

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860956

研究課題名(和文) 脳内Ant1機能改変マウスを用いたミトコンドリア機能障害と双極性障害の関与の検証

研究課題名(英文) Verification of involvement of mitochondrial dysfunction and bipolar disorder using brain specific Ant1 conditional knockout mice

研究代表者

加藤 智朗 (Kato, Tomoaki)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：40598439

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)：本研究では、神経系特異的Ant1コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作成し、Ant1の機能と双極性障害に関連する行動表出の関係性を調べた。その結果、Ant1 cKOマウスは衝動性の抑制、特に運動衝動性以上に認知的衝動性において顕著な抑制を示した。また、Ant1 cKOマウスの側坐核のモノアミン定量から、セロトニンやドーパミン代謝活性の亢進が示された。これらのことから脳内におけるミトコンドリアの機能的変化により、神経伝達物質としてのモノアミンの制御、ひいてはマウスにおける価値判断をも変えることを示唆し、このような分子基盤変化が障害発症の一因になっているのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated Ant1 conditional knockout (cKO) mice to investigate the relationship between mitochondrial function and bipolar disorder like phenotype manifestation. As a result, we found that Ant1 cKO mice showed behavioral phenotype indicating suppression of impulsivity, especially cognitive impulsivity rather than motor impulsivity. In addition, Ant1 cKO mice showed promotion of serotonin and dopamine metabolism in the nucleus accumbens. These results suggest that mitochondrial function in brains has important roles in regulation of monoamines which act as neurotransmitters and in judgment of the reward value. These molecular mechanisms may be one of causes of bipolar disorder onset.

研究分野：精神神経科学

キーワード：精神疾患 ミトコンドリア 気分障害 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

双極性障害の国内における障害有病率は0.7%といわれ(1)、患者や社会が受ける損失は甚大であるが、根本的な病因は未解明で、診断や治療は困難である。これまでの研究で、ミトコンドリアの機能的障害が双極性障害の発症に関与しているという報告は多く出されているが(2)、本疾患研究に有用な実験モデルは稀少であることが、病態解明が進まない一つの大きな要因だと考えられる。

- (1) 川上憲人, 医学のあゆみ 219:925-929, 2010
- (2) Kasahara T. et al. Mol Psychiatry 11 (6) : 577-93

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア病の一つである進行性外眼筋麻痺(PEO)と双極性障害を優性遺伝形式で発症する家系で変異が見つかった Ant1(*Slc25a4* 遺伝子)に関して(3)、神経特異的コンディショナルノックアウトマウス(Ant1 cKO)を作成し、神経におけるミトコンドリア機能障害によってマウスのどのような行動表現型が表出されるかを明らかにし、双極性障害の病態との関連性から発症メカニズムの一端を解明することを目的とした。

- (3) Siciliano G. et al. Neuromuscul Disord. 13 (2) : 162-5

3. 研究の方法

(1)Ant1 遺伝子の成体マウス神経機能における役割を調べるため、International knockout mouse consortium(IKMC)から購入した Ant1 flox マウスを、まず CAG-flpe マウス(理研 BSI 系原重美シニアチームリーダーより譲与)との掛け合わせにより FRT に挟まれたゲノム領域を欠失させたマウスを作成し、そのマウスと Jackson laboratory から購入した nestin-Cre マウスとの掛け合わせにより神経系特異的に Ant1 の第2及び第3エクソンを欠失したマウスを作成した(図1)。生まれてくるマウスのうち Cre 遺伝子が挿入されたアリルを持たないマウスをコントロールマウスとし、Ant1 欠失ヘテロ接合型及びホモ接合型マウスと比較した。

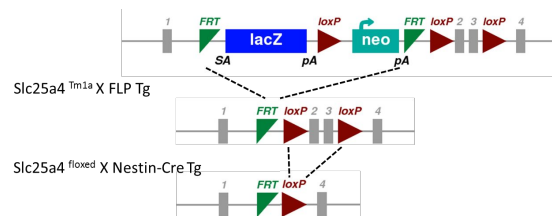


図1 Ant1(*Slc25a4* 遺伝子) cKO マウスのアリル構造

(2)インテリケージ(ニューロサイエンス社)と呼ばれる集団飼育下で個々のマウスの行動が解析できる装置にトランスポンダーを

埋め込んだ Ant1 cKO マウスとコントロールマウス(Cre アリルなし)を入れて飼育し、飲水ボトルを設置したコーナーへの進入回数や滞在時間、飲水量を測定することで脳機能を調べる試験を行った。マウスを装置内の環境に慣らした後、下記項目に関して評価できる試験を行った。

- ・サーカディアンリズム
- ・空間記憶学習
- ・恐怖記憶学習
- ・注意力
- ・焦燥
- ・報酬遅延割引課題

報酬遅延割引課題とは水とマウスにとって嗜好性が高いサッカリン水の2つの報酬の間で、サッカリン水のみが遅延時間を設定し、遅延時間を延長していくことにより報酬に対する価値が目減りしていく大きさを評価する試験である。

(3)5-choice serial reaction time task (5-CSRTT)と呼ばれる壁面にある5つ穴のうちランダムに光が点灯した1つの穴でマウスがノーズポークを正しく行えた場合にシュガーペレットを報酬として与える行動試験を行った。この試験では光が点灯するまでの待ち時間を設定することで衝動性を評価することができる。

(4)脳内の神経伝達物質の代謝変化を調べるために、側坐核や縫線核領域を切り出し、組織からモノアミンを抽出し、HPLCを用いて定量を行った。

(5)Ant1 cKO 由来ミトコンドリアの性質を調べるため、成体マウス大脳皮質由来細胞からミトコンドリアを単離し、FDSS(浜松フォトリクス社)を用いてカルシウムを一定のタイミングで添加していき、ミトコンドリアがカルシウムを吸収できる閾値を越した時に誘発される膜透過遷移現象(mPTP)の起こり安さに関して解析を行った。

(6)Ant1 の機能喪失効果を調べるために Neuro2a 細胞に Ant1 をノックダウンする miRNA 発現ベクター(サーモサイエンティフィック社)と ATP の濃度を FRET により測定する GOATeam を発現するベクター(京都大学今村博臣博士より譲与)をトランスフェクションし、コンフォーカル顕微鏡(オリンパス社、FV1000)を用いてタイムラプスイメージングを行って細胞質及びミトコンドリア内の ATP 濃度の変化を調べた。

(7)縫線核にあるセロトニン産生ニューロンのミトコンドリア機能が正常であるかどうかを調べるために、凍結切片を作成して COX/SDH/TPH に対する免疫染色を行った。画像取得はコンフォーカル顕微鏡(同上)を用いて行った。

(8)変異ミトコンドリア DNA(mtDNA)の蓄積が起り得るかどうかを調べる目的で、mtDNAの複製開始領域に当たる D-loop から外側に短い伸長時間で検出する方法を試した。また、long PCR で全長 mtDNA を増幅し、イルミナ MiSeq シーケンサーを用いてシーケンス手法を確立した。

4. 研究成果

(1)掛け合わせにより作出した神経系特異的 Ant1 cK0 マウスに関して脳切片を用いた *in situ* hybridization 及び、脳や他の臓器から抽出したタンパク質に対するウェスタンブロッティングを行って神経組織だけで Ant1 の発現が消失していることを確かめた(図2)。生まれてきたマウスは特に顕著な身体的特徴を示さなかった。

Slc25a4 ISH / DAPI

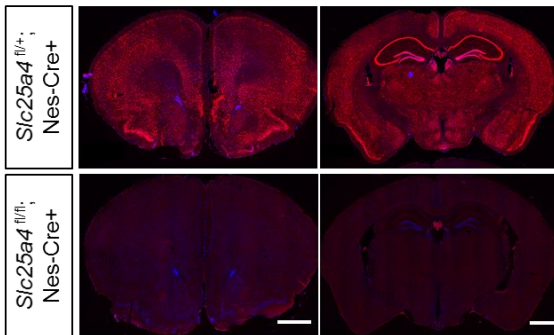


図2 Ant1(Slc25a4) に対する *in situ* hybridization

(2)インテリケージを用いた行動解析を行うと、サーカディアンリズム、空間記憶学習、恐怖記憶学習、注意力を調べる試験では Ant1 cK0 マウスとコントロールマウスを比較して有意な差は見られなかったが、遅延割引課題においては、遅延時間を延長してもサッカリン水を選択するという特徴がみられた(図3)。

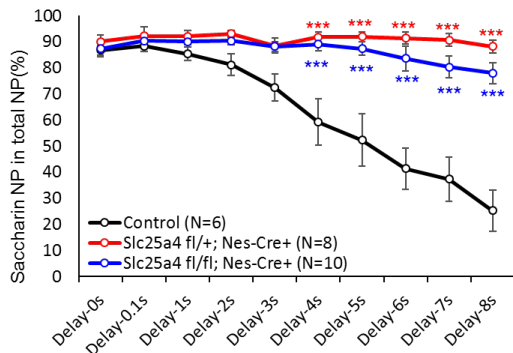


図3 報酬遅延割引課題(横軸は遅延時間、縦軸はサッカリン水選択率を示す。)

Ant1 cK0 マウスとコントロールマウスで、元々のサッカリン水への嗜好性に差は見られなかったことから、Ant1 cK0 マウスは認知的衝動性が抑制されているため報酬獲得の遅延に寛容で、サッカリン水の価値が遅延時間によって目減りしにくい傾向があるのではないかと考えられた。このような行動パターンはホモ接合型とヘテロ接合型 Ant1 cK0 の両者においてみられた。

(3)衝動性に関してさらに詳しく解析するために、5-CSRTT を行ったところ、特にヘテロ接合型 Ant1 cK0 マウスはトレーニング完了後においても omission trial (脱落試行)の回数が多く、反応時間は遅い傾向にあるが、誤答の割合は低下していた。衝動性の指標となる premature nosepoke は低下傾向を示したが、有意な差ではなかった。これらのことからヘテロ接合型 Ant1 cK0 マウスは衝動性が抑制されており、運動衝動性 (motor impulsivity) 以上に特に認知的衝動性 (cognitive impulsivity) が抑制されているのではないかと考えられた。

(4)このような行動的特徴の変化がどういった分子基盤に基づくものかを明らかにするため、まず、衝動性に関わることが知られているセロトニンやドーパミンを含むモノアミンの代謝に関して調べたところ、ヘテロ接合型 Ant1 cK0 マウスでは側坐核においてセロトニンやドーパミンの代謝活性が亢進していることが示された。セロトニンとドーパミンの両方の代謝にモノアミノキシダーゼ (MAO) が関わることから MAO の活性が亢進しているのではないかと考えられた(図4)。

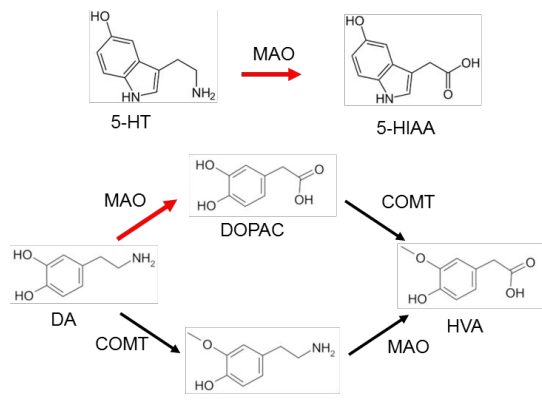


図4 モノアミン代謝

(5)大脳皮質由来細胞から単離したミトコンドリアの mPTP を調べたところ、ホモ接合型 Ant1 cK0 マウス由来ミトコンドリアはカルシウム受容能が低下し、少ない量のカルシウム添加によって mPTP が誘導されていた。

(6)Ant1 遺伝子をノックダウンする miRNA 発現ベクターを導入した Neuro2a 細胞では、オリゴマイシン A を添加して ATP 合成を阻害した後でも、ミトコンドリア内の ATP 濃度が高いまま維持されていた。これは Ant1 発現抑制によりミトコンドリアと細胞質間におけ

る ADP, ATP 交換反応が抑制されたためだと考えられた。

(7)縫線核にあるセロトニン産生ニューロンでミトコンドリア機能に違いがあるかどうかを確かめるために凍結切片を作成し、COX/SDH/TPH 共染色を行ったところ、背側縫線核の中心部に COX 陰性細胞が局在していることを見出したが(図 5)、この現象は genotype に関わらずコントロールマウスでも見られた。このことから、背側縫線核の中心部にあるセロトニン産生ニューロンはミトコンドリア機能として他の領域の神経細胞とは違う特徴を持っていると考えられるが、そのことがセロトニン生産や代謝、或いは行動表現型にどう影響しているかは現時点で不明である。

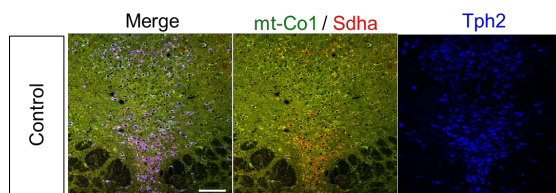


図 5 背側縫線核における COX/SDH/TPH 共染色

(8)ミトコンドリアの機能的な違いにより変異 mtDNA が蓄積している可能性を調べるために、まず、PCR によって欠失が起こった mtDNA だけを増幅して検出する方法を試みたが、顕著な欠失 mtDNA の蓄積は確認されなかった。そこで、long PCR で全長 mtDNA を増幅し、イルミナ MiSeq シーケンサーを用いてシーケンスを行い塩基置換変異が起こりやすいかどうかを調べる目的で、手法の開発に取り組んだ。現時点で Ant1 cKO マウスの mtDNA で塩基置換変異が誘発され得るかどうかは不明であるが、今後調べられるものと期待する。

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 1 件)

T.Kasahara*, A Takata*, TM Kato*, M Kubota-Sakashita, T Sawada, A Kakita, H Mizukami, D Kaneda, K Ozawa, T Kato. Depression-like episodes in mice harboring mtDNA deletions in paraventricular thalamus. *Molecular Psychiatry* 21, 39-48. (2016) 査読有

*These authors contributed equally to this work

[学会発表](計 1 件)

加藤智朗、藤森典子、水上浩明、小澤敬也、加藤忠史、2014 年 9 月 29 日~2014 年 10 月 1 日奈良県文化会館、Involvement of the paraventricular thalamic nucleus (PVT) in mood regulation

[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

理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム

<http://www.brain.riken.jp/labs/mdmd>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 智朗(KATO, Tomoaki)

2016 年 6 月~2017 年 3 月

京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門高須研究室ゲノム評価グループ

特定研究員

2014 年 4 月~2016 年 5 月

国立研究開発法人理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム

研究員

研究者番号: 40598439

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者