

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791157

研究課題名（和文） 双極性障害モデル動物を用いたGABA神経系におけるミトコンドリアDNA異常の探索

研究課題名（英文） Detection of mitochondrial DNA defects in GABAergic neurons of model mice for bipolar disorder

研究代表者

窪田 美恵（坂下美恵）(KUBOTA MIE)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・専門職研究員

研究者番号：90344035

研究成果の概要（和文）：

パラフィン包埋脳組織の薄切切片(8 μ m厚)を用いて、核DNAにコードされるミトコンドリア局在蛋白質(succinate dehydrogenase, SDH)に対する抗体とミトコンドリアDNAにコードされるミトコンドリア局在蛋白質(Cytochrome c oxidase, COX)に対する抗体を用い、それぞれ別の蛍光二次抗体を用いて検出した。双極性障害モデルマウスでは、野生型に比べ、COXシグナルを欠失し、SDHシグナルのみが観察される細胞が有意に多く観察され、いくつかの領域に集積していた。この細胞種を同定するため、双極性モデルマウスとグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD67)、およびチロシンハイドロキシラーゼ(TH)プロモーター下にGFP遺伝子を発現するノックインマウスを交配させた系統を作成し、細胞を分取してmtDNA欠失を定量する実験系の確立を試みた。

研究成果の概要（英文）：

We detected the distribution of mtDNA deficient neurons with loss of mitochondrial proteins in transgenic mice expressing neuron-specific mutant mitochondria DNA polymerase by immunohistochemistry with antibodies against mtDNA-encoded or nuclear-encoded mitochondrial proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：

Mitochondria、polymerase gamma、mitochondrial DNA、bipolar disorder、GFP

1. 研究開始当初の背景

遺伝学的解析、および磁気共鳴スペクトロスコーピー(MRS)法による脳画像解析を用いた研究により、双極性障害とミトコンドリア

障害との関連が示唆されている^[1]。双極性障害では、これまでの脳画像解析や死後脳を用いた病理学的解析では、一致した所見は得られておらず、病態の責任部位や神経回路は明

らかにされていない。このことが、研究・治療の進歩を大きく妨げている。これまで双極性障害研究においては、動物モデルが存在しなかったため、分子生物学的手法により、責任部位探索を目的とするアプローチは不可能だった。我々が作成した双極性障害モデル動物は、変異 mtDNA polymerase を神経特異的に導入することで mtDNA 欠失が脳内に蓄積するトランスジェニック (*mutPolg1 Tg*) マウスである。この *mutPolg1 Tg* マウスの輪回し行動観察では、患者に似た周期的行動量変化を示し、それに対する気分安定薬の効果が認められた^[2]。情動変化の指標である脳内モノアミンレベル変化を示すなど、モデル動物としての妥当性を満たす十分な所見が得られている。以前に *mutPolg1 Tg* マウスでは欠失ミトコンドリア DNA (Δ mtDNA) が脳内に蓄積していることがサザンブロッティング法により示されている。MtDNA 異常が気分の制御に関わる領域に蓄積することによって障害される可能性を考え、どの領域に多く蓄積するのか、また蓄積しやすい細胞種が存在するのかを検討することは病態解明につながる研究であると思われる。一方、患者死後脳における網羅的遺伝子発現解析では、GABA 神経マーカー遺伝子群 (GAD67、Somatostatin、Neuropeptide Y など) の変化が複数の研究チームから報告されている^[3, 4]。また、形態学的にも、領野によっては患者において GABA 神経数の変化やマーカータンパク質の変化が報告されている。これらの所見を合わせて考慮し、双極性障害と GABA 神経機能異常、また脳内における障害領域との関連を検討することは、重要であると考えられる。

[1] Kato, T and Kato, N, *Bipolar Disord*, 2 (3 Pt 1), 180-190 (2000)

[2] Kasahara, T. *et al. Mol. Psychiatry* 11, 577-593 (2006)

[3] Konradi, C. *et al. Arch Gen Psychiatry*, 61 (3), 300-308 (2004)

[4] Benes, F.M., *et al., PNAS*, 104 (24), 10164-10169. (2007)

2. 研究の目的

双極性障害における脳内責任部位、および細胞種を探索するため、

(1)ミトコンドリア呼吸鎖のうち、mtDNA にコードされる構成タンパク質 (Cytochrome oxidase, COX) に対する抗体を用いて免疫染色を行い、 Δ mtDNA 含有ミトコンドリアを含む神経細胞を *mutPolg1 Tg* マウス脳内において確認する。同時に核遺伝子にコードされる構成タンパク質 (Succinate dehydrogenase, SDH) に対する抗体を用いて二重染色を行い、前者の抗体を用いた時の染色性が欠損する細胞を障害部位として同

定する。

(2) 同定された領域における呼吸鎖機能障害をミトコンドリア活性染色法にて確認する。
(3) 同定された領域において特異的な細胞種に GFP を発現するマウス X *mutPolg1 Tg* マウス) を用いて細胞を分取し、脳内で蓄積する Δ mtDNA を PCR 法で定量解析する。それ以外の細胞と比較して細胞種特異性を検討する。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリア呼吸鎖構成タンパク質に対する抗体染色には、パラフィン包埋による薄切切片を用いて行い、良好な染色像の得られる抗体の適切濃度等、条件を検討する。 Δ mtDNA を含有するミトコンドリアを障害部位として同定するため、SDH に対する抗体と COX に対する抗体を用い、異なる波長域を持つ蛍光二次抗体を用いて検出し、二重染色像を解析する。高速 CCD カメラによるタイリング法で冠状断方向の脳切片全体の二重染色像をイメージングする。各タイル撮影時に自動焦点機能を施行し、油浸レンズを用いることで、焦点のずれを最小限に抑える。
(2)活性染色法にはアセトン・ドライアイスで新鮮凍結した脳標本を用い、チトクローム酸化酵素とコハク酸脱水素酵素の活性反応を切片上で行う。クライオトームを用いて 8 μ m 厚の薄切切片を作成し、チトクローム酸化酵素の基質となるチトクローム c、およびカタラーゼを含む染色液で 30 分室温にて反応させた後、コハク酸脱水素酵素の基質となるコハク酸を含む染色液にて、37°C 下で 60 分反応させる。各酵素反応は酸化還元反応により、チトクローム酸化酵素活性を DAB、およびコハク酸脱水素酵素活性を NBT で発色させる。

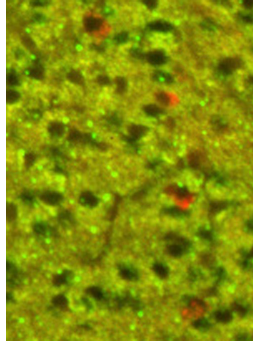
(3) GABA 神経細胞を分取するため、実態顕微鏡下に手動で切り出しを行う。切り出した切片をパパイン処理した後、ホモジナイズして細胞分散用溶液内でピペッティングにより、組織から個々の細胞に分散させる。蛍光励起を行い、GFP の蛍光強度と細胞の大きさを指標に蛍光細胞分取装置にて GABA 神経細胞を同定し、GFP 陰性細胞群から分離する。GFP 陽性細胞のみを回収する作業を 2 回繰り返すことで、均一な性質を持つ細胞群のみを選択し、解析に使用する。

死後脳で解析された Frontal cortex、概日リズムの中核である視交叉上核 (構成細胞数の 80% は GABA 神経である)、海馬 CA1、CA2 領域 (Somatostatin 陽性 GABA 神経が多く存在する)、気分障害に関係すると思われるその他の領域 (視床室傍核など) を選択し、GABA 神経細胞を単離する。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学染色によるミトコンドリア障害細胞の検出

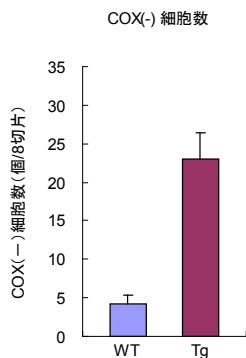
図1 Tg マウス脳内に観察された COX(-)細胞
COX を Alexa 488 (緑), SDH を Alexa 568 (赤) で検出した。COX 由来のシグナルが弱い細胞では SDH 由来のシグナルが残り、赤く検出された。



ミトコンドリア構成タンパク質に対する抗体染色を行った結果、双極性障害モデルマウス脳組織においては、「COX シグナルを欠失し、SDH シグナルが強く観察される細胞 (COX(-)細胞)」を検出した(図 1)。ΔmtDNA 蓄積が十分であると想定される老齢マウス ♂5ペア・♀7ペアにおいて探索したところ、双極性障害モデルマウスでは、野生型に比べ、有意に多く観察され、いくつかの領域に集積していた(図 2)。COX(-)細胞は、ΔmtDNA によってミトコンドリア呼吸鎖障害を持つと考えられた。抗体の有効性を確認するため、mtDNA を欠乏した培養細胞株 (ρ0 細胞) では SDH シグナルのみを観察した。この結果により、mtDNA にコードされたタンパク質を有さないミトコンドリアを免疫組織化学的に確認できることを検証した。

(2) GFP 発現細胞を用いた特異的細胞種におけるミトコンドリア DNA 異常の検出

図2 mutPolg1Tg マウス (Tg)、および同腹野生型マウス (WT) の視床室傍核において観察された COX(-)細胞の集計。

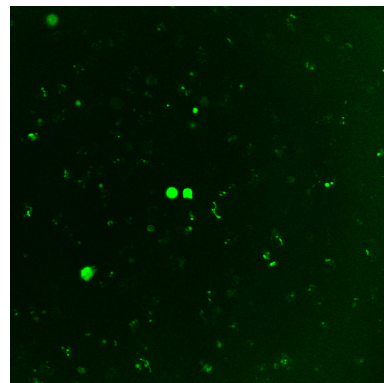


脳内にΔmtDNA を持つマウスのある特異的な細胞腫を選択的に採取することを目的として、GFP 発現細胞を有するマウスと双極性モデルマウスを交配した。GABA 合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67)、あるいはドーパミン合成に必須であるチロシン水酸化酵素をコードする遺伝子をプロモーターとして蛍光タンパク質 (GFP) を導入した遺伝子変異マウスを利用し、系統樹立を試みた。

まず、成獣マウスより線条体を切りだし、ホモジナイズして細胞を分画し、蛍光細胞分取装置で選別後に生細胞を GFP の蛍光観察にて確認した (図 3)。しかし、細胞塊をほぐすためにピペッティングすると細胞がダメージを受け、GFP のシグナルが減弱してしまう、細胞塊があると選別の際にその大きさから個々の細胞として認識されない、などの原因から、選別前の段階でカウントした細胞数の 1%程度しか GFP 陽性細胞を回収できなかった。この量の細胞からミトコンドリア DNA を抽出するのは非常に難しいことから、効率よく細胞を分取することが今後の課題と考えられた。

本研究では、双極性モデルマウス脳内に蓄

図3 GAD67-GFP マウスより分取された GFP 発現細胞



積するミトコンドリア機能障害細胞を免疫組織化学的に同定できたことから、この方法を患者死後脳での検討に応用し、障害細胞や部位を同定できる可能性があり、その技術的基盤を確立した意義は大きいと考えられる。また、非効率的ではあるが、GABA 神経細胞特異的に GFP を発現する細胞を成獣マウス脳から分取可能であることを示した。

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 0 件)

〔学会発表〕（計 2 件）

①窪田-坂下 美恵、変異 *Polg1* が脳内に発現するマウスにおけるミトコンドリア DNA 欠失蓄積細胞の組織学的検討、第 33 回 日本生物学的精神医学会、2011 年 7 月 15 日、東京都（港区台場）

②Mie Kubota-Sakashita、Histochemical detection of neurons accumulating mitochondrial DNA deletions in mice with mutant *Polg1* gene、8th World Congress of Neuroscience (International Brain Research Organization)、2011 年 5 月 22 日、Italy (Florence)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/22>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 美恵（坂下美恵）(KUBOTA MIE)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・専門職研究員

研究者番号：9 0 3 4 4 0 3 5