

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20023035
 研究課題名（和文）双極性障害における小胞体ストレス反応系の意義についての研究
 研究課題名（英文）Role of endoplasmic reticulum stress pathway in bipolar disorder

研究代表者
 加藤 忠史 (KATO TADAFUMI)
 独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：30214381

研究成果の概要（和文）：

XBP1 を持たない神経細胞では、BDNF による GABA 神経細胞マーカーの発現増加が減弱していた。また、XBP1 の標的遺伝子である WFS1 のノックアウトマウスは、情動関連行動の異常を示し、変異 Polg1 トランスジェニック (Tg) マウスと掛けあわせると、Tg マウスの表現型を悪化させた。Polg1 マウス脳内で、局所的に変異 mtDNA が蓄積している部位を同定した。

研究成果の概要（英文）：

Neurons lacking XBP1 showed diminished upregulation of GABAergic marker genes (somatostatin, neuropeptide Y, calbindin) in response to BDNF. Knockout (KO) mice of Wfs1, the gene regulated by XBP1, showed slight but significant behavioral phenotypes in emotion-related behavior. Double mutant mice, Wfs1 KO and Polg transgenic, showed exaggerated behavioral phenotypes. The brain regions accumulating mtDNA deletions in Polg1 Tg mice were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	13,600,000	0	13,600,000
2009 年度	13,600,000	0	13,600,000
総計	27,200,000	0	27,200,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：双極性障害 ・ 小胞体ストレス ・ GABA ・ ミトコンドリア DNA

1. 研究開始当初の背景

我々は以前、一卵性双生児双極性障害不一致例のリンパ芽球における遺伝子発現解析により、小胞体ストレス反応に関わる遺伝子、XBP1 および HSPA5 (GRP78) が患者で低

下していること、および双極性障害患者由来培養リンパ芽球では小胞体ストレスに対する XBP1 および HSPA5 の上昇反応が減弱していることを見出した。しかしながら、XBP1 および HSPA5 が神経細胞においてどのような生理的意義を持つかについては十分にわかっていなかった。

そこで我々は、XBP1 誘導の障害によって、神経細胞ではどのような変化を生じ、これが双極性障害の病態とどのように関連するのかを明らかにするため、神経細胞における XBP1 の機能を調べた。また、更に双極性障害の病態の手がかりを得るため、XBP1 の標的遺伝子の分子カスケードについて検討を進めた。

2. 研究の目的

双極性障害は、躁状態・うつ状態という病相の反復により社会生活の障害を来す疾患で、病相反復に伴って再発間隔が短縮する特徴がある。

近年社会問題となっているうつ病のうち、2~3 割は双極性であると指摘されているが、双極性うつ病では、抗うつ薬が無効であるばかりか、悪化させる可能性も指摘されており、気分安定薬の需要が高まっている。しかしながら、気分安定薬として最も確立しているリチウムは、副作用が強く、中毒域と安全域が近接しているため、血中濃度測定を行いながら慎重に使用する必要があるなど、使いにくい薬剤である。また、その効果は十分ではなく、対症療法にとどまっている。そのため、より根本的な作用を有し、安全性の高い、新たな気分安定薬の開発が期待される。

しかしながら、双極性障害の原因が解明されておらず、確立した動物モデルも存在しないため、新たな気分安定薬の開発研究は困難であった。

本研究の目的は、双極性障害の新たな治療法開発のため、双極性障害の病態を解明することである。

3. 研究の方法

1) 初代培養神経細胞における XBP1 の標的遺伝子

初代培養神経細胞における XBP1 の標的遺伝子を明らかにするため、XBP1 ノックアウトマウスおよび野生型マウス由来初代培養神経細胞において、BDNF 刺激前後の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。

2) WFS1

XBP1 の脳内における標的遺伝子を探索するため、神経芽細胞腫細胞 (SH-SY5Y) に活性型 XBP1 を過剰発現させ、DNA マイクロアレイを用いて、遺伝子発現解析を行ったところ、標的遺伝子として WFS1 が同定された。WFS1 は、難聴、糖尿病などを伴う遺伝病、Wolfram 病の原因遺伝子である。Wolfram 病患者の家族で自殺や精神疾患による入院の率が高いことが報告されている。Wolfram 病患者では、死後脳でミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) 欠失が蓄積していることが報告されていること

から、我々が以前に報告した、双極性障害患者死後脳における mtDNA 欠失増加との関連が注目された。

我々は、双極性障害患者における磁気共鳴スペクトロスコピー所見が、mtDNA 欠失を原因とするミトコンドリア病、CPEO (慢性進行性外眼筋麻痺) に類似していることや、患者死後脳で mtDNA 欠失が検出されたことなどから、脳内の mtDNA 変異蓄積が双極性障害の病態に関与するとの「ミトコンドリア機能障害仮説」を提唱してきた。CPEO は、眼瞼下垂、眼球運動障害などを呈するまれな遺伝病であり、骨格筋に mtDNA 欠失が蓄積することがその原因と考えられてきたが、症状の一つとして気分障害を呈する場合がある。こうした患者では脳にも mtDNA 欠失が蓄積していたと報告されている。CPEO の原因遺伝子の 1 つは mtDNA 合成酵素、ポリメラーゼ γ (POLG) である。

そこで我々は、Polg と WFS1 の相互作用を調べるため、POLG 変異を神経細胞特異的に発現させることにより脳内に mtDNA 欠失を蓄積させたトランスジェニック (Tg) マウス (CAMKII α -mPolg) と、Wfs1 ノックアウトマウスを掛けあわせ、検討を行った

3) Polg

また、変異 Polg Tg マウスの双極性障害モデルマウスとしての妥当性を更に検証するため、長期間の行動量測定を行った。

更に、変異 Polg トランスジェニックマウスにおいて、こうした行動変化を引き起こしている原因脳部位を探索するため、マウスの脳切片をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により小片に細断し、各小片の DNA を用いて、定量的 PCR 法により、mtDNA 欠失量を定量する、定量的 mtDNA 欠失マッピング法 (quantitative Mapping of Deleted Mitochondrial DNA [qMDMD]) を開発した。

この方法により、変異 Polg Tg マウスにおいて mtDNA 欠失をマッピングし、半網羅的に検討した。

4. 研究成果

1) 初代培養神経細胞における XBP1 の標的遺伝子

初代培養神経細胞における XBP1 の標的遺伝子を明らかにするため、XBP1 ノックアウトマウス由来初代培養神経細胞において、BDNF 刺激前後の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行ったところ、XBP1 ノックアウトマウス由来神経細胞では、BDNF (脳由来神経栄養因子) による GABA ニューロンマーカー (ニューロペプチド Y [Npy]、ソマトスタチン [Sst]、カルビンディン [Calb1]) の発現増加反応が減弱していた。

XBP1 は、BDNF 刺激に伴う神経突起での蛋白合成促進による小胞体ストレスによりスプライスされて局所で翻訳され、核移行して転写因子として機能するが、その結果、おそらくは GABA ニューロンへと神経細胞を分化させる可能性が示唆された。

2) WFS1

Wfs1 ノックアウトマウスを用いて詳細な行動解析を行ったところ、情動関連行動試験で行動が遅いなど、気分障害の症状と類似した行動変化を見出した。

変異 Polg トランスジェニックマウスでは、光マスキング効果（暗期の光照射による行動量低下）の減弱が見られた。Polg と WFS1 のダブル変異マウスでは、変異 Polg Tg マウスで見られた光マスキング効果の異常がより顕著に見られ、両変異の相乗効果により行動異常が悪化したと考えられた。ダブル変異マウスで、海馬における mtDNA 欠失蓄積を調べたところ、変異 Polg Tg マウスと差はなかった。しかしながら、双極性障害の原因脳部位は未だ不明であり、原因脳部位での欠失蓄積を検討する必要があると考えられた。そのためには、mtDNA 変異蓄積により双極性障害様の表現型を引き起こしている脳部位を明らかにする必要があると考えられた。

3) Polg

変異 Polg Tg マウスでは、2 週間程度続く輪回し行動量の低下を示す個体が多いことが判明した。

この 2 週間程度続く行動量低下が、ヒトにおけるうつ病エピソードに対応するかどうかを検討するため、うつ病の中核症状の一つであるアンヘドニア（喜びの喪失）を反映するとされている、ショ糖嗜好性試験による予備的な検討を行った。

輪回し装置付きのケージに、0.75%ショ糖水溶液と水のボトルを設置し、飲水量を毎日測定した。変異 Polg Tg マウス 15 匹について、1 ヶ月間毎日測定を行ったところ、うち 3 匹でおおよそ 2 週間の輪回し行動量低下が見られた。この間のショ糖嗜好性を調べたところ、予想に反し、行動量が低下している期間に、ショ糖嗜好性はむしろ高まる傾向が見られた。

ラットでは、慢性軽度ストレス後、ショ糖嗜好性が低下し、これが抗うつ薬投与により改善することから、この試験はうつ病モデルとして抗うつ薬の効果検定にも用いられている。

一方、双極性障害によるうつ状態は、ストレスにより誘発されるとは限らず、抗うつ薬も有効でなくむしろ症状を悪化させる可能性が指摘されている。

今回の予備的な結果は、うつ状態に興味・喜びの喪失が見られることと逆方向に見えるが、双極性うつ病では、過食あるいは炭水化物飢餓と呼ばれる非定型症状が見られる場合も少なくなく、今回の結果は双極性障害におけるこうした症状と対応している可能性も考えられた。

mtDNA 欠失蓄積部位を探索したところ、視床室傍核、傍梨状核付近、そしてヒトの前部帯状回皮質に相当する部位などに、特に多く

の欠失 mtDNA を認めた。

今後、これらの脳部位における mtDNA 欠失蓄積と表現型の関係、これらの脳部位における遺伝子発現変化、および組織学的変化などについて検討を進め、最終的には双極性障害患者の死後脳で検討することにより、双極性障害に対応する病理学的変化を明らかにしたいと考えている。

考察

これらの研究から、双極性障害においては、神経細胞の脆弱性がその病態に関与している可能性が考えられた。WFS1 変異も POLG 変異も、神経変性疾患や糖尿病など、多くの疾患との関連が推定されていることから、双極性障害に特異的なものではない。POLG 変異などにより、脳内の気分調節にかかわる神経系が次第に障害され、双極性障害を発症する可能性が考えられる。

病相を繰り返すに従って再発間隔が短縮し、急速交代化すると、もはや気分安定薬は奏効しないという、双極性障害の特徴的な臨床経過は、この仮説によって説明可能となる。

双極性障害の原因を特定し、特異的診断法・治療法を開発するためには、POLG 変異により障害される神経系を特定し、双極性障害の最終共通経路となる脳病態を解明する必要があると考えられる。

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）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

1. Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ishiwata M, Ueda J, Kakiuchi C, Ishigooka J, Kato T (2010) Effect of mood stabilizers on gene expression in lymphoblastoid cells. *Journal of Neural Transmission* 117:155-164 (査読あり)
2. Kazuno A, Munakata K, Mori K, Nanko S, Kunugi H, Nakamura K, Mori N, Yamada K, Yoshikawa T, Kato N, Kato T (2009) Mitochondrial DNA haplogroup analysis in patients with bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics, Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 150B: 243-247 (査読あり)
3. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Toyota T, Yoshikawa T, Kato T (2009) Aberrant endoplasmic reticulum stress response in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 12: 33-43 (査読あり)
4. Kakiuchi C, Ishigaki S, Osowski CM, Fonseca SG, Kato T, Urano F (2009) Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One* 4: e4134 (査読あり)

5. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Kato T (2008) Attenuated BDNF-induced upregulation of GABAergic markers in neurons lacking *Xbp1*. Biochemical and Biophysical Research Communications 376: 758-763 (査読あり)
6. Kato T, Ishiwata M, Yamada K, Kasahara T, Kakiuchi C, Iwamoto K, Kawamura K, Ishihara H, Oka Y (2008) Behavioral and gene expression analyses of *Wfs1* knockout mice as a possible animal model of mood disorder. Neuroscience Research 61: 143-158 (査読あり)

[その他]

ホームページ等

<http://www.brain.riken.go.jp/labs/mdmd/topics.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 忠史 (KATO TADAFUMI)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・チームリーダー

研究者番号：30214381

研究協力者

垣内千尋、林朗子、笠原和起、窪田美恵、福家聡、岩本和也、高田篤、石渡みずほ、宮内妙子、亀谷瑞枝、磯野蒨子、小森敦子

共同研究者

理研 BSI：古市貞一

名古屋大学：鍋島俊隆、野田幸裕、毛利彰宏