

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500328

研究課題名（和文）構造的可塑性仮説に基づくうつ病の発症・治療機序についての基礎研究

研究課題名（英文）Research on the structural plasticity and pathogenesis of depressive disorders

研究代表者

神野 尚三（JINNO SHOZO）

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10325524

研究成果の概要（和文）：神経回路網を構成するニューロン・グリア群の構造的可塑性に関する神経科学的研究を進め、以下の成果を得た。(1) 海馬神経新生は、うつ病への関与が推定される腹側海馬の方が背側海馬よりも加齢により有意に減少することを発見した。(2) 海馬アストロサイトの空間分布密度は、認知への関与が示唆される背側アンモン角の網状分子層で加齢により有意に増加することを明らかにした。(3) 軸索切断モデルを用いてニューロン・グリア連関に関する研究を行い、ミクログリアではなくアストロサイトが神経細胞保護に関わっている可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：We carried out the neuroscience research on the morphological plasticity of neurons and glial cells constituting neuronal network, and obtained the following outcomes. (1) Adult neurogenesis in the dentate gyrus declined more severely in the ventral hippocampus than in the dorsal hippocampus. (2) Numerical densities of astrocytes increased in the stratum lacunosum-moleculare in the ventral hippocampus but not in the dorsal hippocampus with aging. (3) In the axotomy model, astrocytic, but not microglial, reaction may primarily mediate some anti-apoptotic effects through synaptic stripping.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,020,000	4,620,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網、構造的可塑性、ステレオロジー、うつ病

1. 研究開始当初の背景

うつ病は統合失調症と並んで代表的な精神疾患であり、抑うつ気分、喜びや好奇心の喪失、不安・焦燥感、活力の低下などを主徴とする気分障害の一種である。国際的な研究により、有病率が約 3%、生涯罹患率が 15～20% と高いことが明らかにされ、WHO では、2020 年までにはうつ病の医療負担額が全疾患中第 2 位になると予測している。

近年、うつ病などの精神疾患の発症・治療機序に神経可塑性が関与している可能性に

注目が集まっている。神経可塑性とは、細胞内シグナリングから遺伝子発現の制御、シナプスの数や神経伝達物質放出の変容、軸索や樹状突起の形態学的変化、神経新生までを含む幅広い概念である。従来から、生物が内的・外的な環境の変化に対応し、生存するための能力が可塑性であると考えられてきた。しかし、可塑性の役割はこのようなホメオスタシスの維持にとどまらず、学習や記憶、情動や認知といった高次脳機能にも深く関与していることが徐々に明らかになっている。

現在では、精神疾患の生物学的基盤は、モノアミンや神経ペプチド、さらには遺伝子などの絶対的な変化だけにあるのではなく、シナプスやニューロン、神経回路などを主座とする可塑的な変化にあるという考えが受け入れられつつある。なかでも、神経新生と精神疾患の関連については多くの関心が集まり、海馬における神経新生がストレスを与えたモデル動物で抑制されることや、抗うつ薬や電気痙攣刺激によって神経新生が促進されることなどが報告されている。しかしながら、神経可塑性をターゲットとする精神疾患の研究はまだ始まったばかりの段階にある。

2. 研究の目的

神経科学研究の急速な発展によって、脳における分子レベルからシステムレベルまでの複雑な現象について、膨大な報告がなされている。しかしながら、それらが精神疾患の理解に十分に活かされているとは言えない。これは、精神医学と神経科学という、似て非なる二つの研究分野の融合が進んでいないことが一因と考えられる。申請者は、精神科での二年間の臨床研修の後、神経解剖学の大学院に進み、脳の機能的構造についての基礎研究を開始した。一連の研究を進める中で、自らが観察してきた脳の機能的構造は絶対不変のものではなく、さまざまな内的、外的要因によって可塑的に変化する可能性があるということに認識するようになった。さらに近年、精神疾患研究の分野において、モノアミン仮説に基づく精神薬理学的研究や、分子遺伝学的研究に加えて、神経可塑性を研究する重要性が指摘されるようになった。本課題の目的は、脳の構造的な可塑性をターゲットとする基礎研究によって、うつ病の発症・治療機序について新たな研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作成

本課題のターゲットは、うつ病の発症・治療機序における脳構造の可塑的な変化である。本課題では、うつ病発症モデル動物は、強制水泳試験、嗅球摘出などにより作成する。治療モデルマウスの作成には、各種の抗うつ薬、気分安定薬、電気痙攣刺激などを使用する。

(2) GABA ニューロン・グリア細胞のステレオロジー定量解析

申請者はこれまで、中枢神経系の構成要素の厳密な定量を目指し、海馬の GABA ニューロンやグリア細胞などを対象に、各種のステレオロジー定量解析を推進してきた。本課題では、うつ病発症・治療モデル動物における GABA ニューロンやグリア細胞のステレオロジー定量解析を推進する。さらに点過程解析を組み合わせて、空間分布様式の可塑的変

化を明らかにする。

(3) グリア・ニューロン相互作用の超微形態解析

モデル動物におけるグリア細胞とニューロンのコンタクトについて、電子顕微鏡による超微形態解析を行い、可塑的な変化を明らかにする。

(4) 広域神経回路網の解剖学的解析

脳の各領域は独立して活動しているのではない。すなわち、特定の領域における GABA ニューロンやグリア細胞の変化には、神経回路網によってリンクされる関連領域の機能的構造や活動性の変化が関与している可能性がある。このため、ステレオロジー定量解析や点過程解析、超微形態解析で何らかの変化が認められた領域について、定位脳手術によりトレーサーを微量注入し、広域的な入出力路の検索と、関連領域の同定を行い、神経回路網の構造的な変化を明らかにする。

(5) 広域神経回路網の電気生理学的解析

モデル動物で構造的な変化が認められた神経回路網について、関連領域に定位脳手術により微小電極を留置し、領域間の結合を電気生理学的に同定する。さらに、マルチユニットレコーディングにより、領域間の活動性の相関を統計的に解析する。

(6) 可塑性関連分子の網羅的検索と画像解析
神経回路網に変化が認められた領域を対象に、可塑性機能分子の発現様式の変化について、組織化学的手法による網羅的な検索を行う。当初のターゲットとしては、グルタミン酸 AMPA 受容体や、SNARE complex、電位依存性 K チャンネルなどを予定している。さらに、神経回路網の解剖学的・電気生理学的実験によって可塑的な変化が示唆される機能分子を解析に加える。微細形態や免疫反応性の定量には、コンピュータ画像解析技術を組み合わせる。

4. 研究成果

(1) 海馬神経新生の加齢変化には長軸方向による差異が存在することを解明

高齢者におけるうつ病の構造的基盤としての神経可塑性を明らかにすることを目的とし、海馬神経新生に関する研究を進めた。実験には、中年マウス (10 カ月齢) と若年マウス (2 カ月齢) を使用し、海馬の長軸・短軸による差異をステレオロジー定量解析により検討した。神経新生を定量的に評価するために、6 種類の内因性マーカー (Sox2、GFAP、S100、BLBP、DCX、PCNA) を使用し、optical disector 法に基づいて、これらのマーカーによって標識される細胞の空間分布密度を求めた。

Sox2 陽性放射状グリア細胞や、BLBP 陽性放射状グリア細胞、DCX 陽性神経前駆細胞の空間分布密度は、若年マウス、中年マウスの

どちらも背側海馬の方が腹側海馬より高かった。海馬の仮想スライスに含まれる細胞数は、放射状グリア細胞、神経前駆細胞のいずれも加齢による減少を示した。減少率は、放射状グリア細胞 (50-70%) よりも神経前駆細胞 (90-95%) の方が大きかった。興味深い結果として、放射状グリア細胞、神経前駆細胞のどちらも、腹側海馬の方が背側海馬よりも減少率が大きいことが示された。一方で、S100 陽性グリア前駆細胞の空間分布密度は、若年マウス、中年マウスのいずれも腹側海馬の方が背側海馬より高かった。S100 陽性グリア前駆細胞の空間分布には、若年マウスと中年マウスで有意な差が認められなかった。

これらの結果は、海馬神経新生の加齢による減少は、腹側海馬で背側海馬よりも先行するが、グリア新生に加齢による変化がないことを示している。近年の報告によって、背側海馬が記憶に、腹側海馬が不安関連行動に関与していることが示されていることから、本研究の結果は、高齢者に多いうつ病から初発する認知症の病態基盤を理解する上で、重要な示唆を与えるものである。

(2) 加齢による海馬アストロサイトの免疫学的多様性と空間分布様式は神経回路特異的であることを解明

近年になり、アストロサイトの多様性が、ニューロンの栄養や支持、シナプス伝達の調節などに関わっている可能性に注目が集まっている。このため、加齢に伴う記憶と情動の変化について、構造的な知見を得ることを目的に、海馬のアストロサイトの免疫学的多様性と空間分布様式に関するステレオロジー定量解析を行った。実験には、中年マウス (10 カ月齢) と若年マウス (2 カ月齢) を使用し、海馬の長軸・短軸による差異を検討した。アストロサイトの同定には、glial fibrillary acidic protein (GFAP) と S100 を用いた。さらに、近年アストロサイトへの発現が報告されている sex determining region Y-box 2 (Sox2) の海馬における発現様式を解析した。

解析の結果、海馬においては、90%以上のアストロサイトが Sox2 を発現しており、層や領域による差異は殆どないことが示された。一方で、アストロサイトにおける GFAP の発現率も多くの層で 90%を越えていたが、腹側海馬 CA3 領域の錐体細胞層では、発現率が 70%程度と低かった。S100 のアストロサイトにおける発現率も同様に、多くの層で 90%を越えていたが、腹側歯状回門では、発現率が 70%程度と低かった。Sox2、GFAP、S100 の発現率はいずれも加齢による有意な変化はほとんど認められなかった。次に我々は、加齢に伴うアストロサイトの分布様式の変化を調べた。背側アンモン角の網状分

子層で、アストロサイトの数が有意に増加していた。一方で、背側・腹側アンモン角の透明層ではアストロサイトの数が有意に減少していた。

アンモン角の網状分子層は空間記憶に関わっている嗅内野と、透明層は情動に関わる扁桃体との線維結合を有している。したがって、本研究の結果は、高齢発症うつ病や認知症の構造的基盤として、神経回路特異的なアストロサイトの空間分布密度の変化が関与している可能性を提示している。

(3) 軸索切断モデルにおけるアストロサイトとミクログリアの反応性の違いが、神経細胞死の制御に関わっていることを解明

運動神経の軸索を切断すると、ミクログリアによるシナプス入力 of 遮断 (synaptic stripping) が生じる。従来からこの現象は、神経細胞の保護・再生などに重要な役割を果たしていると考えられてきた。本年度の研究では、舌下神経切断モデルを用いて、神経細胞死とシナプス伝達、グリア細胞の活性化の関連についての解析に取り組んだ。

最初に、マウス (C57BL/6) では、軸索切断後に神経細胞死が起こるのに対して、ラット (Wistar) では細胞死は認められないことを確認した。次に、スライスパッチ記録による電気生理学的解析を行い、微小シナプス後電流の頻度がマウスよりラットの方が有意に低いことを見出した。続いて、運動神経の細胞体周囲を取り囲んでいるアストロサイトとミクログリア、シナプス前終末について、共焦点顕微鏡による超微形態解析を行った。定量的画像解析によって、シナプス部におけるアストロサイトの突起の入り込みは、マウスよりラットの方が有意に多く、ミクログリアの突起の入り込みはラットよりマウスの方が多くなることが明らかになった。また軸索切断ラットでは、シナプス外部においてもアストロサイトによる神経細胞体の取り囲みが増加していたのに対して、マウスではそのような変化は認められないことが示された。

これらから、先行研究とは異なり、ミクログリアではなく、アストロサイトによるシナプス入力 of 遮断が、神経細胞死の抑制に関わっている可能性が提示された。また、シナプス外部におけるアストロサイトの突起の増生は、過剰なグルタミン酸の取り込みによって、神経細胞の保護に関わっていることも示唆された。本研究の結果から、ミクログリアとアストロサイトの反応性の違いは、神経細胞死やシナプス伝達の可塑的制御を理解する上で、重要な標的となりうると考えられる。

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 10 件)

- (1) Jinno S, Yamada J. 2012. Using comparative anatomy in the axotomy model to identify distinct roles for microglia and astrocytes in synaptic stripping. *Neuron Glia Biol.* 5:1-12.
- (2) Yamada J, Jinno S. 2011. Alterations in neuronal survival and glial reactions after axotomy by ceftriaxone and minocycline in the mouse hypoglossal nucleus. *Neurosci Lett.* 504:295-300.
- (3) Yamada J, Nakanishi H, Jinno S. 2011. Differential involvement of perineuronal astrocytes and microglia in synaptic stripping after hypoglossal axotomy. *Neuroscience.* 182:1-10.
- (4) Jinno S. 2011. Regional and laminar differences in antigen profiles and spatial distributions of astrocytes in the mouse hippocampus, with reference to aging. *Neuroscience.* 180:41-52.
- (5) Jinno S. 2011. Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 519:451-66.
- (6) Jinno S. 2011. Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: a stereology-based study using endogenous markers. *Hippocampus.* 21:467-80
- (7) Jinno S, Kosaka T. 2010. Stereological estimation of numerical densities of glutamatergic principal neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus.* 20:829-40.
- (8) Clancy B, Defelipe J, Espinosa A, Fairén A, Jinno S, Kanold P, Luhmann HJ, Rockland KS, Tamamaki N, Yan XX. Cortical GABAergic Neurons: Stretching it Remarks, Main Conclusions and Discussion. 2010. *Front Neuroanat.* 4 (7):1-18.
- (9) Jinno S, Kosaka T. 2009. Neuronal circuit-dependent alterations in expression of two isoforms of glutamic acid decarboxylase in the hippocampus following electroconvulsive shock: A stereology-based study. *Hippocampus.* 19:1130-1141.
- (10) Jinno S. 2009. Structural organization of long-range GABAergic projection system of the hippocampus. *Front Neuroanat.* 3 (13):1-9.

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 関善弘, 山田純, 神野尚三. ペリニューロナルネットを有するニューロンの神経化学的多様性. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2012 年 3 月 26 日. 甲府.
- (2) 山田純, 神野尚三. S100A6 は活性化アストロサイトと神経幹細胞の選択的マーカーである. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2012 年 3 月 26 日. 甲府.

- (3) 山田純, 神野尚三. ミクログリア形態の活性化過程の経時変化. 第 34 回日本神経科学大会. 2011 年 9 月 16 日. 横浜.
- (4) 神野尚三. ダイセクター法による海馬神経新生の長軸方向による差異と加齢変化の研究. 日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会. 2011 年 5 月 16 日. 福岡.
- (5) 神野尚三. Stereological analysis on the age-related alterations in patterns of expression of astrocyte marker proteins S100 β , GFAP and Sox2 in the mouse hippocampus, with special reference to the dorsoventral differences. 第 33 回日本神経科学大会. 2010 年 9 月 4 日. 神戸.
- (6) 神野尚三. 加齢に伴うアストロサイトの空間分布様式の変化には海馬の層・領域による差異が存在する. 日本解剖学会第 66 回九州支部学術集会. 2010 年 10 月 8 日. 福岡.
- (7) 神野尚三. マウス海馬オリゴデンドロサイトの産生・分化の加齢変化に関するステレオロジー解析. 第 116 回日本解剖学会全国学術集会. 2011 年 3 月 30 日. (東日本大震災のため日本生理学会誌上開催).
- (8) 神野尚三, 小坂俊夫. 加齢に伴う海馬神経新生の減少には領域による差異が存在する. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2010 年 3 月 31 日. 盛岡.
- (9) 神野尚三, 小坂俊夫. Regional differences in proliferation and maturation of neural progenitors in the adult mouse hippocampus: A stereology-based study. 第 32 回日本神経科学大会. 2009 年 9 月 16 日. 名古屋.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 神野尚三. GABA. In: 現代精神医学事典. 加藤敏, 神庭重信, 中谷陽二, 武田雅俊, 鹿島晴雄, 狩野力八郎, 市川宏伸 編. 弘文堂.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

- (1) 研究室案内
<http://www.ana2.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
神野 尚三 (JINNO SHOZO)
九州大学 大学院医学研究院・教授
研究者番号: 10325524
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし