

平成 22 年 3 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20700345  
 研究課題名 (和文) うつ症状を呈するヒストン脱アセチル化酵素 6 遺伝子欠損マウスの行動薬理的解析  
 研究課題名 (英文) Behavioral and pharmacological analysis of Hdac6-deficient mice

研究代表者  
 深田 斉秀 (FUKADA MASAHIDE)  
 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・研究員  
 研究者番号：80414019

研究成果の概要 (和文)：精神疾患様の行動異常を呈するヒストン脱アセチル化酵素 6 遺伝子欠損マウスの行動薬理的解析を実施し、本マウスが呈する異常行動の 1 つである活動量亢進の原因が、過剰なドーパミン神経伝達によって生じることを明らかにした。また、本マウスの神経細胞、特にドーパミンシナプスにおいて、複数のタンパク質の異常なアセチル化亢進が観察されたことから、シナプスにおけるタンパク質の可逆的アセチル化調節がドーパミン神経伝達に関与することが判明し、その異常が精神疾患の病態形成に関与する可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：We performed behavioral and pharmacological analysis of Hdac6-KO mice, and found that increased dopamine transmission induces a hyper-mobility in Hdac6-KO mice. Taken together with the hyper-acetylation of proteins in dopamine-enriched synaptosome fraction derived from Hdac6-KO mice, our results suggest that enhanced acetylation of HDAC6 substrates in dopaminergic neurons give rise to an increased dopamine transmission, leading to behavioral abnormalities in Hdac6-KO mice. Our findings also suggested that reversible acetylation mediated by HDAC6 associates with psychiatric disorders, and raise the possibility that HDAC6 itself and/or its substrates become new therapeutic targets for mood disorders such as anxiety and depression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療、アセチル化

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初から、年間 3 万件を超える自殺原因のトップはうつ病であり、その罹患率

の高さや社会に与える被害の甚大さから、有効な医療へと繋がる、うつ病の病態理解が求められていた。しかしながら、うつ病等の気

分障害を含むほとんどの精神疾患において、その病態は分子レベルで理解されるには至っていなかった。そのような中で、私たちはヒストン脱アセチル化酵素6遺伝子欠損マウス(以下 Hdac6KO マウス)が情動障害様行動を示すことを見出した。HDAC6 は、 $\alpha$  チューブリンの脱アセチル化を触媒する細胞質性の脱アセチル化酵素であることが判明していたものの、脳における生理機能は不明であった。私たちは、HDAC6 が脳に発現していること、特に情動行動に関わる領域で強く発現していることを明らかにしつつあり、神経細胞における HDAC6 及び HDAC6 を介したタンパク質の可逆的アセチル化調節が動物の情動行動の発現に関与する可能性を見出していた。これまでに精神疾患の病態形成におけるタンパク質可逆的アセチル化調節の関与は報告されていないことから、本マウスの詳細な解析から、情動障害を伴う精神疾患の病態に関して、新たな知見が得られることが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、Hdac6 遺伝子欠損マウスが呈する情動障害様行動異常の原因を究明することにより、(1)動物の情動行動の発現におけるタンパク質の可逆的アセチル化調節の関与を示し、(2)情動障害を伴う精神疾患の病態形成に、HDAC6 もしくは、タンパク質可逆的アセチル化調節が関与する可能性を示すこと、を目的とした。また、神経細胞におけるタンパク質可逆的アセチル化調節の生理的役割を見出すことも目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)免疫組織化学、生化学的解析

#### ①用いた抗体、実験動物

HDAC6 に対する個体は、ヒト脳組織切片に対しては、HDAC6:H-300 (SantaCruz technology) を、マウス脳抽出サンプル及び脳組織切片に対しては、マウス HDAC6 の C 末端領域を抗原としてウサギに免疫して作製したものをを用いた。その他には、抗  $\alpha$  チューブリン抗体 (CLT9002: CEDARLANE)、抗アセチル化リジン抗体 (#9441, #9681: Cell signaling)、抗アクチン抗体 (ACTN05: Thermo) をを用いた。

#### ②HDAC6 の発現解析、シナプトソーム画分のタンパク質アセチル化レベルの解析

マウス及びヒト脳における HDAC6 発現領域の検討は免疫組織化学染色により実施した。同様にマウス海馬及び大脳皮質由来の初代培養神経細胞(培養5日目と18日目)における HDAC6 の細胞内局在を検討し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000: OLYMPUS) にて観察を行った。ドーパミンに富んだシナプトソーム画分の抽出は Dunkley らの方法 (Dunkley et al,

Nature protocols 2008) に従って行い、タンパク質発現量やアセチル化レベルの検討等の定量的な解析はウエスタンブロッティング法で実施した。

### (2)マウス行動解析

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所、動物実験施設内の行動実験室(温湿度管理、静音、照明100ルクス)にて実施した。実験はWEBカメラとコンピューターによって撮影し、ビデオトラッキングシステム (Any-maze: Stoelting) もしくは、観察者による計測により解析を行った。後述する①から③の行動テストは、12週齢以上のオスマウスを用いて①から③の順序で、各テストの間は最低8週間あけて実施した。④の行動薬理学実験は、①から③のテストを経ずに行った。

#### ①オープンフィールド試験

40 x 40 x 20 (高さ) cm の白色木製箱中 (図1) にマウスを放し、上方に設置したカメラにて10分間撮影した。マウスの移動距離、中央領域(正方形9区画の中央)の滞在時間を計測した。



図1

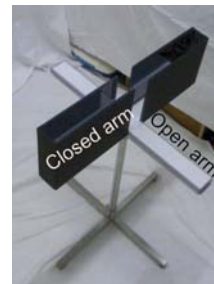


図2

#### ②高架式十字迷路試験

床から50cmの高さに設置した十字迷路(交叉する一方のみ不透明な壁で覆われている: closed arm、図2)の中央にマウスを設置し、上方のカメラで10分間撮影した。マウスの移動距離、open arm への侵入回数、滞在時間を計測した。

#### ③尾懸垂試験

マウスの尾先端から1cmの位置を尾懸垂用クリップ(山下技研)にて固定し、宙づりにして、6分間側面からカメラで撮影した(図3)。不動時間(2秒以上連続して動作が見られない時間)を測定した。



図3

#### ④行動薬理学実験(尾懸垂試験)

薬剤はすべて生理食塩水に溶解し、尾懸垂試験開始 30 分前に、腹腔に 10ml/kg となるように投与した。用いた薬剤、Imipramine hydrochloride (25mg/kg), Fluoxetine hydrochloride (30mg/kg), Desipramine hydrochloride (20mg/kg) (いずれも Sigma)、Haloperidol hydrochloride (0.5mg/kg, Tocris)の有効投与濃度は、Cryanらの報告(Cryan JF, et al, Neuroscience and biobehavioral reviews 2005)に従った。

#### 4. 研究成果

Hdac6KO マウスの情動障害様行動異常の発見からスタートした本研究は、その後(1)HDAC6 の発現解析、(2)Hdac6KO マウスの行動薬理的解析、を経て(3)生化学的解析へと展開した。ここでは、本研究で行われた実験の結果とそこから得られた成果を順に記述する。

##### (1)HDAC6 の発現解析

ヒト及びマウス脳における HDAC6 の発現領域を免疫組織化学染色により検討したところ、ヒト胎児脳組織標本では、縫線核、黒質、青斑核の神経細胞に強いシグナルが観察された。マウス成体脳を用いた解析でもほぼ同様であったが、マウスにおいては特に背側縫線核(DRN)の神経細胞において HDAC6 の強い発現が観察された(図 4A)。

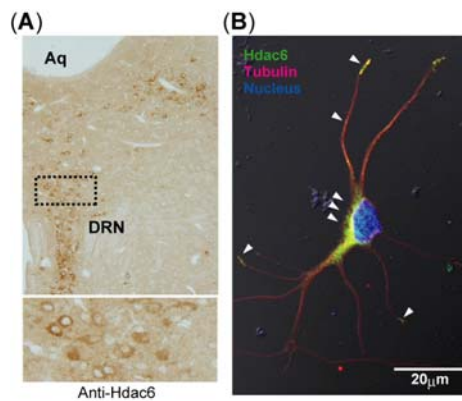


図 4 HDAC6 の発現解析

背側縫線核、黒質、青斑核は、脳幹の中脳に位置し、それぞれ、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン作動性神経細胞の集まった神経核である。これらはそれぞれの神経系の起始核であり、脳の広範な領域に投射し、さまざまな生理機能の調節に参与している。特に、動物の情動行動の発現にはモノアミン神経伝達物質の関与がよく知られており、HDAC6 がモノアミン神経系に強く発現していることは、Hdac6KO マウスで情動行動に異常が観察されたことと併せて、モノアミン神経系の機能に、HDAC6 もしくは HDAC6 を介したタンパク質の可逆的アセチル化調節が重要

な役割を果たすことを強く示唆するものである。

また、成体において神経新生の行われている脳領域の1つである、海馬歯状回の顆粒細胞層下層のごく一部の神経細胞で、HDAC6 の強い発現が観察された。この生理的意義については不明であるが、うつ病の病因のひとつとして、神経新生の低下が指摘されていること、一部の抗うつ薬に神経新生を亢進する作用があることが近年報告されたことから、後述する Hdac6KO マウスが示す抗うつ傾向との関連が興味深い。

一方、マウス胎仔脳由来の培養神経細胞においては、HDAC6 は、核周囲の細胞質に強い発現が認められ、神経突起内部では顆粒状に染色された(図 4B)。HDAC6 は上皮系培養細胞において、ダイニンモーターと結合して微小管レール上を移動することが知られていることから、神経突起内部における HDAC6 染色像は、神経細胞においても HDAC6 が神経突起(軸索を含む)内を輸送されることを強く示唆している。また、培養5日目に観察された、HDAC6 の神経突起先端部への濃縮(図 4B)は、チューブリン脱アセチル化を介した軸索ナビゲーションへの関与に加え、軸索先端部の成長円錐が将来シナプスを形成し神経伝達物質を放出する前シナプスとなることから、HDAC6 及びタンパク質の可逆的アセチル化調節が前シナプス機能において何らかの役割を果たすことを示唆している。

##### (2)Hdac6KO マウスの行動薬理的解析

Hdac6KO マウスの脳における機能異常を明らかにする目的で、①オープンフィールド試験、②高架式十字迷路試験、③尾懸垂試験を実施した。次に、Hdac6KO マウスで異常の生じている脳領域、神経系を同定するために、④行動薬理学実験を実施した。まず、①から③の結果と解釈を順に示した後、④について述べる。

###### ①オープンフィールド試験

Hdac6KO マウスでは野生型と比較して、有意な活動量の亢進が観察された(図 5A:総移動距離)。オープンフィールド中央領域への滞在時間(図 5B:その短さが不安レベルの大きさとして評価される)には、有意差は認められなかった。

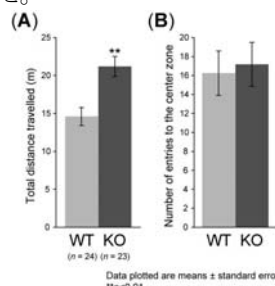


図 5 オープンフィールド試験

## ②高架式十字迷路試験

Hdac6KO マウスでは野生型と比較して、オープンアームへの侵入回数(図 6A)、滞在時間(図 6B)がいずれも有意に亢進していた。これらは不安レベルの低下を意味している。総移動距離に有意差は認められなかった(図 6C)。

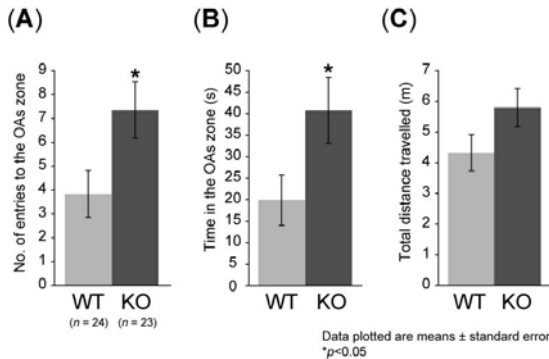


図 6 高架式十字迷路試験

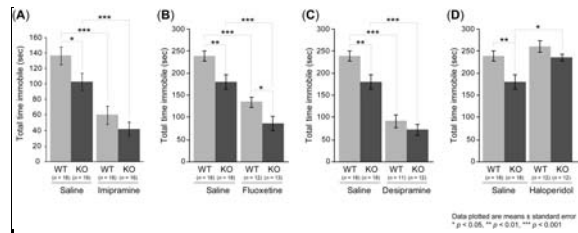
## ③尾懸垂試験

Hdac6KO マウスでは野生型と比較して、不動時間(グラフ縦軸)の減少が観察された(図 7A-D, saline)。この試験では、抗うつ薬投与後に不動時間が減少することから、一般的に不動時間の長さが“うつ傾向”として評価される。これに則ると、Hdac6KO マウスは抗うつ傾向である。

## ④行動薬理学実験

次に、Hdac6KO マウスで異常の観察された行動テストの 1 つである尾懸垂試験を用いて、抗うつ薬、抗精神病薬が行動に与える影響を野生型マウスと Hdac6KO マウスで比較検討し、用いた薬剤の作用機序との関係から Hdac6KO マウスで異常の生じている脳領域、関与する神経伝達物質の同定を試みた。抗うつ薬としては、セロトニンとノルアドレナリントランスポーターの阻害剤であるイミプラミン(図 7A)、セロトニントランスポーターの選択的阻害剤であるフロキセチン(図 7B)、ノルアドレナリントランスポーターの選択的阻害剤であるデシプラミン(図 7C)の効果を検討したところ、これらはいずれも野生型、Hdac6KO マウスの不動時間を同程度減少させた(図 7A-C)。続いて、抗精神病薬であるハロペリドールの効果を検討したところ、Hdac6KO マウスで観察された不動時間の減少が消失した(図 7D)。ハロペリドールはドーパミン D2 受容体の遮断薬であること、用いた 0.5mg/kg 量のハロペリドール投与は野生型マウスの不動時間の長さには影響を与えなかった(図 7D)ことから、Hdac6KO マウスでは過剰なドーパミン伝達が生じており、それがハロペリドールによって遮断されたと推察された。

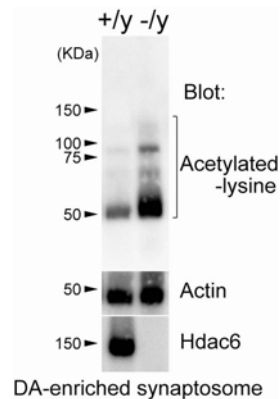
図 7 尾懸垂試験(行動薬理学実験)



## (3)生化学的解析

野生型及び Hdac6KO マウス脳からドーパミンを多く含むシナプトソーム画分を抽出し、そこに含まれるタンパク質のアセチル化レベルを検討したところ、Hdac6KO マウスで複数のタンパク質のアセチル化が顕著に亢進していた(図 8)。また HDAC6 がドーパミンシナプトソーム画分に濃縮されることも判明した(図 8)。これらの結果と併せて、ドーパミン D2 受容体の遮断薬が Hdac6KO マウスの行動異常を消失させたことから、HDAC6 によるドーパミンシナプスにおけるタンパク質の脱アセチル化がドーパミンシナプス機能に関与することが強く示唆された。

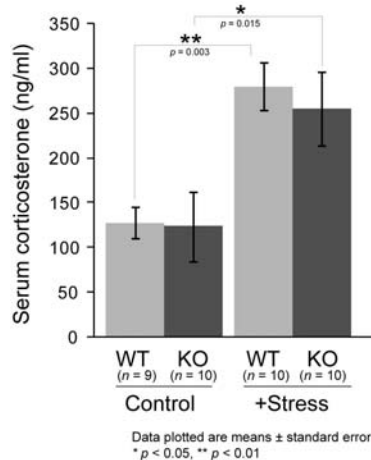
図 8 タンパク質アセチル化解析



うつ病の病態形成には、抗うつ薬の作用機序やうつ病患者死後脳の解析等から、セロトニン神経伝達効率の低下、海馬歯状回における神経新生の低下、視床下部-下垂体-副腎皮質系(HPA-axis)の活動異常の関与が示されており、これらの現象と HDAC6 及びタンパク質の可逆的アセチル化調節の関連も想定される。特に、HPA-axis に関しては、コルチゾール受容体の 1 つであるグルココルチコイド受容体(GR)が、HDAC6 の基質分子である HSP90 のクライアントタンパク質であり、且つ HSP90 の脱アセチル化によって、GR のコルチゾール結合能が調節されることから、Hdac6KO マウスでは、HPA-axis に異常が生じている可能性が想定された。そこで、Hdac6KO マウスの HPA-axis の活動、ストレス応答性に異常が生じていないかを検討した。平常時及びストレス負荷直後の血中のコルチコステロン濃度を、Assay max 社製の ELISA kit により測定したところ、Hdac6KO マウスと野生型で有意な差は認められなかった(図 9)。

このことから、Hdac6KO マウスで観察された行動異常は、ストレス応答性の異常に起因するものではないと考えられる。

図9 ストレス応答性試験



#### (4)まとめ

Hdac6KO マウスの行動解析に関して、尾懸垂試験で観察された抗うつ傾向(不動時間の減少)は、マウスの行動としては活動量の亢進である。また高架式十字迷路試験で観察された、不安の減退として評価されるオープンアームへの侵入回数・滞在時間の増加に関しては、オープンフィールド試験で不安の減退が観察されなかったことから、活動量亢進の結果と考えられる。このように各行動テストによりその評価は異なるものの、Hdac6KO マウスで観察された行動異常は、総じて活動量の亢進と見なすことが可能である。そして、その原因は、生化学的解析から、Hdac6KO マウスのストレス応答異常ではなく、ドーパミンシナプスにおける複数の分子のアセチル化亢進によって、ドーパミン D2 受容体シグナルが過剰に活性化されているためと推察された。また HDAC6 のヒト及びマウス脳における局在、培養神経細胞における HDAC6 の局在も、HDAC6 及び HDAC6 を介したタンパク質の可逆的アセチル化調節が、神経細胞の突起進展、前シナプスの形成や機能、例えば神経伝達物質の放出等、に関与することを支持するものであった。本研究は、シナプスにおけるタンパク質の可逆的アセチル化調節がドーパミン神経伝達に関与すること、さらに情動行動の発現に影響することを初めて明らかにしたものである。本研究成果によって、将来的には、「シナプスタンパク質のアセチル化調節」が情動障害を伴う精神疾患の治療戦略の1つへと発展することも期待される。

#### 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)

[学会発表] (計4件)

①第83回日本薬理学会年会 2010.3.17 大阪国際会議場

Hdac6 遺伝子欠損マウスは情動障害様行動異常を呈する

深田 齊秀、花井 敦子、竹島 京子、中山 敦雄、川口 禎晴

②第32回日本神経科学学会年会 2009.9.18 名古屋国際会議場

Hdac6 遺伝子欠損マウスは情動障害様行動異常を示す

深田 齊秀、花井 敦子、竹島 京子、中山 敦雄、川口 禎晴

③第31回日本分子生物学会年会 BMB2008 2008.12.11 神戸ポートアイランド

不安様行動を呈する Hdac6 遺伝子欠損マウスの解析

深田 齊秀、花井 敦子、竹島 京子、中山 敦雄、川口 禎晴

④第31回日本神経科学学会年会 2008.7.10 東京国際フォーラム

Hdac6 遺伝子欠損マウスは不安様行動異常を示す

深田 齊秀、竹島 京子、正木 茂夫、青木 英子、中山 敦雄、川口 禎晴

[その他]

ホームページ等

<http://www.inst-hsc.jp/d-embryology/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

深田 齊秀 (FUKADA MASAHIDE)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・研究員

研究者番号：80414019