

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830054

研究課題名(和文) うつ病におけるミトコンドリア障害の病理学的な関与

研究課題名(英文) Potential involvement of the mitochondrial unfolded protein response in depressive-like symptoms in mice

研究代表者

神戸 悠輝 (Kambe, Yuki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60549913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病患者の3分の1は現行の抗うつ薬に耐性であり、新規のターゲットの創出は急務である。研究代表者は、うつ病におけるミトコンドリアの障害仮説に焦点を当て、うつ病への関与を検討した。マウスに対し慢性的にストレスを与えることで、うつ病モデルマウスを作成すると、このマウスの脳ミトコンドリアに障害がある可能性が推察された。さらに、ミトコンドリアの障害に関わる5種類の遺伝子の発現は全てうつ病モデルマウスで上昇し、これらの遺伝子発現とうつ病の指標は全て正に相関した。このことから、ミトコンドリアの障害はうつ病に強く関連し、創薬ターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Many evidences strongly suggest that a mitochondrial deficit is implicated in major depression. A mitochondrial deficit leads to mitochondrial stress responses, including the mitochondrial unfolded protein response (UPR_{mt}), which is associated with certain brain disorders such as spastic paraplegia and Parkinson's disease. However, there is no evidence regarding the relationship between depressive disorder and UPR_{mt}. Mice treated with chronic restraint stress showed significant depressive-like behaviors in the tail suspension and forced swim tests, decreased oxygen consumption rate, and increased levels of molecules associated with UPR_{mt}, such as Hspa9, Hspd1, Ubl5, Abcb10, and ClpP. All of the UPR_{mt}-related molecules were significantly correlated with depressive-like behavior in the forced swim test. Thus, the present study is the first to reveal a relationship between the UPR_{mt} and depressive disorder, suggesting that the UPR_{mt} is a potential drug target for depressive disorders.

研究分野：神経薬理学, 分子薬理学

キーワード：ミトコンドリア 新規創薬ターゲット うつ病 変性タンパク質ストレス

1. 研究開始当初の背景

うつ病の成因はモノアミン仮説や海馬歯状回神経損傷仮説など幾つかの仮説が存在するが、これらの仮説は“**結果**”であり“**原因**”を説明するものではない。すなわち、何がモノアミンを含有する神経を狂わせるのか、何が海馬神経細胞の損傷を惹起するのか、といった事は依然不明である。また、うつ病に対する薬物療法では、現在使用されている“**すべて**”の薬物は何らかの形でモノアミンを調節することで抗うつ作用を発揮するが、患者の中にはこれらの薬物療法によって寛解しない難治性のうつ病が存在する。そこで、うつ病の根治や抗うつ薬の新しい作用点を見出すために、“**原因**”の解明は急務である。

ミトコンドリアはエネルギーの産生と、アポトーシスの誘導という、生と死、相反する運命を細胞に付与することができるオルガネラである。最近、神経細胞におけるミトコンドリアの役割はこれほど単純ではないことが明らかになっている。例を以下に示す。

- ◆ シナプスでの Ca^{2+} 濃度を調節し、シナプス可塑性を制御 (Levy, 2004)。
- ◆ ミトコンドリアのアポトーシス経路を介したシナプス長期抑制の制御 (Li, 2010)。
- ◆ 軸索、樹状突起の伸展の調節 (Ishihara, 2009; Kambe, 2012)。

このように、ミトコンドリアは中枢神経系の膨大なネットワークをスマートにする為に必須である。すなわち、ミトコンドリアの障害は、モノアミンを含む神経回路の攪乱や、海馬の障害の原因となる事が予想される。実際に、ミトコンドリアの障害が精神神経疾患の原因と成りうる多くの証拠が存在する。例を以下に示す。

- ◆ うつ病、双極性障害の患者における脳内 pH の酸性化 (Li, 2004)。
- ◆ 脳内 pH の酸性化によるうつ病様症状

の発症 (Coryell, 2009)。

- ◆ ミトコンドリア病患者における、うつ病、双極性障害の高い合併率 (Jou, 2009)。
- ◆ ミトコンドリア障害を発症するモデルマウスの双極性障害様の症状エンドフェノタイプ (Kasahara, 2006)。

このように、多くの研究がうつ病とミトコンドリアの障害の関連性を示唆している。

2. 研究の目的

しかしながら、うつ病の症状とミトコンドリアの障害の関連性をダイレクトに証明した報告は無い。そこで、本研究では、うつ病様症状とミトコンドリアの障害の程度を同一個体から得たデータを用いて、その相関を統計学的に解析すると共に、マウス個体を用いて、うつ病態の形成時にミトコンドリアが傷害されるメカニズムについて、詳細に解析する。これらの研究から、うつ病の“**原因**”が“**ミトコンドリアの障害**”であることを立証する。

3. 研究の方法

本研究では、マウスを用いて慢性的なストレス負荷によって形成されるうつ病様症状の程度とミトコンドリアの機能の相関を統計学的に解析し関連付け、うつ病態におけるミトコンドリア障害の関与を見出す事を目的とする。

a) うつ病モデルマウスの作成

うつ病モデルマウスは、下記 2 通りの方法で慢性的にストレスを曝露することによって作成した。慢性拘束ストレスは、先行の研究において強制水泳試験によりうつ病様の症状が観察され、良くバリデーションのとれたモデルである。さらに、コミュニケーションボックスを用いたモデルは純粋な心理的ストレスを与えることができ、よりヒトのストレスに近いモデルでの研究を可能とする。

慢性拘束ストレス：1日2時間，マウスを直径2 cm のチューブ内に拘束した．これを，2週間毎日繰り返した．

コミュニケーションボックスを用いた心理的ストレス：隣り合った電極の露出した区画と，電極の上にアクリルボードを乗せ絶縁した区画にそれぞれ1匹ずつマウスを入れた．その後，フットショックを与えた．電流を与えたマウスを身体的ストレス，電流を与えず隣り合った区画のマウスの様子を見て，悲鳴を聞いたマウスを精神的ストレスモデルとした．

b) うつ病様症状の評価

作成したうつ病モデルマウスのうつ病様症状の程度を測定する為に，以下の試験を行った．

強制水泳試験：水を張った水槽に6分間マウスを入れ，無動の潜時，積算時間を赤外線センサにより測定した．

尾懸垂試験：マウスの尾を固定後懸垂し6分間における無動の潜時，積算時間を赤外線センサにより測定した．

ショ糖嗜好性試験：1%のショ糖水溶液と水を入れた給水瓶を計2本ケージに挿し，24時間の消費量をそれぞれ測定した．

c) ミトコンドリアの機能の評価

b)のテストを全て終了したマウスから脳を摘出し，ショ糖と nagase を含む溶液中においてポッター型ホモジナイザーでホモジネート後，2,000×g で遠心分離し未破壊細胞と核を取り除き，12,000×g で遠心分離しシナプトソームとミトコンドリアを獲得した．その後，ジギトニンを用いてシナプトソームの細胞膜に穴を開けることで，脳に含まれる総ミトコンドリア画分とした．総ミトコンドリア画分をクラーク型酸素電極 mito-cell に入れ，2分間の酸素消費量を測定し，その時の酸素消費速度を Steady state とした．その後ADPを添加し，State3とState4の酸素消費

量を測定した．

一方，組織中の脂質過酸化をTBARS法にて測定した．また，トータルRNAを回収し，HSPA9, HSPD1, Ubl5, Abcb10, ClpPの発現量を指標にミトコンドリアの変性タンパク質ストレスを解析した．

a)~c)の実験計画を連続的に行い，単一個体でのうつ病様症状の程度とミトコンドリアの機能について統計学的手法を用いて関連付けを行った．

4. 研究成果

C57BL/6J マウスに慢性拘束ストレスを負荷した後，うつ様症状を評価すると，強制水泳試験と尾懸垂試験においてうつ様行動が観察された(図1)．しかしながら，ショ糖嗜好性試験においては，ナイーブマウスとうつ病モデルマウスで著明な差は認められなかった(図2)．この結果から，慢性拘束ストレス負荷によって，うつ病モデルマウスを作成することができたと考えられた．

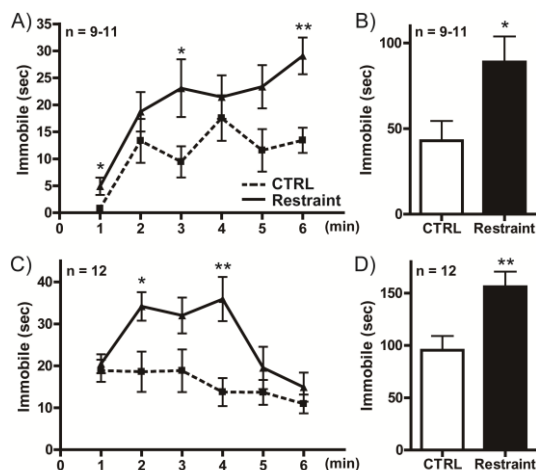


図1. 慢性拘束ストレス後における強制水泳試験および尾懸垂試験, A)とB)が尾懸垂試験の結果, C)とD)が強制水泳試験の結果, mean ± s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

一方で，コミュニケーションボックスを用いた慢性ストレスモデルにおいては，尾懸垂試験，強制水泳試験，ショ糖嗜好性試験の全て

においてうつ病様行動に著変を認めなかったと同時に、抗うつ薬のフルオキセチンによってうつ病様行動に改善効果が観察されなかった(図 3). そこで、以降の解析では、うつ病モデルマウスとして慢性拘束ストレスモデルを用いることとした。

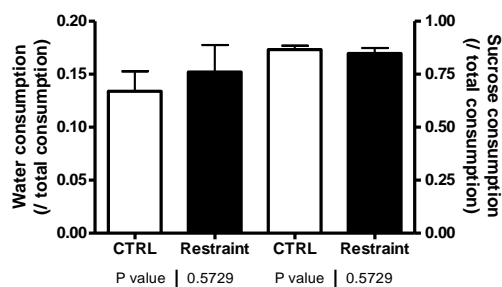


図 2, 慢性拘束ストレス後におけるショ糖指向性試験, mean ± s.e.m.

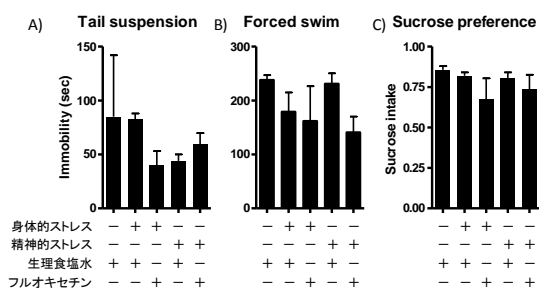


図 3, コミュニケーションボックスを用いた慢性ストレス後におけるうつ病様行動, A) 尾懸垂試験, B) 強制水泳試験, C) ショ糖嗜好性試験, mean ± s.e.m.

続いて、うつ病モデルマウスにおけるミトコンドリアの障害を観察する目的で、ナイーブマウスとうつ病モデルマウスの前脳部よりミトコンドリアを単離し、ミトコンドリアの酸素消費量を測定した。その結果、うつ病モデルマウスのミトコンドリアは慢性拘束ストレス負荷直後だけではなく、ストレス負荷終了後から 2 週間経過した後においても、ナイーブマウス由来のミトコンドリアと比較して、エネルギー需要が高い状態を模していると考えられる State3 に選択的に酸素消費

量が低い事が明らかとなった(図 4). これは、慢性拘束ストレスによって引き起こされたうつ病様症状に伴って、ミトコンドリアに何らかの障害が起こり、酸化リン酸化によるエネルギー産生系の効率が落ちているものと考えられた。

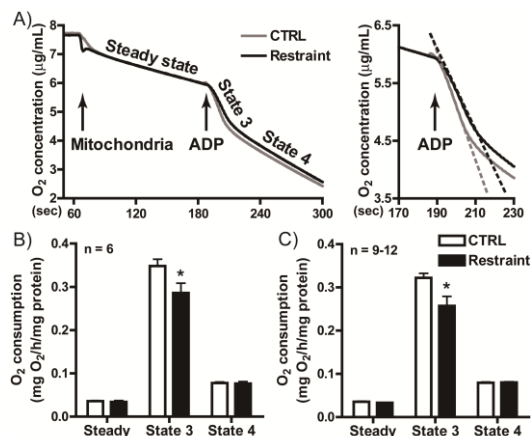


図 4, うつ病モデルマウスにおける、脳由来単離ミトコンドリアの酸素消費量の減少, A) チェンバー内の溶存酸素量を測定した代表的なグラフ, Mitochondria および ADP はそれぞれチェンバー内にミトコンドリアと ADP を添加したタイミングを示す. B) 慢性拘束ストレス負荷 1 日目における脳由来単離ミトコンドリアの酸素消費速度, C) 慢性拘束ストレス負荷 2 週間後における脳由来単離ミトコンドリアの酸素消費速度, mean ± s.e.m. *p<0.05

活性酸素はミトコンドリアの障害に伴って産生が増加することが知られている。そこで、うつ病モデルマウスの脳内における活性酸素の産生量を測定するために TBARS アッセイを行い、脂質過酸化を定量した。その結果、うつ病モデルマウスにおいて、脂質過酸化が増加していた(図 5)。

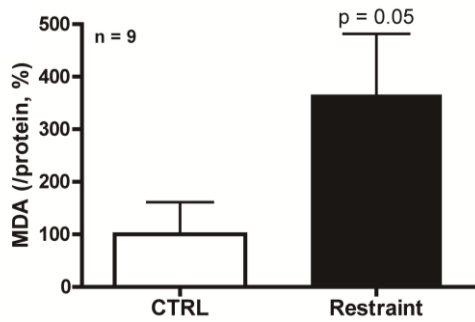


図 5, うつ病モデルマウスにおける酸化ストレスの増強, mean ± s.e.m.

さらに, ミトコンドリア障害の一つである, ミトコンドリア変性タンパク質ストレス (UPRmt)は, 酸素消費量の減少と酸化ストレスに伴って引き起こされることが知られている. そこで, UPRmtに関与する分子である, ミトコンドリア特異的分子シャペロン (Hspa9, Hspd1), UPRmt を引き起こす転写制御因子(Ubl5), ミトコンドリアからの逆行性シグナル輸送担体(Abcb10), ミトコンドリア特異的タンパク分解酵素(ClpP)の発現をリアルタイム PCR 法で定量すると, 慢性拘束ストレス負荷直後において, 全ての分子の発現はナীবマウスをうつ病モデルマウス間で差がなかった. しかしながら, ストレス負荷から2週間後のうつ様行動が見られたタイミングにおいては, 全ての分子の発現が有意に増強していた(図6). さらに, 個々のマウスにおいて, 強制水泳試験で観察されたうつ様行動と UPRmt に関与する分子の発現の相関を解析すると, 全ての分子の発現がうつ様行動の程度と正に相関する事が明らかとなった(図7).

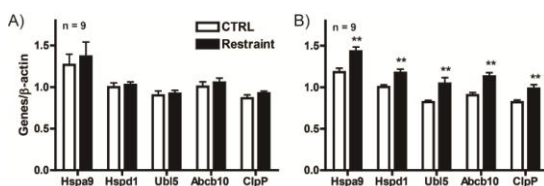


図 6, うつ病モデルマウスにおける UPRmt, A) 慢性拘束ストレス直後における UPRmt

関連分子の発現, B) 慢性拘束ストレスから2週間後における UPRmt 関連分子の発現, mean ± s.e.m. **p<0.01

以上の事から, マウスにおいてうつ様症状とミトコンドリアの障害には関連性が存在し, 特に UPRmt はうつ様症状に非常に密接に関連する可能性が示された. 既存の抗うつ薬は全てモノアミン仮説に基づき, モノアミン神経系を直接および間接的に調節することで抗うつ作用を発揮する. 本研究の成果から, UPRmt もまた抗うつ薬のターゲットの1つとなる可能性が示された. これらの結果をまとめ, 原著論文として報告した(Y. Kambe and A. Miyata, Neuroscience letters, 2015)

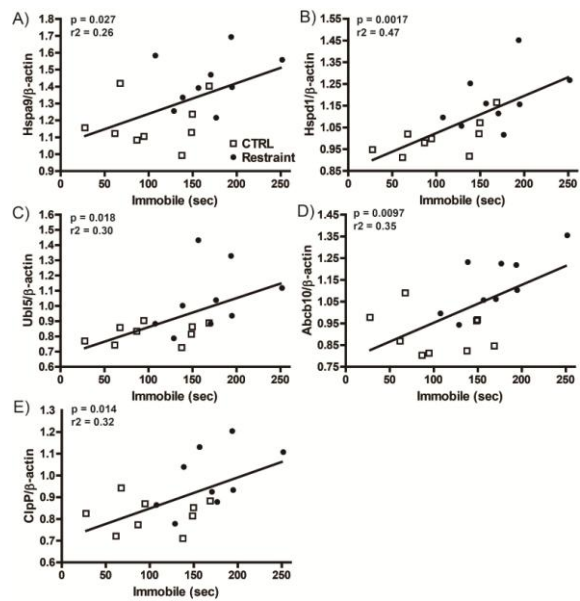


図 7, UPRmt 関連分子の発現と強制水泳試験における無動時間の線形回帰, A) Hspa9, B) Hspd1, C) Ubl5, D) Abcb10, E) ClpP, スピアマンの順位相関分析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

1. 査読ありの原著論文, Kambe Y, and Miyata A. Potential involvement of the mitochondrial unfolded protein response in depressive-like symptoms in mice. *Neurosci Lett.* 588. 166-171. 2015
2. 査読ありの原著論文, Bohara M,

Kambe Y, Nagayama T, Tokimura H, Arita K, and Miyata A. C-type natriuretic peptide modulates permeability of the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34. 589-596. 2014

3. 査読ありの原著論文, Miura A, Kambe Y, Inoue K, Tatsukawa H, Kurihara T, Griffin M, Kojima S, and Miyata A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor (PAC1) gene is suppressed by transglutaminase 2 activation. *J Biol Chem.* 288. 32720-32730. 2013

[学会発表] (計 9 件)

1. 用皆 正文, 栗原 崇, 神戸 悠輝, 高崎 一朗, 宮田 篤郎, 脊髄における PACAP 特異的受容体の刺激はアストロサイト活性化を介して長期機械的アロディニア反応を誘発する, 第 88 回日本薬理学会年会, 平成 27 年 3 月 18-20 日, 愛知県名古屋国際会議場
2. 神戸 悠輝, 中島 優, 新谷 紀人, 橋本均, 宮田 篤郎, アストロサイトにおける下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによるグリコーゲン代謝の活性化, 第 88 回日本薬理学会年会, 平成 27 年 3 月 18-20 日, 愛知名古屋国際会議場
3. 神戸 悠輝, 中島 優, 新谷 紀人, 橋本均, 宮田 篤郎, アストロサイトにおける下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによるグリコーゲン代謝の活性化, 第 5 回鹿児島神経科学会, 平成 27 年 2 月 21 日, 鹿児島県 鹿児島大学
4. 神戸 悠輝, 宮田 篤郎, 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる脳内グリコーゲン代謝の活性化 ~培養アストロサイトを用いた研究~, 第 67 回薬理学会西南部会, 平成 26 年 11 月 23 日, 福岡県 産業医科大学
5. Atsuro Miyata and Yuki Kambe, Implication of Mitochondria in PACAP

signaling: modulation of energy metabolism in brain. 20th International Symposium on Regulatory Peptides, 平成 26 年 9 月 7-10 日, 京都府 京都ガーデンパレス

6. Manoj Bohara, Yuki Kambe, Takashi Kurihara, Tetsuya Nagayama, Hiroshi Tokimura, Kazunori Arita, Atsuro Miyata, C-type natriuretic peptide modulates permeability of the blood-brain barrier. *Neuroscience* 2013, 平成 25 年 11 月 9-13 日, アメリカ合衆国 (サンディエゴ) 国際会議場,
7. 神戸 悠輝, Manoj Bohara, 栗原 崇, 永山 哲也, 有田 和徳, 宮田 篤郎, C 型ナトリウム利尿ペプチドによる血液脳関門透過性の調節, 第 4 回鹿児島神経科学会, 平成 25 年 7 月 20 日, 鹿児島県 鹿児島大学
8. 神戸 悠輝, Manoj Bohara, 栗原 崇, 永山 哲也, 有田 和徳, 宮田 篤郎, C 型ナトリウム利尿ペプチドによる血液脳関門透過性の調節, 第 31 回内分泌代謝学サマーセミナー, 平成 25 年 7 月 11-13 日, 大分県 ゆふいん山水館
9. 神戸 悠輝, 宮田 篤郎, PACAP による神経突起伸展促進作用におけるミトコンドリアの寄与, 第 15 回ブレインサイエンス研究会, 平成 25 年 6 月 1-2 日, 福岡県 休暇村志賀島

[その他]

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~pharmacology/>
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~pharmacology/ukikambe.html>
<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/512228.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

神戸 悠輝 (Kambe Yuki)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 60549913