

## 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：83902

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700408

研究課題名（和文） 精神疾患と関連した行動異常を呈する HDAC6 遺伝子欠損マウスの解析

研究課題名（英文） Analysis of HDAC6-deficient mice that showing behavioral abnormalities related to psychiatric disorders

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）：

私たちは、ヒストン脱アセチル化酵素 6 (Hdac6) とよばれるタンパク質が脳のセロトニン神経細胞に多く含まれること、このタンパク質の働きが情動行動の制御に関わることを明らかにしました。さらに Hdac6 の働きを抑制する薬剤には、抗うつ薬と同様の効果があることを、マウスを用いた実験で確認しました。本研究成果は、うつ病の病態解明や新しい作用メカニズムに基づいた抗うつ薬の開発に繋がることが期待されるものです。

研究成果の概要（英文）：

Here we demonstrate the crucial roles of Hdac6 (histone deacetylase 6) deacetylase activity in the expression of emotional behavior in mice. Moreover, administration of Hdac6-specific inhibitor replicated antidepressant-like effect in mice. In good agreement with behavioral phenotypes of *Hdac6*-deficient mice, Hdac6 dominantly localizes to the dorsal and median raphe nuclei, which are involved in emotional behaviors. These findings will help understand the etiology of depression, and provide a new therapeutic target for depression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・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

現在我が国の年間自殺件数は3万件を超え

ている。自殺の原因のトップはうつ病であり（警察庁調べ）、その罹患率の高さや社会に与

える被害の甚大さから、より効果の高い治療法の開発が望まれている。これを実現するためには、うつ病の病態を分子レベルで理解する必要があるが、これまでのところ、うつ病を含むほとんどの精神疾患に関して、分子レベルの病態解明には至っていない。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)の情動に関連した行動異常を見出した。研究開始当初には、Hdac6 が $\alpha$ 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、情動異常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。特に前年度、Hdac6KO マウスが、尾懸垂試験においてまるで抗うつ薬を投与されたかのような行動を示すことを見いだしており、HDAC6 の働きと「うつ症状」の関連が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、情動障害を伴う精神疾患の病態理解、及びそれらの疾患に対する新しい治療戦略の創出に貢献することを目標として、Hdac6KO マウスが示す情動行動の異常、特に抗うつ傾向の分子基盤を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学染色・生化学的解析

マウス脳における Hdac6 発現細胞の同定は免疫組織化学により行った。セロトニン作動性神経細胞のマーカーとして Tph2 (tryptophan hydroxylase 2)、核染色には

DAPI を用いた。また二重蛍光免疫染色のために、抗 Hdac6 抗体は Alexa555 標識 (Invitrogen) したものをを用いた。また、Hdac6 発現プロファイル (発現臓器、発生過程における発現量変化等) の解析、各種タンパク質の検出、タンパク質アセチル化レベルの検出は、ウエスタンブロット法(WB)により行った。本研究で用いた主な抗体・試薬等を以下に示す。

- ・抗マウス HDAC6 抗体 (自作抗体)
- ・抗ヒト HDAC6 抗体 (C300, Santacruz)
- ・抗 $\alpha$ チューブリン抗体 (Cedarlane)
- ・抗アセチル化 $\alpha$ チューブリン抗体 (Sigma)
- ・抗 TPH2 抗体 (NB100, Novus biologicals)
- ・抗 pan-アクチン抗体 (NeoMarkers)
- ・抗ヒストン H3 抗体 (gift from Dr. Hiroshi Kimura, 阪大)
- ・抗アセチル化ヒストン H3 (Millipore)
- ・Tricostatin A (TSA, Sigma)
- ・Sodium Butyrate (Sigma)
- ・NCT-14b (名市大宮田直樹教授との共同研究)
- ・Fluoxetine hydrochloride (Sigma)
- ・Desipramine hydrochloride (Sigma)
- ・Imipramine hydrochloride (Sigma)

### (2) Hdac6KO マウスの行動解析

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。行動テストには、12 週齢以上のオスマウスを用いた。マウスは、温湿度管理、明暗 12 時間周期、接餌飲水自由な環境で飼育した。

#### ①尾懸垂試験

マウスの尾先端から 1 cm 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。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。薬剤はすべて生理食塩水に溶解し、試験開始 30 分前に、腹腔に 10ml/kg となるように投与した。薬剤の濃度は、Cryanらの報告(Cryan JF, et al, Neuroscience and biobehavioral reviews 2005)に従って決定した。Imipramine hydrochloride (25mg/kg), Fluoxetine hydrochloride (30mg/kg), Desipramine hydrochloride (20mg/kg)。NCT-14b は予備実験により、試験開始 30 分前投与と比較して、24 時間前に投与した場合に効果の高いことが判明していたため、4.8mg/kg の濃度で試験開始 24 時間前に腹腔投与した。

## ②ホームケージ活動量解析

ホームケージ活動量は、AB Farad 社の ANIMEX activity meter を用いて 24 時間測定した。

## (3) 統計解析

二群間の比較には Student's t-test を用いた。多群比較には二元配置分散分析 (two-way ANOVA) 後に、多重比較法 (ボンフェローニの方法) を用いた。

## 4. 研究成果

Hdac6KO マウスの情動と関連した行動異常の発見からスタートした本研究は、(1) Hdac6 発現細胞の同定、(2)Hdac6KO マウスの行動解析、(3) Hdac6 阻害剤と SSRI を用いた行動薬理的解析 (Hdac6 阻害剤と SSRI の作用機序の比較) 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。成果の一部は、国際学術誌における論文掲載、新聞掲載、学会発表という形で公表した。

### (1) Hdac6 発現細胞の同定

これまでの解析により、Hdac6 は組織レベルでは脳と精巣に多く存在していること、脳切片を用いた免疫染色においては、縫線核領域で特に強いシグナルが観察されることが判明していた (図 1)。背側縫線核領域における

Hdac6 発現細胞が、セロトニン作動性神経細胞と一致するか否かを明らかにするために、セロトニン細胞のマーカである Tph2 との蛍光二重免疫染色を行ったところ、Hdac6 と Tph2 の発現細胞は完全に一致した (図 1D)。この結果から、背側縫線核における Hdac6 発現細胞は、セロトニン作動性神経細胞であることが明らかとなった。セロトニンは情動に深く関わる神経伝達物質であり、そのセロトニンを合成分泌しているセロトニン神経細胞は、現在主要な抗うつ薬として用いられている SSRI の標的細胞である。このことから、Hdac6KO マウスの情動に関連した行動異常は、セロトニン神経細胞における Hdac6 の欠損によって引き起こされていると推察される。

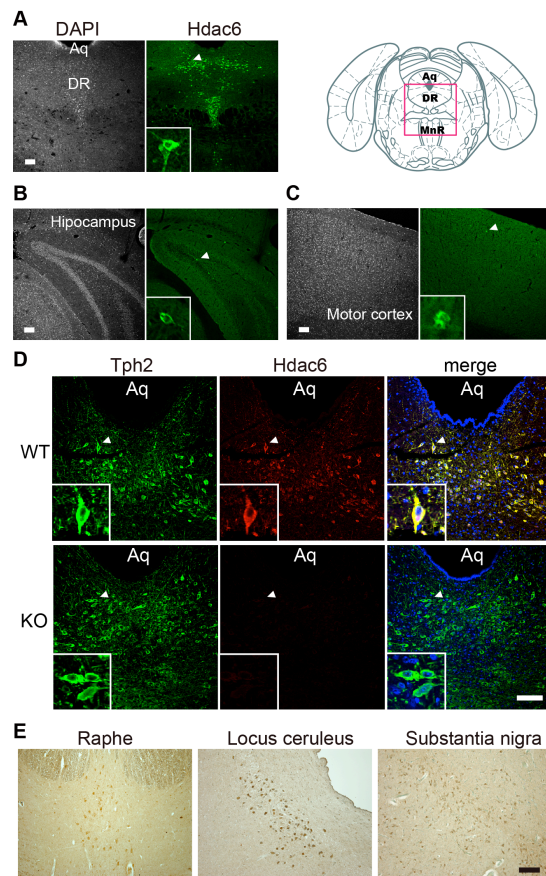


図 1 脳における Hdac6 の発現

A-C. 縫線核 (A), 海馬 (B), 大脳皮質 (C) における Hdac6 の発現

D. 背側縫線核における Hdac6 と Tph2 の発現

E. ヒト脳における Hdac6 の発現

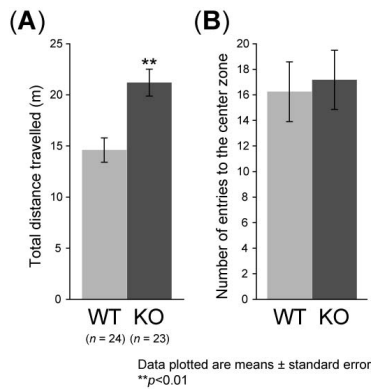


図2 オープンフィールドテスト

- A. 10 分間の活動量（移動距離 m）
- B. 中央領域への侵入回数

(2) Hdac6KO マウスの行動解析

Hdac6KO マウスは、運動能力、生殖能力、血圧、心拍等の生理機能は正常であるが、新奇環境下における活動量の亢進（オープンフィールド試験:図 2）、不安レベルの低下（高架式十字迷路試験:図 3）、まるで抗うつ薬を投与されかのような行動（抗うつ様行動；尾懸垂試験:図 4）を示す。

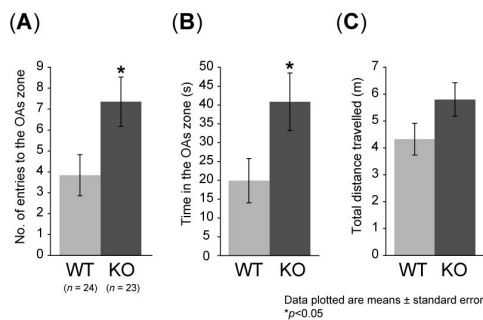


図3 高架式十字迷路テスト

- A. オープンアームへの侵入回数
- B. オープンアームの滞在時間
- C. 10 分間の総移動距離 (m)

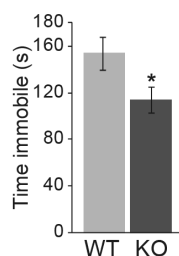


図4 尾懸垂試験

試験時間 6 分間中に観察された不動時間 (n=12, \*p<0.05)

ここで問題となるのは、オープンフィールドテストで観察された活動量の亢進が、新奇環境下におかれて初めて生じたのか、それとも生得的に活動量が亢進しているのかを区別できない点である。後者であれば、高架式十字迷路、尾懸垂試験は、平常時の活動量が同等であることを仮定した試験系であるため、結果の解釈が困難になる。そこで、平常時（24 時間）の活動量を測定した（図 5）。この結果、Hdac6KO マウスの平常時活動量は野生型と同等であることが判明した。従って、Hdac6KO マウスで観察された野生型と異なる行動（図 3-4）は、情動の異常に起因していると推察された。

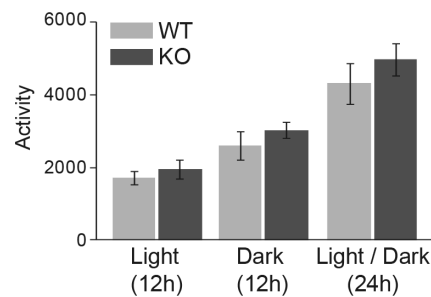


図5 ホームケージ活動量解析

(WT n=5, KO n=6)

(3) Hdac6 阻害剤と SSRI を用いた行動薬理的解析

Hdac6 がマウス脳においてセロトニン神経細胞に強く発現していること、及び Hdac6KO マウスで抗うつ様行動が観察されることから、Hdac6 はセロトニン神経細胞において、情動行動の調節に関わる何らかの機能を担っていると考えられる。一方で、脳における Hdac6 の発現は胎生後期から生後二週間にピークを迎え、成体ではピーク時の約 20% に発現が低下している。このことから、Hdac6 は神経回路が形成される時期になんらかの役割を担っており、Hdac6KO マウスでは、それが障害されることで、情動に関連した行動異常が観察された可能性もある。これらについて検討するために、Hdac6 阻害剤(NCT-14b: Itoh Y et al, 2007, J Med Chem)の野生型マウスに対する効果について解析した (Fig. 6)。NCT-14b は、

Hdac6 に選択的な阻害剤で、細胞に処理した場合、ヒストンのアセチル化レベルには影響を与えずに、Hdac6 の基質である  $\alpha$  チューブリンのアセチル化 (Ac- $\alpha$  Tub) のみを亢進する。これに対して、Class I HDAC 阻害剤である Sodium butyrate はヒストンのアセチル化 (Ac-Histone H3) のみを、Class I, II HDAC 阻害剤である TSA は、 $\alpha$  チューブリンとヒストン両者のアセチル化を亢進する (図 6A)。NCT-14b がマウスに与える効果について尾懸垂試験を用いて検討したところ、NCT-14b 投与群では、生理食塩水投与群と比較して不動時間が有意に減少し、Hdac6KO マウスの示す不同時間と同程度となった (図 6B)。このことから、Hdac6KO マウスが呈する抗うつ様行動は、成体マウスにおける Hdac6 脱アセチル化活性の欠失によるものと結論された。

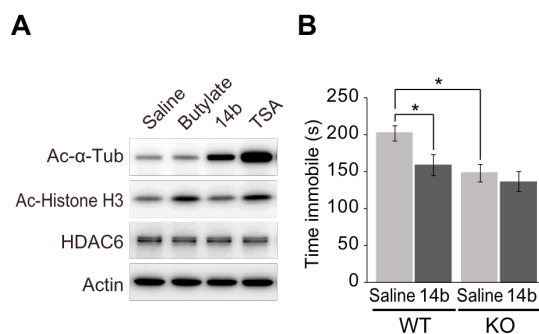


図 6 Hdac6 阻害剤 (NCT-14b) の効果

- A. HeLa 細胞における NCT-14b の効果  
 B. 尾懸垂試験における NCT-14b の効果  
 (左から n=14, 21, 16, 16, \* $p < 0.05$ )

次に、Hdac6 の活性抑制によってもたらされる抗うつ効果のメカニズムと、既製の抗うつ薬である SSRI (セロトニン選択的再取り込み阻害剤) の作用メカニズムの関係を調べるために、Hdac6KO マウスに対する SSRI の効果について尾懸垂試験を用いて検討した。その結果、Fluoxetine (SSRI の一つ) には、WT と KO に対して同程度の不動時間減少効果が認められた (図 7)。この結果から、Hdac6 の脱アセチル活性抑制による抗うつ効果の作用機序は、SSRI のそれと重複しないことが示唆された。

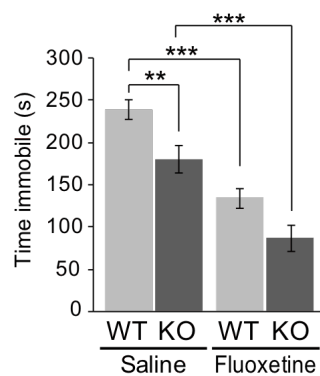


図 7 Fluoxetine の効果

尾懸垂試験における Fluoxetine の効果  
 (左から n=18, 18, 12, 13, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

#### (4) まとめ

本研究において、Hdac6KO マウスが呈する抗うつ様行動の原因が、成体マウスにおける Hdac6 の脱アセチル化活性の欠損によって生じることが明らかとなった。成体マウス脳における Hdac6 の発現が、縫線核のセロトニン作動性神経細胞に集中していることから、Hdac6 がセロトニン神経細胞の機能調節に関与して、うつ症状の形成・緩和に影響を及ぼすと考えられる。また Hdac6 阻害剤の抗うつ作用メカニズムは、SSRI の作用機序と重複しないことが示唆された。このことは、Hdac6 阻害剤が、新たな作用メカニズムに基づいた新規抗うつ薬となり得ることを示している。SSRI は、効果が現れるまでに数週間以上の連続した服用が必要であり、即効性がないというデメリットを抱えている。今後 Hdac6 阻害剤の作用機序の詳細を解明することにより、新しい抗うつ作用メカニズムやうつ症状の形成機構に迫りたい。

#### 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 2 件)

- ① Fukada M, Hanai A, Nakayama A, Suzuki T, Miyata N, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Yao TP, and Kawaguchi Y. “Loss of Deacetylation

Activity of Hdac6 Affects Emotional Behavior in Mice ” *PLoS ONE*, **7**(2):e30924. doi:10.1371/journal.pone.0030924. (2012) 査読有り

- ② Fujikawa A, Fukada M, Makioka Y, Suzuki R, Chow JPH, Matsumoto M, and Noda M. “ Consensus Substrate Sequence for Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Z ” *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 37137-37146. doi:10.1074/jbc.M111.270140 (2011) 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① 深田 斉秀、HDAC6 脱アセチル化活性抑制はマウスの抗うつ様行動を誘発する、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、パシフィコ横浜
- ② 深田 斉秀、HDAC6 脱アセチル化活性抑制はマウスの抗うつ様行動を誘発する、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 24 日、パシフィコ横浜 (震災の影響で誌上開催となった)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 抗うつ薬およびその用途

発明者 : 深田斉秀、川口禎晴、鈴木

権利者 : 愛知県、名古屋市立大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2010-196993

出願年月日 : 平成 22 年 9 月 2 日

国内外の別 : 国内

[その他]

①研究成果新聞掲載

朝日新聞・読売新聞 (朝刊) 平成 24 年 2 月 17 日 (金) 掲載

②研究成果 HP

<http://www.pref.aichi.jp/0000048681.html>

## 6. 研究組織

(1) 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