

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H01573

研究課題名(和文) 双極性障害の原因における視床室傍核の役割についての研究

研究課題名(英文) Role of paraventricular thalamic nucleus in bipolar disorder

研究代表者

加藤 忠史 (KATO, TADAFUMI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30214381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：双極性障害患者と対照群において、カルレチニン染色により視床室傍核を同定し、抗チトクロームc酸化酵素(COX)抗体・抗クエン酸脱水素酵素(SDH)抗体の二重染色を行い、ミトコンドリア機能障害を持つ細胞を同定し、抗8-OHdG抗体免疫染色により、DNA酸化の評価を行った結果、患者視床室傍部でミトコンドリア機能障害を持つ細胞が見られた。Creを2つに分割し、Gbx2とMaobの下流に2A配列を介して融合タンパク質として発現させ、薬剤投与で会合させることで視床室傍核特異的にCreを発現するリポーターマウスの作成を試みたが、Cre活性が得られず、以後の実験にはアデノ関連ウイルスを用いることとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

双極性障害において、視床室傍核にミトコンドリア機能障害を持つ細胞が同定されたことは、双極性障害の原因脳部位が視床室傍核である可能性に矛盾しない。今後、この所見の特異性を更に確認すると共に、動物モデルで視床室傍核病変と双極性障害の症状との関連性が確認されれば、双極性障害の病態理解を進めることになる。双極性障害の原因が明らかとなれば、その診断法や新たな治療法の開発にもつながる。現在、双極性障害の初発抑うつエピソードはうつ病と診断され、結果的には適切でない治療を受けざるを得ないが、今後、こうした状況が改善することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In bipolar patients and controls, paraventricular thalamic nucleus (PVT) were identified by calretinin staining. Double staining with anti-cytochrome c oxidase (COX) and anti-succinate dehydrogenase (SDH) antibodies was used to identify cells with mitochondrial dysfunction and anti-8-OHdG antibody immunostaining was used to evaluate DNA oxidation. Cells with mitochondrial dysfunction were identified in the PVT. We attempted to create a reporter mouse that expresses Cre specifically in the PVT by dividing Cre into two parts and expressing them as a fusion protein via a 2A sequence downstream of Gbx2 and Maob, and then aggregating them by drug administration. However, Cre activity was not obtained, and adeno-associated viruses were used in subsequent experiments.

研究分野：精神医学

キーワード：双極性障害 視床室傍核 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病・双極性障害などの気分障害は、長期休職、自殺などにより、精神神経疾患の中でも、認知症と並んで最も大きな社会負担となっている疾患であるが、その原因は未だ不明であり、検査法もない状態が続いている。現在用いられている治療法は 1950 年前後に見いだされた治療薬の改良版であり、新たなイノベーションが望めないことから、多くの巨大製薬会社がうつ薬開発から撤退するなど、姑息的な新薬開発はもはや限界となっており、原因に基づく治療を開発するためには、ゲノム要因を基盤として、根本的な原因を解明する必要があると認識されるに至っている。

双極性障害(躁うつ病)は、抑うつ状態の原因の 1~2 割以上を占めており、ゲノム要因が大きく関与することから、気分障害の原因解明の突破口になると期待されていた。しかしながら、ゲノム要因が特定され、多くのモデルマウスが作成され、神経細胞レベルの病態の研究が進みつつある自閉スペクトラム症や統合失調症に比べ、遅れを取っているのが現状である。

我々は、ミトコンドリア病が高頻度に双極性障害を伴うことに着目し、ミトコンドリア病である慢性進行性外眼筋麻痺の原因遺伝子 **Polg** の変異体を神経特異的に発現するモデルマウスを作成し、このマウスがうつ状態の診断基準を満たす反復性・自発性の抑うつエピソードを示すことを見出した。このエピソードは、気分安定薬であるリチウム中止で悪化し、三環系抗うつ薬で躁転を引き起こされるなど、双極性障害に類似の行動表現型を示すことを見いだした。

更に、このマウスにおける変異ミトコンドリア DNA 蓄積部位の探索により、視床室傍核に最も多くの変異が蓄積していることを見いだした(Kasahara et al, *Molecular Psychiatry* 2016)。視床室傍核は、縫線核のセロトニン神経、視床下部室傍核の **CRH** ニューロン、および視床下部視交叉上核の投射を受け、恐怖に関わる扁桃体、報酬に関わる側坐核、情動制御に関わる前部帯状回に投射するという、気分障害関連脳部位の全てとの連絡がある興味深い脳部位であるが、これまでほとんど調べられてこなかった脳部位であり、双極性障害の原因脳部位である可能性が考えられた。更に、気分症状を伴うミトコンドリア病患者において、視床室傍核にミトコンドリア機能障害を持つ細胞が集積していることを見いだしたことから、気分障害患者の少なくとも一部においては、視床室傍核がその原因となっていると考えられた。

しかしながら、視床室傍核に **mtDNA** 欠失が蓄積した結果、視床室傍核の神経細胞にどのような機能変化、形態学的変化が生じるのかについては、ほとんど分かっていない。**mtDNA** の欠失蓄積は、ミトコンドリアの膜電位低下を引き起こし、その結果ミトコンドリアの **ATP** 産生低下、カルシウム取り込み能の低下に伴う細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こすと考えられるが、前者は興奮性の低下、後者は興奮性亢進を引き起こす可能性が考えられる。最近、Gage らのグループは、双極性障害患者 **IPS** 細胞由来神経細胞の表現型を検討し、これらの神経細胞はミトコンドリア機能障害を示し、初期には過剰興奮、その後興奮の抑制が見られると報告しており、ミトコンドリア機能障害に伴う神経機能の変化は単純ではないと考えられた(Mertens et al, *Nature* 527: 95-97, 2015)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、双極性障害における視床室傍核の役割を明らかにすることである。

そのため、以下の方向から研究を進める。

- (1) 双極性障害患者死後脳において、視床室傍部の病変を検索する
- (2) 変異 **Polg1** トランスジェニックマウスを用いて、視床室傍核の病態を明らかにする
- (3) **mtDNA** 欠失を誘導した細胞を用いて、ミトコンドリア機能障害に伴う細胞の機能変化を明らかにする
- (4) 視床室傍核の機能を修飾するため、視床室傍核特異的に **Cre** を発現するマウスを作成し、視床室傍核機能障害マウスおよび機能亢進マウスを作成し、視床室傍核の機能変化と行動変化の因果関係を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 死後脳

ブレインバンクより供与を受けた双極性障害患者および対照群の死後脳由来視床ブロックまたは脳切片を用いた。

固定脳ブロックは、パラフィン包埋を行い、4 $\mu$ m 厚の切片を作成した。染色には、クリューパーバレーラ染色、ニッスル染色、ヘマトキシリン - エオジン染色等の基本染色および免疫組織化学的染色(抗カルレチニン抗体、抗チトクローム c 酸化酵素(**COX**)抗体、抗クエン酸脱水素酵素(**SDH**)抗体)を用いた。

患者および対照群の視床において、抗チトクローム c 酸化酵素(**COX**)抗体および抗クエン

酸脱水素酵素(SDH)抗体による二重染色を行った。

## (2) モデルマウス・モデル細胞

培養細胞を用い、変異 **Polg** (ミトコンドリア DNA ポリメラーゼ) を発現させ、培養細胞にミトコンドリア DNA を蓄積させることを試みた。

変異 **Polg1** トランスジェニックマウスにおいて、視床室傍核の機能変化を明らかにするため、**c-Fos** 免疫染色を行った。

視床室傍核特異的に **Cre** を発現させるトランスジェニックマウスを作成するため、既存データの解析およびデータベースのサーチを行い、視床室傍核特異的に **Cre** を発現させるため、遺伝子を探索した。

**Cre** 発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)および **Cre-loxP** 依存的に **hM3Dq** または **hM4Di** を発現する **AAV** を視床室傍核にインジェクションし、特異的アゴニストである **CNO(clozapine N-oxide)** を投与することによって、視床室傍核の機能を亢進あるいは低下させ、マウスの行動解析を行い、輪回し装置を用いて活動量を長期に測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 死後脳

ブレインバンクより供与を受けた双極性障害患者および対照群の死後脳視床ブロックより作成した脳切片を用いて、クリューパーパレラ染色、ニッスル染色、ヘマトキシリン - エオジン染色等の基本染色を行い、切片内に含まれる構造、神経核をアトラスと比較して把握した。さらに、抗カルレチニン抗体染色を用いて、カルレチニン陽性細胞を同定した。

患者および対照群の視床室傍部において、抗チトクローム **c** 酸化酵素 (**COX**) 抗体および抗クエン酸脱水素酵素(SDH)抗体による二重染色を行って検討を行った。どちらもミトコンドリア局在タンパク質であるが、**COX** は **mtDNA** にコードされているため、**mtDNA** 欠失が存在すると、**COX** 陰性となり、ミトコンドリア障害をきたすと推定される。そこで、この **COX** 陰性細胞を視床室傍部において探索した結果、視床室傍部に **COX** 陰性細胞を認める双極性障害患者を見出した。この所見の部位特異性、疾患との関連について、慎重に検討を行い、統計学的な解析を加え、論文化の予定である。

### (2) モデルマウス・モデル細胞

**mtDNA** 変異蓄積によって細胞の形態や機能がどのように変化するかを解析するため、**HEK293** 細胞に、テトラサイクリンプロモーター下に **Polg** の変異体を発現させるコンストラクトを作成した。その結果、変異 **Polg** を培養細胞に発現させることができた。しかしながら、培養細胞では、既に変異 **mtDNA** が蓄積していることがわかり、変異 **Polg** 発現による **mtDNA** 蓄積を検出することはできなかった。

変異 **Polg1** トランスジェニックマウスにおいて、視床室傍核の **c-fos** 免疫染色を行い、この領域の神経細胞の活動性を検討した。その結果、マウスのうつ状態において、**c-Fos** 様免疫活性を持つ細胞が多い傾向が見られた。

視床室傍核特異的に **Cre** を発現させるトランスジェニックマウスを作成するため、既存データを解析した。野生型マウスで視床室傍核を含む **4** 部位について行われた遺伝子発現解析の結果を用いて、視床室傍核で他 **3** 領域全てに比し有意に発現量が高く、**Fold Change** が他領域に対して **1.2** 倍以上の遺伝子、**98** 個を抽出し、全遺伝子について、**Allen Brain Atlas** を用いて目視確認を行った。その結果、**Allen Brain Atlas** に登録されており、脳局所で発現が確認できる遺伝子は **12** 個であり、うち、視床室傍核特異的といえるものは、**Gbx2** のみであった。そこで、**Jackson Laboratory** より、**Gbx2** プロモーター下に **Cre** を発現するマウスを購入し、**Cre** 存在下に **GFP** を発現するマウスと掛け合わせて検討したところ、予想に反し、より幅広い視床領域に発現していた。この結果は、**Gbx2** は成体では視床室傍核に局限して発現している一方、発達の過程では視床全体で発現する時期があるためと考えられた。

そこで、**Gbx2** と、視床室傍核特異的とは言えないものの、視床内では視床室傍核に特異的に発現しているような、もう **1** つの遺伝子のリポーターマウスを組み合わせることとした。すなわち、**Cre** の **N** 末端側ポリペプチドと、**Cre** の **C** 末端側ポリペプチドを、各遺伝子のプロモーター下で発現させ、これらの **split-Cre** 蛋白を会合させる薬剤を投与することにより、視床室傍核のみで活性のある **Cre** 蛋白を再構成させる方法 (**Xu et al, Nucleic Acids Research 2007**) を用いた。もう **1** つの遺伝子としては、**Allen Brain Atlas** の **Fine Structure Search** を用い、視床室傍核と縫線核の両方で発現している遺伝子を探索した際、**Maob** を見出し、その発現部位を検討していたことから、**Gbx2** と **Maob** の両方を発現する部位であれば、視床室傍核に限定可能であると考えた。

そこで、**Gbx2** と **Maob** の各々のプロモーター下で **split-Cre** を発現させ、薬剤投与により **Cre** を会合させ、機能を発揮させる方法を検討した。

その結果、**split-Cre** の **mRNA** が発現していることは確認できたが、**split-Cre** を会合させる薬剤を、尾静脈投与を含め、極量で毎日 **2** 週間投与しても、**Cre** 活性は得られなかった。**Cre** 活性が得られない原因としては多くの可能性が想定され、特定することはできなかった。

結果として、視床室傍核特異的 **Cre** マウスを作成することができなかつたため、トランスジェニックマウスを用いた方法は諦め、**Cre** を発現するアデノ随伴ウイルス(**AAV**)および **Cre-loxP** 依存的に **hM3Dq** または **hM4Di** を発現する **AAV** を視床室傍核にインジェクションし、**hM3Dq** および **hM4Di** 特異的アゴニストである **CNO(clozapine N-oxide)**を投与することによって、視床室傍核の機能を亢進あるいは低下させ、マウスの行動学的解析を行った。その結果、**hM3Dq** を発現させたマウスに **CNO** を投与することによる視床室傍核ニューロンの長期活性化が、反復性の活動低下エピソードを引き起こすことを見出した。一方、**hM4Di** を発現させたマウスに **CNO** を投与することによる視床室傍核ニューロンの長期抑制は、こうした行動変化を引き起こさなかつた。これらの結果は、双極性障害の病態に、視床室傍核の過剰興奮が関わっている可能性を示唆すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kato TM, Fujimori-Tonou N, Mizukami H, Ozawa K, Fujisawa S, Kato T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Presynaptic dysregulation of the paraventricular thalamic nucleus causes depression-like behavior.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52984-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kato T	4. 巻 73
2. 論文標題 Current understanding of bipolar disorder: Toward integration of biological basis and treatment strategies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 526-540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pcn.12852.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kato TM, Kubota-Sakashita M, Fujimori-Tonou N, Saitow F, Fuke S, Masuda A, Itohara S, Suzuki H, Kato T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Ant1 mutant mice bridge the mitochondrial and serotonergic dysfunctions in bipolar disorder	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 2039-2049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41380-018-0074-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kasahara T, Kato T.	4. 巻 83
2. 論文標題 What Can Mitochondrial DNA Analysis Tell Us About Mood Disorders?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 731-738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopsych.2017.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Obata Youhei, Kubota-Sakashita Mie, Kasahara Takaoki, Mizuno Masafumi, Nemoto Takahiro, Kato Tadafumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Phenethylamine is a substrate of monoamine oxidase B in the paraventricular thalamic nucleus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-03885-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroki Ryota, Murata Yui, Fuke Satoshi, Nakachi Yutaka, Nakashima Jun, Kujoth Gregory C., Prolla Tomas A., Bundo Miki, Kato Tadafumi, Iwamoto Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of Quantitative PCR Assays for Active Long Interspersed Nuclear Element-1 Subfamilies in Mice and Applications to the Analysis of Aging-Associated Retrotransposition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 519206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2020.519206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kageyama Yuki, Kasahara Takaoki, Nakamura Takemichi, Hattori Kotaro, Deguchi Yasuhiko, Tani Munehide, Kuroda Kenji, Yoshida Sumiko, Goto Yu-ichi, Inoue Koki, Kato Tadafumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Plasma Nervonic Acid Is a Potential Biomarker for Major Depressive Disorder: A Pilot Study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 207 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ijnp/pyx089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kageyama Yuki, Kasahara Takaoki, Kato Masaki, Sakai Shiho, Deguchi Yasuhiko, Tani Munehide, Kuroda Kenji, Hattori Kotaro, Yoshida Sumiko, Goto Yuichi, Kinoshita Toshihiko, Inoue Koki, Kato Tadafumi	4. 巻 233
2. 論文標題 The relationship between circulating mitochondrial DNA and inflammatory cytokines in patients with major depression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Affective Disorders	6. 最初と最後の頁 15 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jad.2017.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bagge Emilie Kristine, Fujimori-Tonou Noriko, Kubota-Sakashita Mie, Kasahara Takaoki, Kato Tadafumi	4. 巻 18
2. 論文標題 Unbiased PCR-free spatio-temporal mapping of the mtDNA mutation spectrum reveals brain region-specific responses to replication instability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-020-00890-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Kazuo, Miranda Alannah, Craig David W., Shekhtman Tatyana, Knoch Stanislav, Bleyer Anthony, Szelinger Szabolcs, Kato Tadafumi, Kelsø John R.	4. 巻 10
2. 論文標題 Ntrk1 mutation co-segregating with bipolar disorder and inherited kidney disease in a multiplex family causes defects in neuronal growth and depression-like behavior in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-01087-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 加藤忠史
2. 発表標題 変異Polgトランスジェニックマウスに見られたうつ病様エピソードとそのメカニズム
3. 学会等名 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学会 (BPNP2017) 合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kubota-Sakashita M, Mechawar N, Shimogori T, Turecki G, Kato T
2. 発表標題 immunohistochemical analyses of paraventricular thalamic nucleus (PVT) in human postmortem brains.
3. 学会等名 Society for Neuroscience (SfN) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

精神疾患動態研究チーム http://mdmd.riken.jp/ 精神疾患動態研究チーム http://www.brain.riken.go.jp/labs/mdmd/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	笠原 和起  (Kasahara Takaoki)  (50344031)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ 上級研究員   (82401)	
研究分担者	島 康之  (Shima Yasuyuki)  (60815885)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ 上級研究員   (82401)	
研究分担者	窪田 美恵 (坂下美恵)  (Kubota-Sakashita Mie)  (90344035)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授   (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------