

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02581

研究課題名（和文）うつ病様行動異常における手綱核神経炎症の役割

研究課題名（英文）Inflammatory response of the habenula underlying depressive-like behaviors

研究代表者

相澤 秀紀（Aizawa, Hidenori）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：80391837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：マウス手綱核の神経活動を化学遺伝学プローブにより慢性的に活性化させたところ、有意なうつ病様の移動量低下を認め、炎症性変化を示す遺伝子発現変化を検出した。この成果は、手綱核神経細胞の活性化が、局所の炎症反応を惹起する可能性を示唆しており、研究代表者の仮説を支持している。また、アストロサイトの活性化やリポ多糖による炎症誘導が手綱核神経細胞の活性化を引き起こす過程を明らかにし、その過程に細胞外カリウムイオンの上昇が関与することを見出した。本研究の遂行過程で、新たな動物行動機器の開発、進化的に保存された神経炎症の機構、全身炎症が脳機能に与える影響を明らかにし、5報の国際学術誌論文を発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、近年うつ病の責任病巣の候補として注目される手綱核の機能を明らかにするもので、多様な症状から画一的な診断・治療法開発が困難であったうつ病の層別化と新たな病態仮説を提供する点で社会的意義が大きい。また、うつ病の病態には神経伝達物質の代謝や神経新生、炎症反応など様々な仮説が混在しており、統一の見解が得られていない。本研究の成果では、モノアミンとよばれる神経伝達物質の制御にあたる手綱核の炎症反応機構を明らかにするもので、長い歴史をもつモノアミン仮説と近年注目を集める神経炎症仮説の発展的統合を目指す点で学術的にも重要なものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We activated the mouse habenula via chemogenetic probe and observed depressive-like reduction of the locomotor activity in the home cage and inflammatory changes in gene expression pattern. This indicated the possibility that neuronal activation led to the local inflammatory response in the habenula. We also revealed that astrocytic activation and lipopolysaccharide activated the habenular neurons via increased extracellular potassium ion in mouse. In the way of the above analyses, we published 5 articles in the international academic journals by developing a novel equipment useful for mouse behavioral analysis, unraveling evolutionarily conserved mechanism of neuroinflammation and consequences of the systemic inflammation in brain function.

研究分野：神経科学

キーワード：うつ病 手綱核 モノアミン

1. 研究開始当初の背景

うつ病研究では長い間セロトニンなどの脳内モノアミンを中心とした病態仮説が議論されてきたが、モノアミン代謝を標的とした抗うつ薬は約4割のうつ病患者で無効・再燃を示すなど大きな課題を抱えている。一方、近年の研究により、脳の微弱な炎症反応がうつ病の病態に深く関与することが示唆されている。実際、免疫抑制剤の投与や全身炎症に伴ってうつ病様の症状が数多く報告されていることから、脳の炎症反応はうつ病の診断や治療の標的として注目を集めている。しかし、脳内の炎症反応がどの神経回路に作用して多彩なうつ病症状を発現させるかは不明なままである。

この問題に取り組むため、申請者は脳内モノアミン代謝の中核である手綱と呼ばれる脳の微小領域に注目し研究を進めてきた。うつ病患者では手綱の血流上昇やストレスへの応答異常が報告されており、病的な手綱の活動はモノアミン代謝を抑制することからうつ病の責任病巣として急激に注目を集めている。実際、申請者は実験的に手綱の過剰活性化を引き起こしたマウスを作成し、ストレス感受性の増加や不安、絶望様の行動、睡眠障害の増悪を観察している (Cui et al., *J Neurosci*, 2014)。

手綱は失望や痛みなどの嫌悪刺激により一時的に活性化することが繰り返し報告されている (Aizawa et al., *Front Neurosci*, 2013)。このような負の情動体験の繰り返しがどのように手綱の慢性的活動に影響を与えるかは不明である。そこで、申請者はグリア細胞を中心とした神経細胞外の要因が持続的な神経活動の失調を引き起こす可能性を検証するため慢性ストレス下にある手綱核を調べたところ、ミクログリアの活性化や炎症性サイトカイン産生、免疫細胞の遊走が観察され、局所的な炎症反応を示していた。さらにその分子的背景を網羅的遺伝子発現解析により調べ、うつ病様行動と相関して手綱核で増加する *Pcsk5* 遺伝子を同定している (Ito et al., *Neuropsychopharmacology*, 2020)。興味深いことに、PCSK5 は炎症性細胞の活性化に関与する matrix metalloproteinases (MMPs) を介して細胞外基質の再編成を引き起こすタンパク質分解酵素であった。実際、*Pcsk5* の機能抑制により抗うつ効果が得られ、手綱核での *Pcsk5* 遺伝子の発現上昇がうつ病様行動異常を引き起こすことが示された。

これらの知見から、申請者は「手綱核の局所炎症がうつ病様行動異常を引き起こす」という仮説に至っている。

2. 研究の目的

大型の攻撃者マウスへの曝露により慢性的に社会的敗北を味わったマウスは、不安様行動の増強やショ糖嗜好性の減弱などの行動異常、心肥大や体温調節異常の身体症状など多彩なうつ病様表現型が観察される。また、これらの症状を引き起こしたマウスは抗うつ薬に対する反応性がヒトに近いことからうつ病モデルとしての妥当性が評価されている。

申請者はこれまでに、マウスの手綱において慢性敗北ストレスが、炎症性サイトカインの産生増加などの炎症反応を引き起こす事を掴んでいるが (Ito et al., *Neuropsychopharmacology*, 2020; Nozaki et al., *Neuropharmacology*, 2020; Kikutani et al., *Neurochem Int*, 2020)、これらの炎症反応がどのようにして病的神経活動の慢性化に寄与するかは不明なままである。

本申請ではこの問題に取り組むため、ストレス下で生じる神経細胞の過活動と炎症反応の因果関係を調べることで、脳局所の興奮に起因する局所炎症がうつ病様行動に果たす役割を明らかにする。具体的にはマウス手綱を対象として1) 化学遺伝学による神経細胞の過活動が局所炎症に与える影響及び2) 炎症性サイトカインや活性酸素種などの炎症メディエータがうつ病様行動や神経細胞活動に与える影響を行動・生理学的解析により明らかにする。

3. 研究の方法

① 過剰神経活動による局所神経炎症への影響

申請者の研究によると慢性敗北ストレスを受けたマウスの手綱では、脳実質への単球の遊走、TSPO 陽性活性化ミクログリアの増加、単球の脳実質への動員、IL-1b, TNFa, IL-6 などの炎症性サイトカインの上昇などを観察している (Ito et al., Neuropsychopharmacology, 2020)。一方、尾懸垂などの急性ストレスでは、手綱核神経細胞の活性化は見られているものの、これらの炎症性細胞の動員には至っていなかった (Cui et al., J Neurosci, 2014)。

そこで、手綱核神経細胞の活性化が神経炎症反応にどのように関与するかを調べるために、化学遺伝学プローブを発現するウイルスベクターをマウス手綱へ導入した。化学遺伝学では数時間に渡る持続的発火を外側手綱核の神経細胞に引き起こすことが知られている。3 日間にわたる神経細胞の過剰活性化が、脳局所のグリア活性化に与える影響をマーカー遺伝子発現を指標として調べた (Ito et al., Neuropsychopharmacology, 2020; Nozaki et al., Neuropharmacology, 2020)。

② 脳局所炎症による神経活動への影響

脳の局所炎症における活性化型ミクログリアはサイトカインや活性酸素種などの炎症メディエータにより神経細胞へと作用し、その活動を修飾すると考えられる。これまでの研究によりストレス負荷によって産生が増加する IL-1b や TNFa を麻酔下マウスの外側手綱へ局所投与して神経細胞発火率や発火パターンを解析した。微小領域である手綱における記録部位との関係を調べるため、ガラス電極を用いた傍細胞記録法を応用し、一細胞レベルでの in vivo 神経活動解析を行った (Cui et al., J Neurosci, 2014; Aizawa et al., J Neurosci, 2013)。

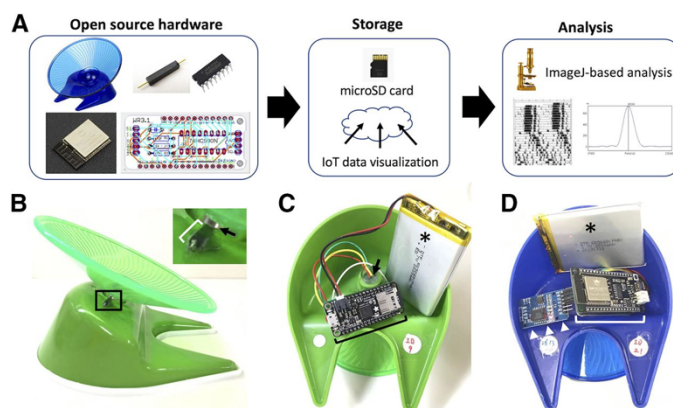
また、脳局所の炎症反応に伴いアストロサイトの脱分極が引き起こされることが考えられる。このようなグリア細胞の病的反応が神経細胞に与える影響を調べるため、手綱核アストロサイトへ光遺伝学プローブ ChR2 を発現させ、光刺激による脱分極を誘導した。これらのマウスに対して急性スライス実験および麻酔下 in vivo 細胞外記録を行い、アストロサイトの光刺激による神経細胞の反応や細胞外環境の変化を電気生理学的に調べた。

4. 研究成果

(1) 過剰神経活動による局所神経炎症への影響

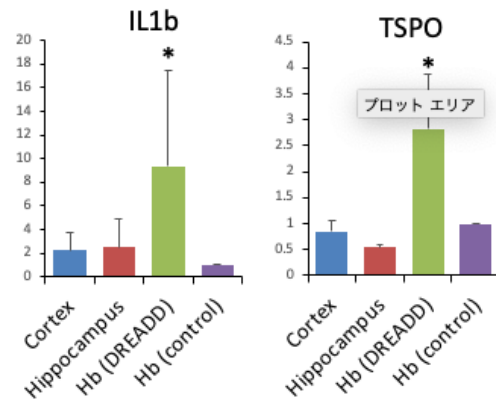
マウス手綱核の神経活動を慢性的に活性化させるため、化学遺伝学プローブ M3D-mCherry を発現するアデノ随伴ウイルスを左右の手綱核へ脳定位手術により注入した。手術より回復の後、M3D リガンドである Clozapine N-oxide (CNO) を 3 日間にわたり飲水投与した。

上記の神経回路操作のマウスの行動に与える影響を調べるため、ホームケージにおける Wheel-running 活動を連続的に測定した。従来の Wheel-running 活動測定装置は、測定のための計測機器と記録用コンピュータが必要であり、Specific pathogen free である通常のマウス飼育環境では導入が困難な場合がある。この問題を解決するために、単独で光環境測定および Wheel-running 活動測定が可能な装置を独自開発した。Wheel running data acquisition (WRAQ) と名付けられたこの装置は、microcontroller をベースとして小型機器でリチウム電池により計測および記録が可能であり、そのハードウェアおよびソフトウェア開発情報を open source として公開していることから、高い拡張性を持っている。また、WiFi を用いた microcontroller を用いた WRAQ (WRAQ-WiFi) では、Internet of things (IoT) 機器による拡張により、データ取得と記録、オンラインサーバーへの送信を単一機器で行うことで、飼育室から離れた研究室で、データの監視および即時的解析が可能となっている。さらに、ホームケージでの活動や日内変動、光環境に応答した変化を定量的に解析する open source



program を ImageJ および python を用いて開発してオンラインで公開した。これらの成果は、eNeuro へ論文発表され、多くの反響を得ている (Zhu et al., eNeuro, 2021)。

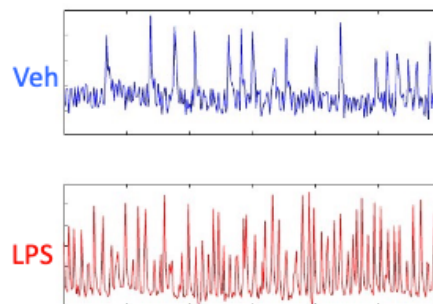
本研究では、このようにして開発した新規測定機器を用いて検討を進めたところ、CNO を投与された直後のマウスにおいて有意な Wheel-running 活動の低下をみとめ、うつ病様の移動量低下を認めた。さらにこれらのマウスの手綱核を採取し、qPCR 法を用いて遺伝子発現解析を進めたところ、IL-1b などの炎症性サイトカインの発現上昇が観察された。また、活性化ミクログリアのマーカである TSPO の発現も上昇していたため、これらのサイトカインがミクログリアにより産生されている可能性が示唆された。



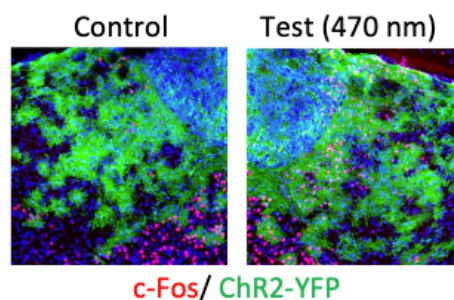
さらに、神経細胞の活性化が脳の炎症反応を引き起こす過程が種を超えて保存されているかを調べるため、てんかん発作および化学刺激による脱分極を引き起こしたゼブラフィッシュを作成し、その影響を電気生理学および遺伝子発現により解析した。研究成果をまとめてそれぞれ Journal of Neurophysiology 誌および Journal of Ethnopharmacology 誌へと論文発表した (Terai et al., J Neurophysiol, 2021; Gwedela et al., J Ethnopharmacol, 2021)。

(2) 脳局所炎症による神経活動への影響

手綱核における炎症反応が神経細胞に与える効果を調べるため、マウス手綱核の急性スライス標本を作成し、リポ多糖 (LPS) による刺激をおこなった。この操作によりマウス手綱核では Iba1 陽性のミクログリアの容積増大がみられ、炎症反応が窺われた。さらに、細胞内カルシウム指示薬を用いて神経活動の測定を行ったところ、リポ多糖投与群 (LPS) では対象群 (Veh) と比較して、有意に高い活動性を観察した。現在これらの活動性上昇を説明する誘導サイトカインの検討を行っている。



一方、アストロサイトの脱分極が神経細胞の活動に与える影響を調べるため、Dbx1-CreERT2; Rosa-ChR2-EYFP マウスを作成し、タモキシフェンを P0-P2 の期間に投与することで、手綱核アストロサイトに光遺伝学プローブを発現させた。光刺激を行ったところ、対象群と比較して c-Fos 陽性細胞数の有意な増加がみられ、アストロサイトの光刺激が神経細胞を活性化する可能性を示唆していた。



この可能性を直接検証するため、同マウスに対して光ファイバーとテトロドを組み合わせた optrode で手綱核の光刺激と神経細胞活動の記録を同時に行った。実験の結果、2 秒間にわたる光刺激に応答した神経細胞の発火率上昇がみられ、光刺激により活性化したアストロサイトが神経細胞へ何らかの刺激物質を放出し、作用していることが窺われた。

アストロサイトは、細胞外の興奮性物質であるカリウムイオンやグルタミン酸を細胞内に取り込み脳の興奮性制御において中心的な役割を果たすと考えられる。手綱核におけるこのようなアストロサイトの働きを調べるため、細胞外カリウムイオンを測定する微小イオン電極を作成した。このイオン電極は電極ごとにイオンセンサーおよび電極抵抗が異なるため、電極ごとの

キャリブレーション解析が必要である。本研究では、この解析を行う matlab プログラムを独自開発し、その妥当性検証を行った。このようにして作成した微小イオン電極を Dbx1-CreERT2; Rosa-ChR2-EYFP マウス手綱核の急性スライス標本へ設置し、光刺激の効果を調べたところ、光刺激の長さに応じて細胞外カリウムイオンが上昇することを見出した。また、この細胞外カリウムイオンの上昇は、神経細胞の活動電位をテトロドトキシンで阻害しても引き起こされるため、神経細胞の活動性上昇のみで説明することはできず、アストロサイトにより放出された可能性が高い。従ってこの結果は、手綱核アストロサイトは、細胞外カリウムイオンの制御を介して、神経細胞の活動性を制御していると考えられた。現在これらの研究成果をまとめ、論文投稿中である。

また、全身炎症が脳へ波及した際の影響をマウスで検討し、急性期および慢性期の病態においてミトコンドリア蛋白質 TSP0 が果たす役割を明らかにした。これらの研究成果をまとめて論文発表した (Giga et al., Shock 2021; Kikutani et al., Shock, 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kikutani Kazuya, Hosokawa Koji, Giga Hiroshi, Ota Kohei, Matsumata Miho, Zhu Meina, Takemoto Hidenori, Ji Bin, Ohshimo Shinichiro, Shime Nobuaki, Aizawa Hidenori	4. 巻 59
2. 論文標題 Genetic deletion of translocator protein exacerbates post-sepsis syndrome with activation of the C1q pathway in septic mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 82-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SHK.0000000000002030	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto Kouichi, Yamawaki Yosuke, Yamaoka Kenji, Yoshida Takayuki, Okada Kana, Tan Wanqin, Yamasaki Miwako, Matsumoto-Makidono Yoshiko, Kubo Reika, Nakayama Hisako, Kataoka Tsutomu, Kanematsu Takashi, Watanabe Masahiko, Okamoto Yasumasa, Morinobu Shigeru, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto	4. 巻 3
2. 論文標題 Spike firing attenuation of serotonin neurons in learned helplessness rats is reversed by ketamine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/braincomms/fcab285	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 Terai Haruhi, Gwedela Mayeso Naomi Victoria, Kawakami Koichi, Aizawa Hidenori	4. 巻 126
2. 論文標題 Electrophysiological and pharmacological characterization of spreading depolarization in the adult zebrafish tectum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1934 ~ 1942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jn.00343.2021	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 Zhu Meina, Kasaragod Deepa Kamath, Kikutani Kazuya, Taguchi Kei, Aizawa Hidenori	4. 巻 8
2. 論文標題 A Novel Microcontroller-Based System for the Wheel-Running Activity in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0260-21.2021	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 Giga Hiroshi, Ji Bin, Kikutani Kazuya, Fukuda Shuji, Kitajima Takashi, Katsumata Seishi, Matsumata Miho, Suhara Tetsuya, Yamawaki Shigeto, Shime Nobuaki, Hosokawa Koji, Aizawa Hidenori	4. 巻 56
2. 論文標題 Pharmacological and Genetic Inhibition of Translocator Protein 18 kDa Ameliorated Neuroinflammation in Murine Endotoxemia Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 142-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001703	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 Gwedela Mayeso Naomi Victoria, Terai Haruhi, Lampiao Fanuel, Matsunami Katsuyoshi, Aizawa Hidenori	4. 巻 284
2. 論文標題 Anti-seizure effects of medicinal plants in Malawi on pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish larvae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 114763 ~ 114763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2021.114763	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 該当する

1. 著者名 Kasaragod Deepa Kamath, Aizawa Hidenori	4. 巻 13
2. 論文標題 Deep ultraviolet fluorescence microscopy of three-dimensional structures in the mouse brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-35650-2	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 相澤秀紀、菊谷和也、細川康二、儀賀普嗣、太田浩平、松股美穂、Meina Zhu、志馬伸朗
2. 発表標題 敗血症後症候群における海馬TSP0の役割
3. 学会等名 日本解剖学会第 76 回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相澤秀紀、松股美穂、Xintong Yao、Wanqin Tan、田中光一
2. 発表標題 うつ病様行動異常における手綱核アストロサイトの役割
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 相澤秀紀
2. 発表標題 片頭痛前兆に伴う拡張性脱分極の臨床前研究
3. 学会等名 第50回日本頭痛学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kasaragod Deepa Kamath, Zhu Meina, Takemoto Hidenori, Aizawa Hidenori
2. 発表標題 Wide-field serial block-face fluorescence microscope using deep ultraviolet light for whole-brain imaging
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相澤秀紀、Meina Zhu, Deepa Kamath Kasaragod, 菊谷知也、田口慧
2. 発表標題 マウス輪回し行動解析における新規マイクロコントローラシステムの構築
3. 学会等名 日本解剖学会第75回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学相澤研究室ホームページ
<https://neurobio.hiroshima-u.ac.jp/en/>
広島大学神経生物学
neurobio.hiroshima-u.ac.jp

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
---------	---------