

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2013～2014  
 課題番号：25861036  
 研究課題名(和文) ストレス脆弱性形成機構としてのミクログリアのエピジェネティクスに関する研究  
  
 研究課題名(英文) Research of microglial epigenetics as a mechanism of constructing stress vulnerability  
  
 研究代表者  
 山脇 洋輔 (YAMAWAKI, YOSUKE)  
  
 広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教  
  
 研究者番号：90584061  
  
 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)：本研究の目的は、ストレス脆弱性形成のメカニズムを脳内免疫の観点から解明することである。LPSを投与したマウスにおいて海馬ミクログリアの持続的な活性化が観察されるとともに、強制水泳試験における無動時間の延長を認めた。HDAC阻害薬である酪酸ナトリウム(SB)の投与は、ミクログリアの活性化を抑制するとともに、強制水泳試験における無動時間の延長を抑制した。LPSおよびSBを投与したマウスから単離したミクログリアに対してマイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現を解析した結果、マクロファージの機能調節や抗うつ薬の作用機序などに関わる複数の候補遺伝子が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The object of this study is to elucidate a mechanism of stress vulnerability from a view of neuro-immune system. Treatment of lipopolysaccharide (5 mg/kg, i.p.) induced persisting microglial activation in hippocampus and elongated immobility time in forced swim test (FST). Repeated treatment with sodium butyrate (SB), HDAC inhibitor, inhibited the LPS-induced microglial activation and decreased the immobility time in FST. cDNA Microarray using isolated hippocampal microglia treated with LPS and/or SB revealed the several candidate genes, relating to regulating macrophage function, immune system and mechanism of antidepressant.

研究分野：精神薬理学

キーワード：うつ病 ストレス脆弱性 ミクログリア エピジェネティクス HDAC阻害薬 精神疾患 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病は抑うつ気分、興味・関心の喪失などの精神症状および睡眠障害、食欲低下などの身体症状を呈する疾患である。うつ病の発症には遺伝的要因に加えて、環境要因などによるエピジェネティックな変化によるストレス脆弱性の亢進などが関与している。申請者はこの概念に基づき、クロマチン構造を変化させるヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) 阻害薬が海馬において遺伝子発現変化を伴って、抗うつ効果を示すことを見出した。しかしながら、HDAC 阻害薬における抗うつ効果の決定的な因子は世界的に見ても未だ明らかとされていない。

一方で、強力な免疫惹起剤である lipopolysaccharide (LPS) 投与によって、うつ病様行動と類似した “sickness behavior” が引き起こされることが知られており、また、慢性的なストレスによる脳内炎症性サイトカインの上昇が神経新生の抑制を伴ってうつ病様行動を引き起こすことや、社会的敗北ストレスによって prefrontal cortex において脳内免疫を担うミクログリアが活性化されるなど、うつ病と脳内免疫との関連性が明らかとなりつつある。さらに、HDAC 阻害薬は培養系ミクログリアの過剰な活性化を抑制するという報告も存在していることから、ミクログリアの活性化にはエピジェネティックな調整機構が存在する可能性を示している。

これらの事実から、ストレス脆弱性の形成は、海馬ミクログリアのエピジェネティックな変化に基づくストレス応答性の増大による過剰な活性化が関連しており、HDAC 阻害薬はこれを抑制することで抗うつ効果を発揮する可能性が予想される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ストレス脆弱性形成のメカニズムを、脳内免疫の観点から解明することである。本研究において、海馬ミクログリアが HDAC 阻害薬の抗うつ効果の標的であることとそのメカニズムを解明することは、うつ病の予防法・治療法の開発に新たな知見を与える可能性をもたらすと考える。

## 3. 研究の方法

本実験を遂行するに当たり、常翔学園 広島国際大学および広島大学における動物実験に関する指針に従った。

### A-1: 母子分離

Sprague-Dawley (SD) ラットの仔を誕生 2 日目から 14 日目までの 13 日間、母親から 1 日 3 時間分離した。21 日齢に達した時点で、2-3 匹/ケージとなるように離乳を行い、実験に使用するまで飼育した。

### A-2: 薬物投与

ラットが 7 週齢に達した時点で、HDAC 阻害薬として、酪酸ナトリウム (SB) を繰り返し投与 (1.2 g/kg, 1 日 1 回, 7 日間, 腹腔内投与) した。

### A-3: 行動試験

#### (a) 拘束ストレス負荷

ラットが 8 週齢に達した時点で、拘束バグを用いてラットを 14 日間 (1 日 2 時間) 拘束した。

#### (b) 強制水泳試験

拘束終了翌日に、30 cm の高さに水を張ったアクリル製の円筒 (直径 25 cm, 高さ 50 cm, 水温 25 ) にラットを入れて、行動を録画した。録画した映像から、0-5 分間における無動時間を測定した。

### A-4: 定量的 PCR 解析

目的組織から抽出した total RNA を逆転写することで得た cDNA を鋳型として、定量的 PCR 法によって種々の遺伝子発現量を定量した。

### B-1: 薬物投与

マウス (7 週齢、雄) に対して、lipopolysaccharide (LPS) を、種々の用量 (0.1, 1.0, 5.0, 10 mg/kg) で腹腔内投与した。

LPS 投与翌日から HDAC 阻害薬として、酪酸ナトリウム (SB) を繰り返し投与 (1.2 g/kg, 1 日 1 回, 7 日間, 腹腔内投与) した。

### B-2: 行動試験

#### (a) 自発運動量測定

赤外線を横切った回数をカウントすることができる立方体 (48 cm x 48 cm x 48 cm) の中心にマウスを置き、5 分間の行動量を測定した。

#### (b) 強制水泳試験

LPS 投与 7 日後に、17 cm の高さまで水を張ったアクリル製の円筒 (直径 12 cm, 高さ 25 cm, 水温 25 ) にマウスを入れ、行動を録画した。録画した映像から、2-6 分間における無動時間を測定した。

### B-3: 定量的 PCR 解析

目的組織から抽出した total RNA を逆転写することで得た cDNA を鋳型として、定量的 PCR 法によって種々の遺伝子発現量を定量した。

### B-4: Western Blot 解析

目的組織からタンパクを抽出し、SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転写させた。PVDF 膜をブロッキング後、一次抗体液中に浸して、低温下で一晩振とうした。翌日、2 次抗体を反応させ、発光試薬を用いて検出した。

### B-5: cDNA マイクロアレイ解析

MACS 磁気細胞分離法によって、マウス海

馬から単離したミクログリアから total RNA を抽出した。抽出した total RNA を用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (A-1) 母子分離によるストレス脆弱性の形成

母子分離を行ったラットは、拘束ストレスの有無にかかわらず、強制水泳における無動時間が対照群に比べて有意に延長した。この結果から、母子分離によって形成されたストレス脆弱性は成長後も持続することが明らかとなった。

##### (A-2) 母子分離による脳内遺伝子発現変化および HDAC 阻害薬の効果

母子分離によるストレス脆弱性の形成に炎症性サイトカインが関わるかを検討するために、ラット誕生後 7 日目 (P7)、14 日目 (P14)、21 日目 (P21)、および 10 週齢時の海馬および、prefrontal cortex (PFC) における TNF- $\alpha$  の遺伝子発現変化を検討した。その結果、P7、P21 の海馬における TNF- $\alpha$  の有意な発現上昇を観察した。一方で、P7、P14 の PFC における TNF- $\alpha$  の有意な発現低下を観察した。加えて、TNF- $\alpha$  の発現低下と PFC における GFAP の発現低下には相関が認められた。さらに、10 週齢時の PFC において、TNF- $\alpha$  の発現は対照群と比べて変化がない一方で、GFAP の発現は低下したままであった。酪酸ナトリウムを投与したところ、GFAP の発現に変化は観察されなかった。

##### (B-1) ミクログリア活性化条件下におけるうつ病様行動の誘発

慢性ストレス負荷時には、脳内炎症性サイトカインレベルが上昇しているという報告や、ミクログリアが活性化しているとの報告が存在する為、LPS 投与によって人為的にミクログリアを活性化させた状態でうつ病様行動が誘発されるかを検討した。

LPS を種々の用量 (0.1, 1.0, 5.0, 10 mg/kg) で腹腔内投与し、7 日後に PFC および海馬において、ミクログリアが持続的に活性化しているかを検討した。ミクログリアの活性化はそのマーカーである ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) の mRNA を測定することで評価した。10 mg/kg は PFC、海馬の双方において顕著な Iba1 の発現上昇を示す一方で、致死性であった (致死率 67%)。その他の用量ではマウスの致死率は 0% であった。LPS 投与 7 日後の PFC と海馬において、Iba1 の発現量を検討したところ、海馬においてのみ 5 mg/kg の用量で Iba1 の有意な発現上昇が観察された。

次いで、LPS (5 mg/kg) 投与 7 日後のマウスに対して、行動解析を行った。その結果、LPS を投与したマウスは、自発運動量に差はない一方で、強制水泳試験における無動時間の有意な延長を示した。

これらの結果から、海馬ミクログリアの活

性化状態において、マウスはうつ病様行動を示すことが明らかとなった。

##### (B-2) HDAC 阻害薬によるミクログリア抑制効果および抗うつ効果の検討

LPS 投与翌日から、SB を繰り返し投与した (1.2 g/kg, 1 日 1 回, 7 日間, 腹腔内投与)。SB 投与によって、海馬ヒストン H3, H4 のアセチル化は有意に亢進した。SB 投与終了後、行動試験を行った。その結果、SB 投与は活動量に影響を与えない一方で、LPS によって延長された強制水泳試験における無動時間を減少させた。加えて、SB 投与は海馬における Iba1 の遺伝子発現を有意に低下させた。これらの結果から、SB は LPS によって誘発された海馬ミクログリアの活性化および、うつ病様行動を抑制することが明らかとなった。

##### (B-3) LPS および HDAC 阻害薬によるミクログリアの遺伝子発現変化の網羅的解析

LPS 投与翌日から、SB を繰り返し投与したマウスの海馬から MACS 磁気細胞分離法によって、ミクログリアを単離した。得られたミクログリアから抽出した total RNA を基に cDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、LPS 投与によって発現上昇する遺伝子 (対 control) は 303 個、SB によって発現低下する遺伝子 (対 LPS 投与群) は 280 個であり、これらのうち共通するものは 67 個であった。これらの中には、Iba1 が含むドメインである EF hand calcium binding domain 1 (Efcab1) が含まれていた。一方、LPS 投与によって発現低下する遺伝子 (対 control) は 251 個、SB によって発現増加する遺伝子 (対 LPS 投与群) は 238 個であり、これらのうち共通するものは 15 個であった。これらの中には、マクロファージやミクログリアの機能に関連するものや、抗うつ薬の作用に関する報告がなされている分子などが含まれていた。

本研究において、LPS による持続的なミクログリア活性化がうつ病様行動を引き起こすことを示した。また、HDAC 阻害薬が海馬においてクロマチンリモデリングを介して、ミクログリアの活性化を抑制するとともに、その機能に関連する遺伝子の発現変化を引き起こす可能性を示した。

#### 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 2 件)

1. Fuchikami M, Yamamoto S, Morinobu S, Okada S, Yamawaki Y, Yamawaki S. The potential use of histone deacetylase inhibitors in the treatment of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **15**, 00059-7, 2015 (査読有)

2. Machino A, Kunisato Y, Matsumoto T, Yoshimura S, Ueda K, **Yamawaki Y**, Okada G, Okamoto Y, Yamawaki S. Possible involvement of rumination in gray matter abnormalities in persistent symptoms of major depression: an exploratory magnetic resonance imaging voxel-based morphometry study. *J Affect Disord.* **168**, 229-35, 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. **Yamawaki Y**, Yoshioka N, Nishida M, Murai A, Kanematsu T, Akagi H. Sodium Butyrate ameliorates inflammation-induced depression-like behavior via inhibition of microglial activation, *CINP2015*, June 3-5 2015, Dublin /Ireland
2. **山脇洋輔**, 吉岡伯華, 西田美沙子, 村井彩佳, 赤木宏行 ミクログリア抑制効果に基づくHDAC阻害薬の抗うつ効果の検討 *日本薬学会 第135年会*, 2015年3月25-28日, 神戸
3. **山脇洋輔**, 吉岡伯華, 西田美沙子, 村井彩佳, 大植香菜, 林内優樹, 兼松隆, 赤木宏行 酪酸ナトリウムによる炎症誘発性うつ病様行動の改善効果, *第88回日本薬理学会年会*, 2015年3月18-20日, 名古屋
4. 林内優樹, 北山友也, **山脇洋輔**, 岡田貢, 兼松隆. PRIP 遺伝子欠損マウスにおける propofol 麻酔作用の変調. *第88回日本薬理学会年会*, 2015年3月18-20日, 名古屋
5. **山脇洋輔**, 高野敦子, 仲西萌絵, 玉田紘太, 畠中史幸, 明智煥, 内匠透. 概日リズムとうつ病様行動の分子相関: GSK3 $\beta$ によるPER2リン酸化 A molecular link between circadian rhythm and depression: PERIOD2 phosphorylation by GSK3 $\beta$ . *第43回日本神経精神薬理学会* 2013年10月24-26日, 沖縄
6. **山脇洋輔**, 高野敦子, 仲西萌絵, 玉田紘太, 畠中史幸, 内匠透. 概日リズムとうつ病の調節機構としてのPERIOD2-glycogen synthase kinase 3 $\beta$ 経路 A molecular link between PERIOD2 and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  as a possible regulator in circadian rhythm and depression, *Neuro 2013*, 2013年6月20-23日, 京都

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山脇 洋輔(YAMAWAKI YOSUKE)

広島大学・大学院・医歯薬保健学研究院・  
助教

研究者番号：90584061

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし