

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16818

研究課題名（和文）産後うつ病におけるうつ様行動関連脳領域に対する遺伝的背景の影響

研究課題名（英文）Effect of genetic background on the brain regions associated with depression in postpartum depression models

研究代表者

金谷 萌子（Kanaya, Moeko）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00759805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラットの産後うつ症状を引き起こす遺伝的背景を明らかにすることを目的とした。うつ関連脳領域の形態変化や遺伝子発現変化を捉えるために、神経核の採取方法の確立と、in situ hybridization法と免疫染色による共染色の検討を行った。しかし本実験では、産後うつに重要な遺伝子の同定には至らなかったため、今後は当該遺伝子を確定したのち、うつ様行動の関連脳領域に及ぼす影響について検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつに関連する脳領域の形態変化や遺伝子発現変化を捉えるために、その脳領域を正確に採取する方法をラットで確立した。また、変化する指標としては遺伝子とタンパク質を調べる必要があり、どちらについても正確に検出することが可能となった。本実験では産後うつ発症に重要な遺伝子を同定出来なかったが、明らかになった後には本実験で検討した方法と合わせて、産後うつモデル動物における脳領域特異的な変化を捉えることが出来る。女性のライフステージとヘルスケアに関わる研究がより重要となっており、産後うつ病に関しても個人から社会全体において対策が必要とされる。本研究から産後うつ発症メカニズムの基礎研究に繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to determine the genetic background that causes postpartum depression in rats. To clarify changes in the morphology and gene expression in depression-related brain regions, we established a method for capturing nuclei and examined co-staining by in situ hybridization and immunostaining. However, we did not reveal the genes responsible for postpartum depression. It is necessary to determine the relevant genes and then the effects on the related brain regions.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：エストロゲン受容体 室傍核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

女性の社会進出や健康寿命の延伸に伴い、女性のライフステージとヘルスケアに関する研究はより重要になっている。その中でも、出産という大きなライフイベントのあとは、身体的・精神的ストレスに端を発する産後うつ病と呼ばれる精神障害の発症頻度は高い。単なる個人における心身の健康障害に留まらず、個人を取り巻く家族や社会にとっても、正確な知識を得て理解すること、また対策を考える上で、産後うつ発症メカニズムの解明は重要である。

産後うつ病には、遺伝的要因や内分泌学的要因、環境要因といった多数の因子が交絡的に関与している。基礎実験において産後うつモデル動物の作製方法は多岐にわたるが、妊娠後期から出産直前にかけてのステロイドホルモンの急激な変化を模倣するモデル、妊娠期に強制水泳ストレスや拘束ストレスに曝露するモデル、産後に母子分離ストレスを与えるモデル、などが操作の簡便性と再現性の高さから汎用されている。しかし、これらは内分泌学的要因と環境要因に着目して作製されたモデルであり、遺伝的要因が考慮されていなかった。

2. 研究の目的

産後うつ病の代表的な症状は、不安・慢性的な疲労感・食欲不振・不眠症などである。動物を用いた産後うつ病の研究では、客観的指標として行動や神経系の変化を評価することが可能であり、実際、強制水泳試験における無動時間の延長、ショ糖などの報酬に対する反応性の低下、異常な睡眠状態などの観察所見が産後うつ症状として考えられている。しかし、モデル動物をヒトの臨床像により接近させるためには、遺伝的背景を考慮する必要があると考えた。

うつ様行動に関連する神経核として、分界条床核・前頭前皮質・海馬・内側扁桃核・室傍核などが知られている [McKinnon et al, J Psychiatry Neurosci, 2009; Haufler et al., Leam Mem, 2013]。産後うつ動物において、分界条床核と海馬の樹状突起スパインの減少 [Matsuo et al., Neurosci Lett, 2017] や、海馬の細胞分化の増強や細胞死の減少 [Galea et al., Horm Behav, 2008] が報告されていることから、形態的な変化が生じていると考えられる。

以上のことから、本研究では、産後うつ症状を引き起こす感受性遺伝子を同定し、さらにその感受性遺伝子がうつ様行動の関連脳領域の形態変化や発現遺伝子に及ぼす影響について検討することで、産後うつ発症メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

当初は 4 系統のラットを用いてうつ様行動発現の感受性遺伝子を調べる予定であったが、うつ様行動関連神経核の DNA マイクロアレイを用いた網羅解析により遺伝子発現のプロファイリングを先行して行うために、レーザーマイクロダイセクション法による神経核の採取の方法を確定した。その際、産後うつに深く影響する性ステロイド受容体、特にエストロゲン受容体 (ER) に着目した。1 コピーの RNA から検出可能な超高感度の *in situ* hybridization (ISH) 法である RNAscope と従来から用いられている Dig 標識 ER プロープによる ISH を用いて比較することで、レーザーマイクロダイセクション法による検出力について検討した。

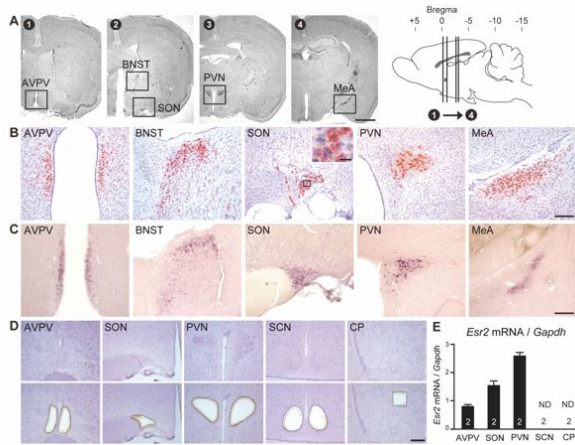
二種の ISH 用には、雌ラットを灌流固定した後、凍結脳切片を作製し、それぞれ ER mRNA を検出した。一方、レーザーマイクロダイセクション法については、新鮮凍結脳切片を作製し、ニッスル染色をした後に、神経核 (前腹側室周囲核や分界条床核、扁桃体や室傍核) を回収後、リアルタイム PCR にて ER mRNA 量を定量した。

また、産後うつ病の発端となるストレスに関連する脳領域である視床下部室傍核において、ER 発現細胞の神経化学特性の同定を行った。

4. 研究成果

レーザーマイクロダイセクション法による神経核の採取

RNAscope および Dig 標識 ER プロープによる ISH とともに、前腹側室周囲核、分界条床核、視索上核、室傍核、扁桃体などで ER 発現細胞が観察された。次に、レーザーマイクロダイセクション法によって採取し、qPCR により ER の発現量を定量した結果、ISH により示された ER 発現細胞の集積する領域、散在する領域、および全く観察されない領域を支持する結果となった。つまり、ISH の観察所見として最も発現の高かった室傍核において、リアルタイム PCR による mRNA 量も高かった。また、ISH で検出されなかった視交叉上核と線条体においてはリアルタイム PCR でも検出されなかった。

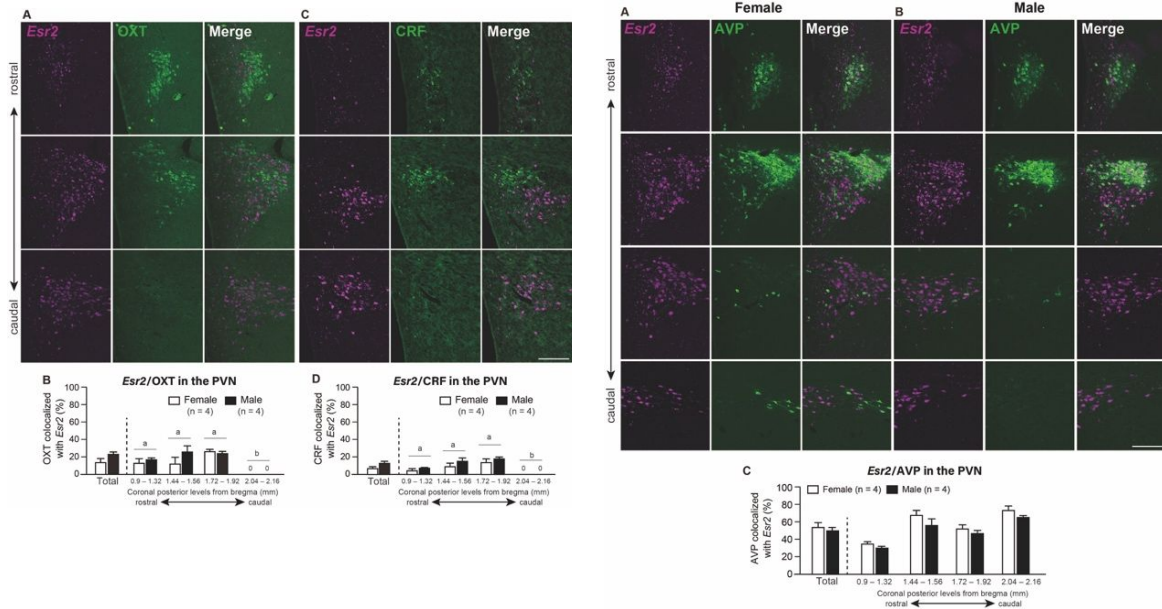


(A) 着目した神経核
 (B) RNAscope ISH によるシグナル
 (C) DIG を用いた ISH によるシグナル
 (D) レーザーマイクロダイセクション法による切片の回収前後
 (E) (D) を用いたリアルタイム PCR による各神経核における ER mRNA 量

室傍核の神経化学特性の同定

続いて、視床下部室傍核における ER 発現細胞の神経化学特性を調べるため、RNAscope とオキシトシン・コルチコトロピン放出因子・バソプレシンの共染色をそれぞれ行った。その結果、オキシトシン発現細胞とコルチコトロピン放出因子産生細胞は室傍核の吻側に比較的多く発現していたが、ER mRNA との共局在率はどちらも低かった。

バソプレシン発現細胞も吻側に多く発現していたが、尾側にかけても発現が確認された。ER mRNA との共局在率は、吻側で少し値は下がったが、それ以外では 50% 以上となり、オキシトシン・コルチコトロピン放出因子産生細胞と ER mRNA との共局在率よりは明らかに高いことがわかった。



以上の結果より、レーザーマイクロダイセクション法による神経核の採取の正確性が示された。また、RNAscope ISH と免疫染色を用いて、特定の神経核における神経化学特性を同定することが可能となった。しかし、今回の実験では、産後うつ様行動の感受性遺伝子を同定するところまでは進められなかった。今後は、産後うつ様行動発現のマウスにおける系統差(直近の観察所見としては C57BL/6N は ICR より頻発している)に着目し、感受性遺伝子を特定する。その後、本実験で得た技術を用いて、うつ関連脳領域における形態変化を引き起こす遺伝子発現の違いや神経化学特性の変化を検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Moeko Kanaya, Shimpei Higo, Ozawa Hitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Neurochemical characterization of neurons expressing estrogen receptor in the hypothalamic nuclei of rats using in situ hybridization and immunofluorescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	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） 10.3390/ijms21010115	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 該当する

1. 著者名 Hirota Ishii, Mai Otsuka, Moeko Kanaya, Shimpei Higo, Yujiro Hattori, and Hitoshi Ozawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Applicability of anti-human estrogen receptor antibody PPZ0506 for the immunodetection of rodent estrogen proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	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） 10.3390/ijms20246312	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Moeko Kanaya, Shimpei Higo, Hitoshi Ozawa
2. 発表標題 Neurochemical characterization of neurons expressing estrogen receptor-beta in the hypothalamus of rats using RNAscope in situ hybridization and immunofluorescence
3. 学会等名 Steroids and Nervous System（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金谷萌子, 肥後心平, 小澤一史
2. 発表標題 ラットの視床下部神経核におけるエストロゲン受容体の神経化学特性の同定
3. 学会等名 日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金谷萌子, 肥後心平, 小澤一史
2. 発表標題 新たなin situ hybridization法によるエストロゲン受容体 の発現解析
3. 学会等名 日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------