

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20697

研究課題名（和文）慢性ストレス関連海馬内領域の特定とそのモニタリング

研究課題名（英文）Identification of chronic stress-related subregions in the hippocampus and its monitoring

研究代表者

鈴木 敢三（Suzuki, Kanzo）

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・助教

研究者番号：80961961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：うつ病の病態やその発症に関わる海馬内小領域の同定を目的とし、本研究では、慢性社会的敗北ストレスマウスやストレス因子コルチコステロン慢性投与マウスモデルを作製し、うつ様行動や不安様行動を行動学的に評価した。また、それらのマウスの海馬内において神経活動マーカーである最初期遺伝子群の発現を定量し、ストレスに関わる海馬内小領域を探索した。これらの解析から、慢性的慢性ストレスに対して、海馬歯状回領域が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病を含む精神疾患の発症のメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究で同定した海馬歯状回はヒトうつ病の病態と関わりがあることが示唆されている。今後、神経回路レベルまで解析を進める、慢性ストレスにおける歯状回を中心とした神経回路基盤を理解することにより、うつ病の病態の理解や治療法の開発の一端となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To identify key brain subregions in the hippocampus of mice that are involved in chronic stress, in this study, we chronically applied stress to mice and analyzed the expressions of neuronal activity markers immediately early genes. Initially, we provided a chronic social defeat stress mouse model. In addition, corticosterone was chronically administered to mice since corticosterone is one of the stress hormones. We observed that chronic stressed mice shows depressive-like or anxiety-like behaviors. Based on the results of immediate early gene expression, we find that the dentate gyrus of the hippocampus is one of brain areas involved in chronic stress. These findings may uncover key mechanisms of the pathophysiology of depression.

研究分野：分子神経科学

キーワード：うつ病 ストレス 海馬 最初期遺伝子

1. 研究開始当初の背景

脳内海馬領域は、認知、記憶や情動といった高次機能に関わることが知られ、うつ病発症や慢性ストレスに関わることも示唆されている。これまでに、研究代表は、海馬の恒常的シナプス可塑と呼ばれシナプスの機能を安定化させることが抗うつ作用に関わるメカニズムであることを提唱してきた (Suzuki K et al., *Cell reports*, 2021、Suzuki K et al., *Nature*, 2017)。一方、海馬がうつ病発症にどのように関わるのか未だ不明な点が多い。うつ病の病態や発症のメカニズムの解明のため、マウスに慢性的にストレスを負荷し抑うつ・不安状態を行動学的に評価することによって、うつ病発症に関係するメカニズムが研究されている。それらの背景から、慢性的なストレスと海馬の関りを明らかにするために、ストレスに関わる海馬内領域の特定やそのメカニズム解明が必須であると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、慢性ストレスに関わる海馬内小領域を特定することを目的とし、以下の研究項目を遂行した。

(1) 慢性ストレスマウスモデルを作製し、海馬領域内で神経活動マーカーである最初期遺伝子群の定量を行い、神経活動に影響のある小領域や細胞群を探索した。

(2) 慢性ストレス後の抑うつ様状態と最初期遺伝子群の発現の相関の高さを指標に、慢性ストレスに関与しうる海馬内領域の特定を試みた。

(3) 遺伝子工学的に神経活動依存的遺伝子プロモーターを有するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、慢性ストレス状態を可視化する実験プロトコルの樹立と最適化を行った。これら課題への取り組みにより、慢性的なストレスと海馬の関りの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 慢性ストレスマウスモデルの作製

6-8週齢の C57BL/6N 雄マウスを使用に対し、慢性的に以下のストレスを与えて、慢性ストレスを負荷したマウスモデルを作製した。

(a) 社会的敗北ストレスと呼ばれ、大きなマウスに攻撃されることで誘発される身体的なストレスモデルが存在する。マウスに社会的敗北ストレスを慢性的に与え、慢性社会的敗北ストレスマウスを作製した。また、そのストレスを与えていない群をコントロール群とした。

(b) コルチコステロンはストレスホルモンとして知られ、心理的・精神的ストレス反応が起こると副腎皮質から放出されることが知られている。過去の知見から、コルチコステロンの慢性投与によりマウスがうつ様行動を示すことが知られているため、マウスにストレス因子コルチコステロンの慢性投与したマウスを作製した。また、コルチコステロンの血中濃度は概日リズムで変動することや投与されたコルチコステロン濃度や投与方法によって、生体に及ぼす生化学反応や行動への影響が異なる可能性が示唆されるため、腹腔内投与や飲水投与による影響を解析した。

(2) マウスの抑うつ様状態を評価するための行動解析

マウスの抑うつ様行動や情動行動を解析するため、社会性逃避行動試験、高架式十字迷路試験、強制水泳テスト、尾懸垂テスト、ショ糖嗜好性テストなどの行動解析を行った。

(3) 最初期遺伝子の遺伝子発現の定量

神経活動依存的に遺伝子発現が起こり、c-Fos や Arc などの最初期遺伝子発現が素早く起こることが示されている。そのため、最初期遺伝子の発現は神経活動の状態を反映している分子マーカーであると考えられている。それらの遺伝子発現を海馬内で定量するため、慢性ストレスを負荷したマウスから脳組織を取り出し、RT-PCR を用いて、海馬領域内の最初期遺伝子群発現の定量を行った。また、海馬内の小領域を単離については、脳スライサーを用いて、脳組織のスライスを作成し、実体顕微鏡下で小領域を単離した。

(4) 最初期遺伝子の発現や細胞種の同定のための組織学的解析

組織学的に海馬内の最初期遺伝子の発現を解析するため、マウスを還流固定し、脳組織切片を用いて免疫組織化学染色を行った。また、抑制性細胞などの細胞種に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

(5) 遺伝子工学的な手法を用いた神経活動応答の検出方法の導入

神経活動応答プロモーターを用いることにより、最初期遺伝子発現細胞を標識することが可能となる。神経活動が高い細胞を遺伝子工学的に標識し、ストレスによってその応答性を可視化する実験プロトコルを樹立するため、活動依存性プロモーターの導入をした。また、ウイルスベクターを用いて脳内に感染させるため、アデノ随伴ウイルスベクターを作製した。

4. 研究成果

(1) 最初期遺伝子群の発現を指標としたストレスに関わる海馬小領域の探索

10日間社会性敗北ストレスをマウスに与えて、ストレスの影響を解析するため、社会性逃避行動を解析した。その結果、慢性社会性敗北ストレスを受けたマウスは、社会性逃避行動を示し、抑うつ様行動を示した。また、高架式十字迷路試験の結果、ストレスを受けたマウスはコントロール群に比べて、オープンアームへの滞在時間が低下し、不安様行動が観察された。次に、マウスにストレス因子コルチコステロンの慢性投与したマウスを作製した。それらのマウスのうつ様行動について、強制水泳テストや尾懸垂テストを行い、抑うつ様状態を評価した。また、投与方法、投与濃度や投与期間など検討を行った。

慢性的にストレスを与えたマウスから海馬の組織を単離し、神経活動マーカーと知られる最初期遺伝子群(c-Fos, Npas4, Arc, FosBなど)の遺伝子発現の定量解析を行った。また、コントロール群としてストレスを与えていないマウスを準備し、同様に、組織の単離を行った。次に、最初期遺伝子群の mRNA の発現を RT-PCR を用いて、最初期遺伝子群の発現に変動があるか解析を行った。

免疫組織化学染色を用いて、慢性ストレスマウスモデルの海馬内小領域でそれら最初期遺伝子群の蛋白質発現を定量ための実験系を立ち上げた。また、c-Fos, Arc, Npas4 など FosB に対する抗体を用いた免疫組織化学染色の最適化を進めた。また、ImageJ を用いた解析や画像解析ソフト QuPath を用い陽性細胞数の検出や輝度解析の最適化を行った。

(2) 慢性ストレス後の抑うつ様状態と最初期遺伝子群の発現の相関解析

神経活動マーカーの最初期遺伝子群の発現とうつ様行動に相関があるか解析を行った。具体的には、コントロール群とストレス群の最初期遺伝子の発現と社会性逃避行動や不安様行動をプロットし相関の解析を行った。その結果、海馬歯状回においてストレス様行動と相関のある最初期遺伝子の発現を同定した。

(3) 活動依存性プロモーターを用いた神経活動応答標識とウイルスベクター作製の最適化

神経活動依存性プロモーターの RAM プロモーターを導入した。最適な遺伝子導入を行うため、アデノ随伴ウイルスの各種セロタイプ(AAV-rh10 や AAV1 など)の作製と感染能の確認を培養細胞の実験系を用いて開始した。また、ポリエチレングリコールによるウイルス沈殿方法やクロロホルム処理による濃縮や精製方法を試みた。

本研究により、最初期遺伝子の発現の観点から、海馬歯状回領域がストレスとの関わる事が明らかとなった。また、ウイルス学・遺伝子工学的な手法により、神経活動状態の可視化を可能とさせ、さらには、それら进行操作することにより、海馬とストレスの関係を明らかにできることが期待される。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kim Ji-Woon*, Suzuki Kanzo*(*equal contribution), Kavalali Ege T., Monteggia Lisa M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Bridging rapid and sustained antidepressant effects of ketamine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 364 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmed.2023.02.003	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
1. 著者名 Segi-Nishida Eri, Suzuki Kanzo	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulation of adult-born and mature neurons in stress response and antidepressant action in the dentate gyrus of the hippocampus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.08.010	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 Matsuura Sumire, Nishimoto Yuki, Endo Akane, Shiraki Hirono, Suzuki Kanzo, Segi-Nishida Eri	4. 巻 46
2. 論文標題 Hippocampal Inflammation and Gene Expression Changes in Peripheral Lipopolysaccharide Challenged Mice Showing Sickness and Anxiety-Like Behaviors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1176 ~ 1183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00729	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 Kasakura Nanami, Murata Yuka, Shindo Asuka, Kitaoka Shiho, Furuyashiki Tomoyuki, Suzuki Kanzo, Segi-Nishida Eri	4. 巻 17
2. 論文標題 Overexpression of NT-3 in the hippocampus suppresses the early phase of the adult neurogenic process	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1178555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2023.1178555	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 Kim Ji-Woon, Suzuki Kanzo, Kavalali Ege T., Monteggia Lisa M.	4. 巻 75
2. 論文標題 Ketamine: Mechanisms and Relevance to Treatment of Depression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Annual Review of Medicine	6. 最初と最後の頁 129 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-med-051322-120608	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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 白木 寛乃、鈴木 敢三、瀬木-西田 恵里
2. 発表標題 コルチコステロンによるストレス応答のメカニズム解明
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田村 直紀、鈴木 敢三、白木 寛乃、瀬木-西田 恵里
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクター血清型 rh10 精製の試み
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊 琴美、鈴木 敢三、中村 健太、瀬木 (西田) 恵里
2. 発表標題 慢性ストレスに関わる海馬歯状回の機能解明
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 油井 清子、神田 豊、沓澤 美緒、鈴木 敢三、瀬木-西田 恵里
2. 発表標題 海馬における抗うつ効果に関わる転写因子CREBの役割
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笠倉 奈々美、村田 優花、進藤 あす夏、北岡 志保、古屋敷 智之、鈴木 敢三、瀬木-西田 恵里
2. 発表標題 ニューロトロフィン3過剰発現が海馬歯状回に与える影響の探索
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------