

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15534

研究課題名(和文) うつ病の病態解明を目的として病態特異的な反応性アストロサイトに着目した研究

研究課題名(英文) A study on pathogenesis of depression by focusing on pathogenesis-specific reactive astrocytes

研究代表者

梶谷 直人 (Kajitani, Naoto)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特別研究員

研究者番号：60755742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病の病態特異的な反応性アストロサイトが存在するのではないかと仮説を立て、動物実験を用いて検証することを目的とした。

過去に反応性アストロサイト特異的遺伝子と同定された遺伝子に関して、抗うつ薬で抗うつ行動を確認したマウス脳からマイクロアレイを用いて調べたが、有意な発現変化は見られなかった。これまでに、アストロサイトのLPA1受容体が抗うつ効果に重要な受容体であることを見出している。脳内におけるLPA1受容体発現を調べたところ、多くがオリゴデンドロサイトとアストロサイトに限局して発現しており、さらにS100B陽性アストロサイトが病態への関与が示唆されるアストロサイトの亜種団として示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病は、自殺の主な原因であり、社会的損失が大きな疾患である。また、既存の治療法では再発率も高く、根治に向けた病態解明が望まれている。本研究ではうつ病の病態解明を行うために、中枢神経系の半数近くを構成するアストロサイトに着目し、病態への関与を検討した。研究の結果、抗うつ薬の効果に関与する受容体(LPA1)が特定のアストロサイトに存在することが明らかとなった。今後、特定したアストロサイトをより詳細に検討することで、この細胞を標的にしたうつ病治療薬やバイオマーカーの開発につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to investigate the hypothesis that there are pathospecific reactive astrocytes in Major depressive disorder (MDD).

Micorarray analysis revealed that long-term treatment with antidepressants did not alter reactive astrocyte-specific genes in the mouse brain.

Previous study found that the LPA1 receptor in astrocytes is an important receptor for antidepressant effects. Then the current study explored the cellular distribution pattern of LPA1 receptor in the mouse brain. The current findings demonstrated that LPA1 receptor-expressing cells in the adult brain were mainly oligodendrocytes and astrocytes and suggested that S100B-positive astrocytes are a subpopulation of astrocytes that may be involved in the MDD.

研究分野：精神神経科学

キーワード：アストロサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病は、自殺の主な原因であり、社会的損失が大きな疾患である。また、既存の治療法では再発率も高く、根治に向けた病態解明が望まれている。うつ病の病態メカニズムとしてこれまでの基礎・臨床研究から、成体海馬における神経新生の低下や脳内広域での神経シナプスの減少が起こり、神経ネットワークに可塑的な異常が起こっている可能性が示唆されている。しかし、なぜ神経可塑的な異常が引き起こされるのか、詳細は不明である。神経可塑的な異常を引き起こすうつ病の病態メカニズムを解明することは、新たなうつ病治療薬開発にもつながる非常に重要な研究課題である。

2. 研究の目的

うつ病の病態解明を目指すうえで、アストロサイトに着目した。アストロサイトは中枢神経系の半数近くを構成するグリア細胞の一つであり、神経栄養因子やシナプス新生促進因子を産生し、脳内の神経新生やシナプスの維持などの生理機能に重要な役割を担っている。また、中枢性疾患の病態時においてもアストロサイトは活性化し、重要な役割を担うと考えられているが、ある疾患では、病変部の組織修復など神経保護作用に関与する一方、他の疾患では、炎症反応を誘導し神経軸索の再生阻害など病態の形成や悪化に関与するといった二面性があることが知られている。この同じ反応性アストロサイトが異なった作用を示す問題点の原因には、多くの場合、反応性アストロサイトをそのマーカーである GFAP の発現変化のみで定義していることが挙げられる。最近の報告で、神経障害作用を示す反応性アストロサイト (A1 アストロサイト) と神経保護作用を示す反応性アストロサイト (A2 アストロサイト) が同定された(Liddel et al. Nature 2017)。この発見は、役割の異なる反応性アストロサイトを複数の特異的遺伝子で評価できることを示し、疾患特異的な反応性アストロサイトが存在するという新たな概念を提示した。

うつ病において、死後脳研究や動物実験から、うつ病の病態では脳内のアストロサイトが減少するなどの機能低下が生じ、一方で治療効果発現時にその低下が回復することが示唆されていることから、うつ病の病態にアストロサイトが何らかに関与している可能性が考えられる。しかし、うつ病の病態時や治療効果発現時に反応性アストロサイトが誘導されるか否かは全くの不明である。そこで、以上の学術的背景を踏まえ、本研究ではうつ病の病態特異的な反応性アストロサイトが存在するのか検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)

成体雄性マウス(C56BL/6, 6週齢以上)に抗うつ薬(160mg/L amitriptyline, 自由接種)を2週間投与し、強制水泳試験を用いて抗うつ行動が得られるか検討した。行動試験終了後犠死し、脳を摘出し前皮質と海馬に部位分けし Total RNA を抽出した。マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を調べた。

(2)

複数の細胞が混在している脳内からアストロサイトだけを選択的に抽出するために、アストロサイト特異的に認識する抗体磁気ビーズ(Anti-ASCA2 Microbeads; ミルテニー)を使用し、マウス脳内からアストロサイトを回収する検討を行った。具体的にはマウス脳組織をミルテニーの酵素処理分散キット(NTDK-P)で分散し、細胞分散液に磁気ビーズを反応させ、磁気分離によりアストロサイトのみを分離する。回収したアストロサイトとそのフロースルーから RNA 抽出を行い、real time PCR 法で遺伝子発現変化を調べた。

(3)

これまでにアストロサイトの LPA1 受容体が抗うつ薬の作用に関与しており、うつ病の病態にも関与する可能性があることを示している。そこで、LPA1 受容体ヘテロ KO マウス(雄性, 約 10 週齢)を用いて、マウスを犠死後、脳を摘出しホルマリン固定し、FFPE 切片を作製した。作製した切片に関して、LPA1 受容体や各種脳細胞マーカー抗体で多重蛍光免疫組織染色法を行い、脳内のどの細胞種で LPA1 受容体が発現しているか、検討した。さらに、アストロサイトに関して、様々なアストロサイトマーカー抗体(ALDH111, GFAP, S100B)による多重蛍光免疫組織染色法を行い検討した。

4. 研究成果

(1)

過去の報告(Liddel et al. Nature 2017)で、反応性アストロサイト特異的遺伝子と同定された 37 種類の遺伝子に関して、公共データベース(NCBI GEO)を利用して、抗うつ薬長期投与におけるマウス海馬の遺伝子発現変化を調べたデータから検索すると、反応性アストロサイト特異的遺伝子の約半数の遺伝子発現が増加していることを見出した。

そこでこのデータの再現を得るために、マウスに抗うつ薬を長期投与し、強制水泳試験を用いて抗うつ行動を確認したマウスから前皮質と海馬を抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を調べたが、37 種類全ての遺伝子で発現変化は見られなかった。検討した抗うつ薬の違いや各種組織でのアストロサイト以外の細胞が結果の相違に影響したと思われる。

(2)

成体マウス脳から細胞分散液を作製し、フローサイトメーターで確認したところ、細胞分散液の大半がデブリまたはミエリン片であり、目的の細胞群は 2%程度しか含まれていないことが分かった。そこで、磁気ビーズにより細胞デブリ除去を行うことで、目的の細胞群の収率を 30%以上に改善することに成功した。この手法でマウス海馬から抽出した細胞分散液を、磁気ビーズを用いて磁気分離を試みたところ、上記条件で遺伝子発現解析を行うためには、一つのサンプルを得るために、マウス 5 匹以上必要であることが分かった。回収したアストロサイトから抽出した Total RNA を real time PCR で調べたところ、GFAP, GLT1, GLAST 等のアストロサイトマーカーがフロースルー画分と比較して高発現していたことから、アストロサイトを選択的に回収できていることを明らかにした。ただし、ミルテニーの分散キット (NTDK) では若齢マウス脳からの分離しか保証されていないように、収率が悪く実験のスループットが悪いため、今後、より収率の良い分離方法を検討することが必要である。

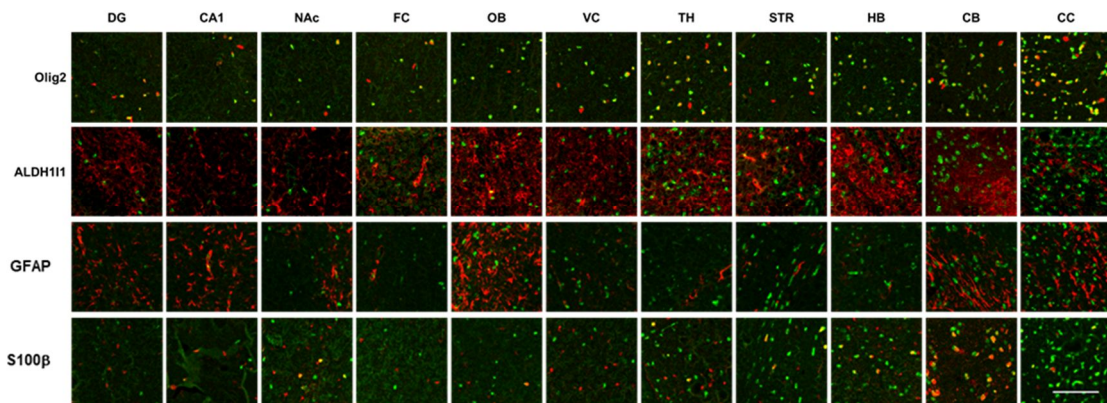
(3)

LPA1 受容体ヘテロ K0 マウス脳内における LPA1 受容体の約 60%がオリゴデンドロサイトに発現しており、残りの約 20%がアストロサイトに発現していることを明らかにした。また、正常マウスと比較して、LPA1 受容体ヘテロ K0 マウスの LPA1 受容体の発現は半減しているものの、脳内の発現分布には特に変化がなかった。

これまでに、複数のアストロサイトマーカーが知られているが、今回、代表的な 3 つにマーカー (ALDH111, GFAP, S100B) で検討したところ、興味深いことに、これらのマーカーは脳内で発現分布が異なることが明らかとなった。ALDH111 は脳全域で最も広く発現しており、GFAP は海馬や白質領域で多く発現していた。S100B は小脳などに強い発現が見られた。それぞれのマーカーは共発現している細胞もあり、逆に、どちらか一方のマーカーだけを発現している細胞も存在した。これは「アストロサイト」が均一な細胞集団ではなくヘテロな細胞集団であることを示していると考えられる。

どのアストロサイトマーカー陽性細胞が LPA1 受容体を発現しているか検討したところ、ALDH111 陽性細胞と GFAP 陽性細胞はほぼ同じような LPA1 受容体発現分布を示したが、興味深いことに小脳における S100B 陽性細胞はより多くの細胞が LPA1 受容体を発現していた (図)。これらの脳内における LPA1 受容体発現分布に関する研究成果をまとめ、Biochem Biophys Res Commun. に投稿し受理された。(Kajitani et al., 2020 in press)

以上の結果から、うつ病の病態に關与する可能性のある LPA1 受容体の多くがオリゴデンドロサイトとアストロサイトに限局して発現しており、さらに S100B 陽性アストロサイトが病態への關与が示唆されるアストロサイトの亜種群として示唆された。



(図)

(Kajitani et al. 2020 から引用)

各細胞マーカーにおける複数の脳領域における LPA1 受容体との 2 重染色

赤色 : Olig2 (オリゴデンドロサイトマーカー), ALDH111, GFAP, S100B (アストロサイトマーカー)

緑色 : LPA1 受容体発現細胞

脳部位 : DG (歯状回), CA1 (海馬亜領域), NAc (側坐核), FC (全皮質), OB (嗅球), VC (視覚皮質),

TH (視床), STR (線条体), HB (後脳), CB (小脳), CC (脳梁)

スケールバー : 100µm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Itagaki Kei, Takebayashi Minoru, Abe Hiromi, Shibasaki Chiyo, Kajitani Naoto, Okada-Tsuchioka Mami, Hattori Kotaro, Yoshida Sumiko, Kunugi Hiroshi, Yamawaki Shigeto	4. 巻 22
2. 論文標題 Reduced Serum and Cerebrospinal Fluid Levels of Autotaxin in Major Depressive Disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 261 ~ 269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1093/ijnp/pyz005	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 Abe Hiromi, Kajitani Naoto, Okada Tsuchioka Mami, Omori Wataru, Yatsumoto Masahide, Takebayashi Minoru	4. 巻 39
2. 論文標題 Antidepressant amitriptyline induced matrix metalloproteinase 9 activation is mediated by Src family tyrosine kinase, which leads to glial cell line derived neurotrophic factor mRNA expression in rat astroglial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 156 ~ 163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1002/npr2.12055	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 Omori Wataru, Itagaki Kei, Kajitani Naoto, Abe Hiromi, Okada Tsuchioka Mami, Okamoto Yasumasa, Takebayashi Minoru	4. 巻 73
2. 論文標題 Shared preventive factors associated with relapse after a response to electroconvulsive therapy in four major psychiatric disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 494~500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1111/pcn.12859	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 Okada Tsuchioka Mami, Omori Wataru, Kajitani Naoto, Shibasaki Chiyo, Itagaki Kei, Takebayashi Minoru	4. 巻 40
2. 論文標題 Decreased serum levels of thrombospondin 1 in female depressed patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 39 ~ 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12088	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 Kajitani Naoto, Okada-Tsuchioka Mami, Kano Kuniyuki, Omori Wataru, Boku Shuken, Aoki Junken, Takebayashi Minoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Differential anatomical and cellular expression of lysophosphatidic acid 1 receptor in adult mouse brain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kajitani N, Okada-Tsuchioka M, Abe H, Omori W, Itagaki K, Machino A, Takebayashi M.
2. 発表標題 Distribution of multiple lysophosphatidic acid receptors in adult mouse brain
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶谷直人、岡田麻美、安部裕美、大盛 航、板垣 圭、竹林 実
2. 発表標題 脳内における抗うつ薬受容体 (LPA1) 発現細胞の特定とその役割
3. 学会等名 第5回サイコグリア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶谷直人、岡田麻美、安部裕美、大盛 航、板垣 圭、竹林 実
2. 発表標題 抗うつ薬受容体 (LPA1) の脳内発現とその役割
3. 学会等名 第37回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoto Kajitani, Mami Okada-Tsuchioka, Hiromi Abe, Wataru Omori, Kei Itagaki, Minoru Takebayashi
2. 発表標題 Cellular localization of lysophosphatidic acid receptor 1 in the mouse brain.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学大学院生命科学研究部神経精神医学講座 https://www.kumamoto-neuropsych.jp/ 国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター 臨床研究部 https://kure.hosp.go.jp/department/clinical_research/</p>

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