

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07960

研究課題名(和文) マウスうつ様行動はヒトうつ病と同じ神経活動基盤を持つか？

研究課題名(英文) Neural homology of major depressive disorder between human and mouse

研究代表者

大橋 一徳 (O'HASHI, Kazunori)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：90617458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：「マウスうつ様行動はヒトうつ病と同じ神経活動基盤を持つか？」という疑問に答えるため、ヒトうつ病のバイオマーカーである安静時前頭葉膝下前部帯状回(25野)の過活動に対応する神経活動がうつモデルマウスの自発活動時に存在するか検証した。その結果、ストレス性、炎症性うつモデルいずれのモデルマウスにおいても、ヒト25野相同領域である内側前頭前野(mPFC)下辺縁皮質(IL)において自発活動の増加が見られた。これらの結果はヒトうつ病患者とうつモデルマウスの前頭葉神経活動に対応関係があることを示しており、うつ病にヒト、マウスに共通した神経活動基盤が存在する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

あらゆる疾患モデルにおいて病態の生物学的基盤の再現は不可欠である。しかしながら、うつ病研究はモデル動物と患者に共通した生物学的基盤が存在しない状態で進められ、基礎と臨床を繋ぐ根幹が欠けた不完全な状態にある。本研究成果はうつ病患者とうつマウスの脳活動が同じ神経活動基盤を有しており、うつモデルマウスに神経活動に基づく構成的妥当性を付与できる可能性を示している。本研究の発展は社会生活を損なう疾患として世界的な問題となっているうつ病のトランスレーショナルリサーチを推進し、病態に基づいた診断、治療を開発する根拠となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Do mice with specific behavioral features of depression share the same neural substrates as human patients? By comparing pre-depression and depression-like states using calcium imaging, we found that stress- and inflammation-induced depressed mice showed increased spontaneous neural activity in the infralimbic cortex (IL), the mouse equivalent of the brain area where patients show abnormalities, compared to other brain areas. This finding suggests that there is a potential for shared pathological mechanisms between humans and mice and supports the validity of using animal models to study depression.

研究分野：神経科学

キーワード：ストレス うつ イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

社会生活を損なう疾患としてうつ病の増加が世界的に問題となっている。うつ病の有無は「DMS診断基準」が定める特有症状の有無で診断されるが、症状の原因を臨床的に特定することはできない。また、薬物療法で使用される抗うつ薬も直接の原因ではなく症状を軽減するために開発されているため、患者の約3割は症状が改善されないといわれている。症状の原因に基づいた診断、治療は問題解決に向けた喫緊の課題であるが、うつ病態は不明点が多く未だ原因は特定されていない。しかし、近年ヒト臨床研究において、大規模安静時fMRIデータの機械学習によってうつ病は4種に分けられ、そのすべてに共通する脳活動が存在することが明らかにされた。この活動は治療方法に関わらず症状の緩和と共に消失することから、病態を反映するうつ病診断のバイオマーカーとして期待されている。一方、モデル動物を用いたうつ病態の基礎研究は進んでおり、発症原因からうつ様行動に至る一連の過程を包括的に説明する原因として血液脳関門の破綻や慢性炎症が提唱されている。しかし、ヒトうつ病の診断が生物学的指標ではなく問診で行われている現在、たとえモデル動物がうつ様行動を示し、疾患に対する表面妥当性、予測妥当性を満たしていても、構成的妥当性を欠いているため「動物は本当にうつ病なのか」「うつ病患者も同じ発生機序を有していると思わせるのか」という疾患モデルとしての根本的な疑念は常に存在する。うつ病の解明にはヒトうつ病の生物学的病態を正確に反映したモデル動物が不可欠であり、特に臨床サイドはこの要請が強い。今後、基礎研究で得られた知見を治療法開発につなげるトランスレーショナルリサーチに移行するためにはうつ病状態の根拠となる構成的妥当性を動物モデルが満たしていることを示す必要がある。

## 2. 研究の目的

現在のうつモデルマウスは、疾患に対する構成的妥当性を満たしていない。つまり、うつ研究はモデル動物と患者に共通した生物学的基盤が存在しない状態で進められ、基礎と臨床を繋ぐ根幹が欠けた不完全な状態にある。モデルが構成的妥当性を満たせない理由は、うつ病の原因が未だ特定されておらず、モデルに病態の生物学的基盤を再現しようがない点にある。ヒトうつ病に関して現時点で最も有望なバイオマーカーは脳活動である。そこで本研究では、うつ病の根拠となる構成的妥当性をモデル動物に付与するため、うつを特徴づける病態として異常な脳活動を仮定し、同時にヒトと動物の脳は大きく異なっているが、進化的側面において相同性があり基本的に同じ構造、機能を持っている点に着目した。実際、両者は脳機能地図の配置や情報の処理経路において対応関係を持っている。すなわち、本研究の目的はマウスのうつ様行動がヒトうつ病と同じ神経活動基盤を持つか検証することである。

## 3. 研究の方法

### 1) 実験動物:

蛍光  $Ca^{2+}$  センサー-G-CaMP7 を大脳皮質の興奮性神経細胞の一部とアストロサイトに発現した遺伝子組み換えマウス(G7NG817 1月齢以上)を使用した。

### 2) 慢性イメージング用プリズム埋込:

ペントバルビタルナトリウム麻酔(40-90 mg/kg, i.p.)で、頭蓋骨、および硬膜を除去後、大脳縦裂に内側前頭前野(mPFC)全域をカバーするマイクロプリズムを挿入し歯科用レジンで固定した。

### 3) 広域カルシウムイメージング:

イソフルラン麻酔下(1.0-1.5%)において、プリズムを通して励起光(LED470-WCCT, 470 nm)mPFCに照射し、G-CaMP7からの蛍光をCMOSカメラ(ORCA-Flash 4.0 V3)で計測した(60Hz)。

4) 二光子励起カルシウムイメージング:

イソフルラン麻酔下(1.0-1.5%)において、二光子励起レーザー顕微鏡(FV1000-MPE)を用いて細胞形態、および神経活動に伴うカルシウム変動を計測した。光源はモードロック Ti:Sapphire レーザー (MaiTai HP DeepSee)、励起波長は 940nm、水浸対物レンズ(XLPLN 10x SVMP, NA0.6)を使用した。

5) ストレス性うつ病モデル:

拘束用袋(デカピコーン)でマウスを1日6時間拘束し、それを2日間連続で行うことで慢性拘束によるストレス性うつ状態を実現した。

6) 炎症性うつ病モデル:

リポ多糖(LPS, 1mg/kg, i.p.)を投与することで全身炎症を惹起し炎症性うつ状態を実現した。

7) 強制水泳試験:

24-25°Cの水を満たしたプラスチック製大型シリンダーにマウスを投入し、投入開始から10分間の間で無動であった時間を計測した。

8) ストレス評価:

慢性拘束ストレス負荷後、副腎、胸腺を摘出し重量を測った。

#### 4. 研究成果

うつ病患者は健常者と比べて前頭葉膝下前部帯状回(25野)の過活動を示すことが、ヒト安静時 fMRI によって明らかにされている。本研究ではこの25野過活動に対応する神経活動がうつモデルマウスの自発活動時においても観測されるかを検証した。

1) 自発活動イメージングを用いたマウスmPFCサブ領域の同定

ヒト25野はマウスにおけるmPFC下辺縁皮質(IL)に相当しているが、左右脳に挟まれた深部に位置するため、通常の方法でイメージングすることはできない。そこで、大脳縦裂にマイクロプリズムを挿入し、プリズムを介してmPFC全域の自発活動イメージングを試みた。その結果、mPFC自発活動は一様ではなく局所的にパターン化した活動を示すことが明らかとなった。また、プリズム挿入は皮質神経細胞に対して大きなダメージを与えないことを二光子イメージングで確認した。

一般的に自発活動は皮質コラム構造のような特定の機能を実現する神経細胞集団や脳領野構造を反映した活動を繰り返し呈示することが知られている。この性質を利用してmPFCの領野分けを行うため、階層クラスタリングを計測した自発活動パターンに適用したところ、解剖学的に知られているmPFCサブ領域である前帯状皮質(AC) 前辺縁皮質(PL)、およびILに類似したパターンを抽出することができた。このパターンはニッスル染色による細胞構築から同定したmPFCサブ領域とよく一致しており、自発活動をクラスタリングすることでmPFCが持つ3つのサブ領域を同定することが可能となった。

2) 正常マウスmPFCサブ領域の自発活動

健常ヒトと正常マウスの自発活動の対応関係を調べるため、次にマウスmPFC各領域における自発活動強度を解析した。ヒト25野の過活動は有望なうつ病バイオマーカーと目されている一方、健常者25野は前部帯状回(24, 32野)と比べて自発活動が低いことが報告されている。そのため、マウスにおけるヒト24, 32野相同領野であるAC, PLと比べてILの自発活動が低いことを予測したが、自発活動強度に有意な差は見られなかった。他方、他領域間の自発活動はヒトとマウスで一致しており、正常マウスmPFCとヒト健常者前頭葉自発活動が概ね対応関係を持つことが明らかになった。

### 3) ストレス性うつ病モデルマウスmPFCサブ領域の自発活動

「マウスのうつ様行動がヒトうつ病と同じ神経活動基盤を持つか」という疑問に答えるため、うつモデルマウスの作成を行なった。慢性ストレスはうつ病を発症させる原因の一つとして考えられていることから、マウスに1日6時間の拘束ストレスを21日間負荷し、ストレス状態およびうつ様行動の有無を判定した。その結果、慢性ストレス負荷は副腎の肥大、胸腺の萎縮を引き起こし、強制水泳試験時、正常マウスと比べて有意に無動時間を増加させることが明らかとなった。この結果は拘束ストレスはマウスをストレス状態にし、この状態が21日間続くとストレス性うつを発症させることを示している。一方、1週間または2週間の拘束ストレスは、副腎肥大と胸腺萎縮を引き起こすが、うつ様行動は引き起こさなかった。次に、うつ様行動を示したマウスのmPFC各領域における自発活動強度を計測したところ、うつマウスILはストレス前後、および正常マウスILと比べて有意に高い自発活動を示すことがわかった。一方、ACおよびPLではストレス前後、正常マウスとの比較で有意な差を示さなかった。

### 4) 炎症性うつ病モデルマウスmPFCサブ領域の自発活動

ヒトうつ病は4種に分けられ、そのすべてにおいて25野の過活動が存在すると報告されている。ヒトとマウスが共通のうつ病神経基盤を有しているならば、ILの過活動は異なる原因で発症したうつ病であってもうつ特有の神経活動としてうつマウスから計測される蓋然性は高い。そこで、LPSを投与することで全身性炎症を引き起こし、炎症性うつモデルマウスを作成した。うつ状態の有無は強制水泳試験で判定し、LPS投与マウスは正常マウスと比べて有意に無動時間を増加させた。また、mPFC各領域における自発活動強度を計測したところ、ストレス性うつ病マウスモデルと同様、炎症性うつマウスILはLPS投与前後、および正常マウスILと比べて有意に高い自発活動を示すと同時に、他領域では投与前後、正常マウスとの比較で有意な差を示さなかった。

以上の実験結果は、うつ病モデルマウスにおけるILの高い自発活動はうつ病患者が示す25野の過活動とうまく対応しており、ヒト-マウスに共通した神経科学的基盤がうつ病に存在する可能性を示唆している。

## 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 3件）

1. 著者名 Tanaka S, Miyashita M, Wakabayashi N, O'Hashi K, Tani T, Ribot J	4. 巻 14
2. 論文標題 Development and Reorganization of Orientation Representation in the Cat Visual Cortex: Experience-Dependent Synaptic Rewiring in Early Life.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroinformatics	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fninf.2020.00041	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 Horinuki E, O'Hashi K, Kobayashi M	4. 巻 100
2. 論文標題 In Vivo Ca2+ Imaging of the Insular Cortex during Experimental Tooth Movement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dent Res	6. 最初と最後の頁 276-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520962465.	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 -
1. 著者名 Kobayashi S, O'Hashi K, Kaneko K, Kobayashi S, Ogisawa S, Tonogi M, Fujita S, Kobayashi M	4. 巻 64
2. 論文標題 A new phenotype identification method with the fluorescent expression in cross-sectioned tails in Thy1-GCaMP6s transgenic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 156-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnugd.21-0528	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 Matsuno H, Tsuchimine S, O'Hashi K, Sakai K, Hattori K, Hidese S, Nakajima S, Chiba S, Yoshimura A, Fukuzato N, Kando M, Tatsumi M, Ogawa S, Ichinohe N, Kunugi H, Sohya K	4. 巻 27
2. 論文標題 Association between vascular endothelial growth factor-mediated blood-brain barrier dysfunction and stress-induced depression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Psychiatry	6. 最初と最後の頁 3822-3832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-022-01618-3	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 -

1. 著者名 Kobayashi S, O'Hashi K, Kobayashi M	4. 巻 12
2. 論文標題 Repetitive nociceptive stimulation increases spontaneous neural activation similar to nociception-induced activity in mouse insular cortex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19562-1	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 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kazunori Ohashi, Kazuhiro Sohya, Hitomi Matsuno, Shoko Tsuchimine, Hiroshi Kunugi
2. 発表標題 Neural homology of major depressive disorder between human and mouse
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------