

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19774

研究課題名(和文)光遺伝学を用いたうつ病グリアモデルの検討

研究課題名(英文) Increase glial glutamate release cause to depression in rat model

研究代表者

蛭原 功介 (ebihara, kosuke)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20510720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：課題期間中に有意な結果を得られなかった。研究概要に関しては第39回日本生物学的精神医学学会で口頭発表を行い、遺伝薬理学などの他の実験介入法を用いるべきなどの助言をいただいた。今回の研究では前頭葉のグリア細胞を標的としたが、前頭葉のグルタミン細胞は基底核にまで投射している。投射部位におけるグリア細胞への介入が必要と考えられた。今後は他の研究資金も活用し方法論の見直しや脳部位の検討を行い、同課題の研究を発展させていく方針である。

研究成果の概要(英文)：I had negative results in this plan of experiment. I tried to discuss about some problem in this work. Maybe it is wrong potion in rat brain or method. Glutamine nerves are rich in prefrontal cortex. so aiming the point. but Glutamate receptor are beyond nerve endings, amygdala, including limbic system. Probably, Optogenetically stimulating amygdala increase glutamate and cause to beanhedonia in rat model.

研究分野：精神生理

キーワード：グリア

## 1. 研究開始当初の背景

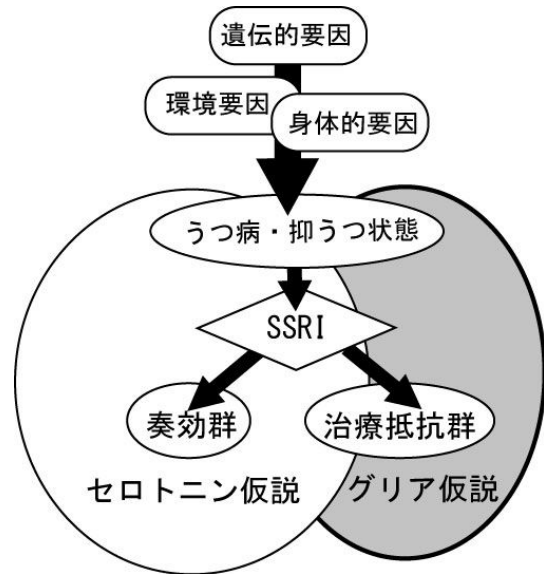
うつ病は本邦においても生涯有病率が6.5%と高く、薬物療法ではセロトニン仮説に基づいた治療が第一選択とされるが、奏効率は6割程度といった報告が多い。うつ病は原因も治療反応性も多様であるにも関わらず、臨床現場ではセロトニン仮説が拡大解釈され、適応のあいまいな処方も散見される。セロトニン仮説以外の仮説についての研究が乏しいために起こる弊害と考えられる。近年うつ病の成因にグリア細胞が関与するといった仮説(グリア仮説)が提唱されるようになったが、うつ病の責任病巣として考えられている前頭葉領域を対象とした研究の報告はまだない。

## 2. 研究の目的

当該研究では、前頭葉のグリア細胞に着目し、光遺伝学的手法をラットに適用し、グリア細胞を活性化させたときの頭蓋内自己刺激 (Intracranial self-stimulation : ICSS) 行動の変化を観察することで、セロトニン神経を操作すること無く、うつ病の主要症状の一つである快感消失 (anhedonia) を再現し、グリア仮説に基づく実験動物モデルを作成することを目的とする。

グリア細胞は神経膠細胞とも呼ばれ、アストロサイト・オリゴデンドロサイト・ミクログリアなどから構成される。ヒトの脳では多くがアストロサイトとして存在している。脳細胞の9割を占めるグリア細胞は神経伝達には関わらない支持組織と長らく理解されていた。しかし、最近の知見では神経成長因子・神経栄養因子の生産・貯蔵、イオンや神経伝達物質であるグルタミン酸の取り込みなど多様な機能を持つことが明らかとなり、精神疾患の生物学的研究の領域でもグリア細胞に関して報告が増えている。

うつ病においては、脳画像研究や死後脳研究で前頭前野や前部帯状回といった特定の領域で神経細胞よりもグリア細胞の密度や



大きさが有意に減少していると報告 (Ikeda K. 2005) されている。抗うつ薬の一つであるセルトラリンの投与や電気刺激によってラットの前頭葉領域で神経成長因子が増加したという報告 (Nibuya M.ら 1995) ラット脳のアストロサイト培養細胞で抗うつ薬の一つであるアミトリプチンを投与することにより神経成長因子が増加したという報告 (Takebayashi M.ら 2015) などがある。これらの報告からも、うつ病の病態に前頭葉領域のグリア細胞が関わる可能性や、抗うつ薬や電気けいれん療法の効果の一部には前頭葉のグリア細胞を介した作用もあることが想定されるようになった。

臨床の面では、うつ病自体が単一の原因で起こる病態ではなく、さまざまな要因から同様の抑うつ状態を発症する症候群としてとらえられるようになった。中でも老年期発症のうつ病や外傷後の器質性うつ病に対する選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の治療効果は乏しく、病因によって治療効果が異なることも広く知られるようになった。

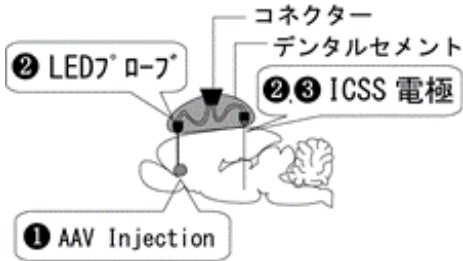
しかしながら、うつ病の原因も治療反応性も多様とする一方で、成因についてはセロトニン仮説についてのみ語られることが多く、セロトニン仮説以外のうつ病モデルを実験で検証している例は極めて少ない。

### 3. 研究の方法

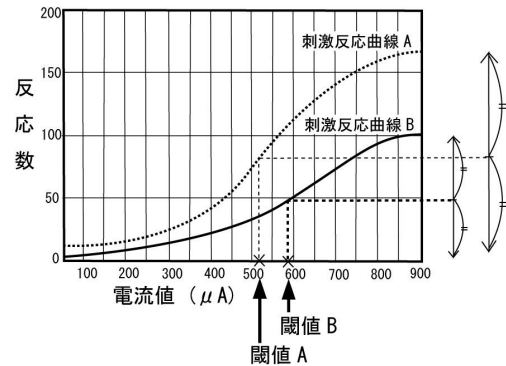
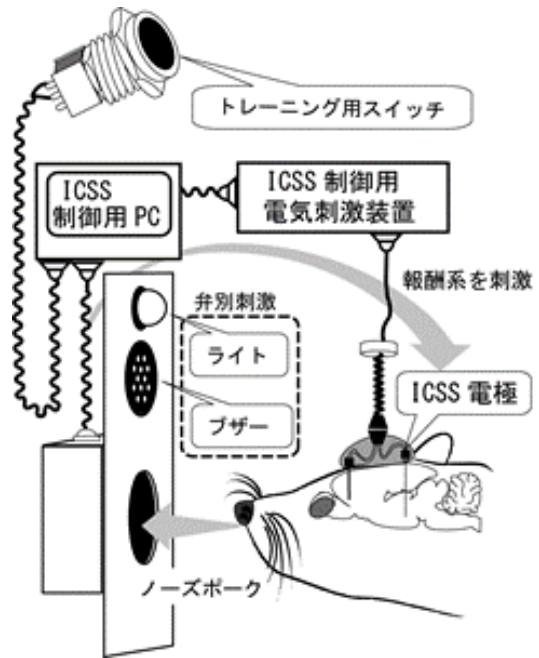
ラットの前頭葉領域にウイルスベクターの局所投与を用い ChR2 をグリア細胞に発現させる。

麻醉下に脳定位固定装置に固定し、皮切。計測後、頭蓋骨にハンドドリルで穴をあけ、前頭葉領域・前部帯状回領域(個体ごとに割り振る)にウイルスベクターとして、グリア細胞に親和性の高いセロタイプ(DJ8)・プロモーター(GFAP プロモーター)を選択し、AAV-GFAP-ChR2(DJ8) 1200 nL をマイクロキャピラリー・電動マイクロインジェクターを用い注入する。注入速度を実体顕微鏡下に観測し制御する。

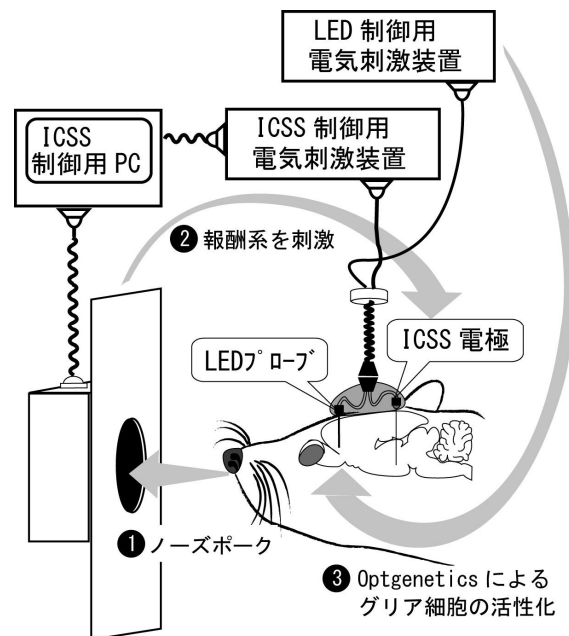
麻醉下に脳定位固定装置に固定し、皮切。計測後、頭蓋骨にハンドドリルで穴をあけ、インジェクション部位から上方 1 mm の部位にプローブの先端が位置するよう LED プローブ (TeleLC-b, ©バイオリサーチセンター) を脳内に挿入する。瞬間接着剤で頭蓋に仮止めする。ICSS 電極を視床外側 (Bregma を基準に 3.8 mm 後方、1.6 mm 外側、深さ 8.5 mm) に挿入する。瞬間接着剤で頭蓋に仮止めする。それぞれの入力端子をコネクターのリード線にハンダ付けする。デンタルセメントで全体を覆う。



スキナーボックスに順応させた後、自己刺激行動が起こるか確認する。忌避反応などの異常反応が出た個体はここで脱落とする。弁別刺激としてスキナーボックス内に設置したブザーと照明の明滅を使用する。スキナーボックスの穴に鼻を入れると(ノーズポークすると)赤外線センサーが感知し自動的に制御用パソコンで単位時間ごとの累積数が集計される。同時に刺激装置から ICSS 電極にパルス電流が出力される。刺激スイッチは研究者の手元にもあり、ICSS が成立するまでは、ラットの注意がセンサーに向いたときに刺激装置を発火させる。ICSS が確認できたら電流値を 3 分おきに变化させ上昇過程・下降過程を経て閾値を決定する。周波数でも同様の操作を行い閾値を決定する。これ以降は個体ごとに得られた閾値に周波数を固定し、計測には電流値の閾値変化を用いる。次に消去学習を行い、弁別刺激が無い状態では刺激電流が流れないことを学習させる。



後日に光刺激を与え、グルタミン酸濃度が上昇した脳内環境下で ICSS の刺激電流閾値の変化を観察する。LED からの光パルス刺激について最適なパルス幅・周波数を検討する。



#### 4．研究成果

ICSS の成立には成功したが、その後の ChR2 をグリア細胞に発現させ、閾値を変化させるといった当初目的とした結果を課題期間中に得られなかった。

前頭葉のグルタミン神経は扁桃体等の基底核へ広く投射している。

グルタミン神経の投射先であるそれらの脳部位へ Ch2 を発現させることで、予想した結果を得られる可能性が示唆された。しかしながら本実験で使用した LED プローブは外注のため、仕様変更毎に金銭支出を伴う。そのため、薬理遺伝学的方法論で上記脳部位の検討を行うべきと考えた。

#### 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)

[学会発表](計 1 件)

蛭原功介 光遺伝学的手法を用いたうつ病グリアモデルの検討 2017 年

#### 6．研究組織

##### (1) 研究代表者

蛭原 功介 (EBIHARA Kosuke)

宮崎大学 医学部 助教

研究者番号：20510720