アドレナリン、ノルアドレナリンアンドのモノアミンについては、含有量そのものは変化していないことを高速液体クロマトグラフィーで確認していたため、本申請では、それら伝達物質のシナプス間隙への放出に関わる遺伝子について、mRNA の発現解析を行う。

4) マイクロアレイによる mRNA 発現解析

これまで精神疾患との関わりが明確ではない遺伝子の発現に関して、HP1 γ が発現制御している可能性も考えられるため、大脳皮質、線条体、海馬における mRNA の発現変動をマイクロアレイにより解析し、低活動性を説明し得る遺伝子の発現変動を検討する。

5) 脳組織の組織学的解析

精神疾患の誘発には神経伝達物質を始めとした伝達系だけではなく、シナプスや軸索の形態的障害、あるいは神経細胞の未熟性などが深く関与することが知られている。cKO マウスの脳組織を用いてこれらについて、組織学的に解析を行う。

3. 研究の方法

1) HP1 γ cKO マウスの行動薬理的解析

薬物投与下におけるマウスの自発活動量をオープンフィールドボックス（WxDxH: 60 x 60 x 40 cm）で測定した。10 分間の活動パターンを Time OFCR1 for Open field test（小原医科産業製）で解析した。用いた薬物は以下である。フルオキセチン：10, 20mg/kg, ジアゼパム：0.5, 1.0mg/kg, メタンフェタミン：0.5, 1.0, 2.0mg/kg, SKF38393：10mg/kg。フルオキセチンは 2 週間の慢性投与、その他の薬物はいずれもテスト開始 30 分前に腹腔内投与された。

2) 脳領域における神経伝達物質関連遺伝子の mRNA 発現量の定量的 RT-PCR による解析

3) 神経伝達物質の開口分泌に関わる遺伝子の mRNA 発現量の定量的 RT-PCR による解析

4) マイクロアレイによる mRNA 発現解析

mRNA 採取に関しては、十分量の三種混合麻酔を腹腔内投与して、新鮮脳試料を採取した後、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit（QIAGEN）を用いた。脳領域は 10 の領域に分割した後、各々から抽出した mRNA をもとに逆転写反応で cDNA を合成し、Thermal Cycler Dice Real Time System（TAKARA）を用いて定量的 RT-PCR（qRT-PCR）を行った。また、マイクロアレイによる mRNA の発現解析には SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8x60K（Agilent）を用いた。

5) 脳組織の組織学的解析

十分量の三種混合麻酔を腹腔内投与した後に、パラフォルムアルデヒドを用いて灌流・固

定を行い、脳切片作製用の試料を採取した。検討項目としては脳領域の活動を調べるために抗 c-fos 抗体を用いた免疫染色、軸索、樹上突起、スパインの観察のために Golgi 染色を実施した。

4. 研究成果

1) 行動薬理的解析

フルオキセチンもしくはジアゼパム投与下における自発活動量

コントロールマウス、cKO マウスいずれもフルオキセチンもしくはジアゼパム投与によって活動量の上昇は認められなかった。

メタンフェタミンによる過活動性の誘発

コントロールマウス、cKO マウスいずれもメタンフェタミン投与によって用量依存的な活動量の上昇が見られた。2.0 mg/kg 投与下では、コントロールマウスと cKO マウスはほぼ同じ移動活動量を示した(図2)。

SKF38393 投与下における自発活動量

コントロールマウス、cKO マウスいずれも SKF38393 投与によって活動量の変化は認められなかった。

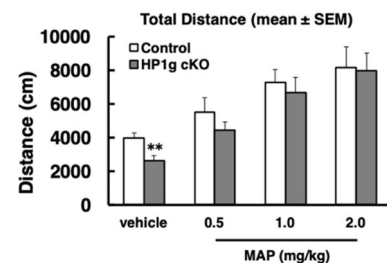


図2 メタンフェタミン(MAP)投与下における自発活動量。cKO マウスでは2.0mg/kg 投与下で、コントロールマウスと同程度の活動増加が見られた。

2) 脳領域における神経伝達物質関連遺伝子の mRNA 発現量の解析

3) 神経伝達物質の開口分泌に関わる遺伝子の mRNA 発現量の解析

各脳領域でドーパミン神経系に関わる遺伝子、D1、D2 レセプター、DAT、MaoB、Comt の mRNA 発現を qRT-PCR により解析したが有意な差は認められなかった。また、大脳皮質、線条体、海馬、中脳における開口分泌関連遺伝子の mRNA 発現を qRT-PCR により解析したが、各遺伝子の mRNA 発現量に有意差はなかった。

4) マイクロアレイによる mRNA 発現解析

大脳皮質、線条体、海馬を含んだ脳領域における mRNA 発現量を、マイクロアレイによって網羅的に測定した。Fold change ratio が 2.0 以上かつ有意差 ($p < 0.05$) のある発現変動を示した遺伝子が 10 個あったが、いずれも non-codingRNA や、機能未知の遺伝子であった(図3)。

Annotation	
GenbankAccession	GeneSymbol
XR_880699	7530428D23Rik
AK008862	2210408O09Rik
NM_013777	Akr1c12
XR_876355	Gm41518
AK140131	Gm7967
XR_864362	LOC105243544
NM_145078	2610305D13Rik
NR_045336	Gm10635
XM_011243939	3110053B16Rik

図3 マイクロアレイ解析により見出されたFC 2.0以上の遺伝子。

5) 脳組織の組織学的解析

各脳領域における c-fos 発現に、遺伝子型による顕著な差は見られなかった。また Golgi 染色においても、軸索、樹上突起、スパインの形態には顕著な差は見られなかった。

6) 研究成果の総括

行動薬理的解析からは、cKO マウスの低活動性は抗うつ薬・抗不安薬によって改善されなかったが、メタンフェタミンによる用量依存的な活動量の上昇がコントロールマウスよりも大きく認められ、2.0 mg/kg を投与した時に活動量がコントロールマウスと同じ水準に達した。メタンフェタミン処置に対して高い感受性を示したことから、cKO マウスは脳内における、特にモノアミン系を中心とした神経伝達系のバランスが乱れている可能性が示唆された。しかしながら、神経伝達物質の開口分泌機構に関わる遺伝子発現に変動はなく、HP1 がこれら

の機構にどのように関与しているのかは明らかにすることができなかった。他方、マイクロアレイ解析からは数種類の ncRNA の顕著な発現上昇を認めた。cKO のもつ行動障害の分子基盤を特定するにはいたらなかったが、ncRNA の増加という新しい知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

吉原 亨, 堀家康太, 成瀬智恵, 浅野雅秀「脳特異的ヘテロクロマチンプロテイン (HP) 1 欠損マウスにおける行動障害」第 64 回日本実験動物学会総会, ポスター発表, 2017 年 5 月, 郡山

堀家康太, 吉原 亨, 成瀬智恵, 古関明彦, 浅野雅秀「脳特異的ヘテロクロマチンプロテイン欠損マウスにおける行動障害の解析」第 40 回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2017 年 12 月, 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：浅野雅秀

ローマ字氏名：Masahide Asano

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 50251450

研究分担者氏名：成瀬智恵

ローマ字氏名：Chie Naruse

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30372486