

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870282

研究課題名(和文) インターフェロン誘発性うつ病モデル動物の作製と脳細胞動態の解析

研究課題名(英文) Establishment of interferon induced depression model monkey and analysis of brain cell abnormality

研究代表者

林 義剛 (Hayashi, Yoshitaka)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：10631567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大うつ病は、抑うつ症状や興味・喜びの減退、不安などを特徴とした精神疾患であり、罹患率が高く、自殺企図にもつながることから社会的問題となっている。本研究では、大うつ病の病態解明を目指し、脳構造がヒトにより近いカニクイザルを用い、肝炎などの治療薬として使用されており、副作用としてうつ病を併発するインターフェロンの慢性投与によるうつ病モデルの作製と病態評価を行った。また、投与後の脳組織の細胞動態の変化についても検討した。

研究成果の概要(英文)：Major depression is one of mental disorders and is a major risk for suicide. The symptoms of major depression consist of low mood, loss of interest, low energy and so on. Despite lots of studies employing human patients and rodent models, the etiology of major depression has been elusive. Based on the results of my previous study investigating postmortem human brains, I hypothesized that the impaired function of prefrontal region is tightly associated with the pathogenesis of major depression, which prompted me to study non-human primate because the brain of monkey, but not rodent, is quite similar to that of human in size and in function. In this study, I tried to establish a monkey model of depression by chronic administration of interferon- α , which induces depression in 20-50% of hepatitis patients who receive interferon- α . After the evaluation of behavioral changes found in this monkey model, the brains were collected and cellular kinetics was examined in detail.

研究分野：精神神経科学

キーワード：うつ病モデル動物 カニクイザル インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省が特に対策を進める5大疾患に精神疾患を加えたように、精神疾患の病態解明が期待されている。これまで、大うつ病患者の脳画像研究において、複数の脳部位において萎縮や脳血流・代謝の異常が報告されている。脳画像研究において異常が見られた脳部位で、患者死後脳の病理学的解析が多く行われ、前頭前野や前部帯状回では神経細胞体サイズの縮小やグリア細胞密度の減少が報告されている。また、気分障害前頭前野の遺伝子発現解析では、オリゴデンドロサイト・ミエリン関連遺伝子の発現異常が多く報告されている。研究代表者は、フローサイトメーターを用いた迅速かつ簡便な脳細胞数定量法を新規に確立し、気分障害患者死後脳を解析し、前頭極灰白質においてオリゴデンドロサイト系譜細胞の減少を認めた(Hayashi et al., Mol Psychiatry 2011; Hayashi et al., PLoS ONE 2012)。この結果は、これまでゲノム解析や脳画像研究において報告されてきた所見に、細胞レベルの説明を与え得るものだと考える。この異常の病態メカニズムを解明するためには、うつ病の動物モデルを用いた解析が必要であるが、げっ歯類で頻用されるストレスモデル(慢性軽度ストレス負荷や強制水泳、社会敗北ストレス、早期離乳などの環境ストレス)が、ヒトのうつ病をどの程度反映しているかについては議論がある。精神機能を解析することを考えると、非ヒト霊長類のうつ病モデルの作製が必要である。

C型肝炎などの治療薬として用いられているインターフェロン α は、投与した患者の約20-50%がうつ症状を呈することが報告されている。そこで、我々もインターフェロン α 慢性投与によるうつ病モデルマウスの作製を試み、行動や神経幹細胞に対する影響を解析した。その結果、強制水泳による無動時間の増加といったうつ様行動の増加や、*in vitro*条件下での神経幹細胞の自己複製能の減退を見出した。これは、インターフェロン α が直接神経幹細胞に作用すること、また幹細胞増殖とうつ様行動が関連する可能性を示すと考えている。さらに、大うつ病のように精神疾患の病態を調べるためには、脳構造や機能がヒトに近い霊長類を用いた研究が必要である。滋賀医科大学には、大規模なカニクイザルのコロニーがあり、現在600頭以上を飼育している。本研究では、インターフェロン α を慢性投与したカニクイザルうつ病モデルの作製と評価、マウスで見られた神経幹細胞の減少や大うつ病患者死後脳で観察されたオリゴデンドロサイト系譜細胞の異常などに焦点をあて研究を展開する。マウス実験やヒト死後脳解析で得られた知見のギャップを、カニクイザルを用いた研究で埋めることにより、大うつ病の病態解明を目指すものである。

2. 研究の目的

(1) 大うつ病の病態解明を目指し、カニクイザルを用いたうつ病モデル動物の作製と、その病態評価および死後脳での脳細胞動態の変化を明らかにすることを目的とする。

(2) 大うつ病患者で見られたオリゴデンドロサイト系譜細胞の異常は、生後のオリゴデンドロサイトの増殖・分化と関連すると考えられることから、成体カニクイザルにおけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖について調査し、大うつ病との関連について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) インターフェロン α 誘発性カニクイザルうつ病モデルの作製

性成熟を迎えた健康な雄のカニクイザルに対し、インターフェロン α をヒトに準じた投薬量(3.5 μ g/kg/週)で、週1回12週間の皮下に慢性投与を行う。投与期間中は連続ビデオ撮影を行い、投与前と投与後の行動変化などの解析を行う。

慢性投与後、安楽死し、脳を採取する。採取した脳は、各部位に分け、生化学的・分子生物学的解析用に凍結するものと、組織学的解析用に固定するものを用意する。

(2) 成体カニクイザルにおけるオリゴデンドロサイト新生の解析

生後のカニクイザル死後脳は、動物センターから供与を受ける。脳組織から切片を作製し、オリゴデンドロサイト系譜細胞のマーカーであるOlig2と新生細胞のマーカーであるKi-67で共染色を行い、2重陽性となる細胞の有無について検討を行う。

4. 研究成果

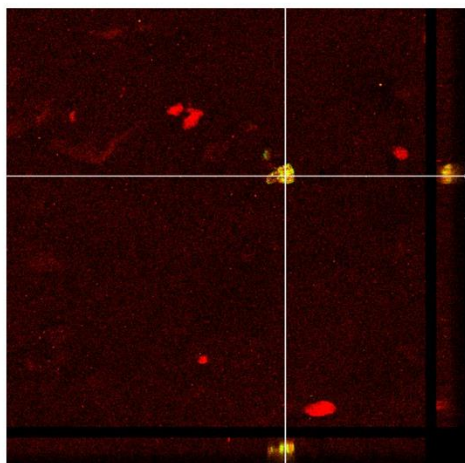
(1) インターフェロン α の慢性投与と行動変化

カニクイザルに対するインターフェロン α の慢性投与の報告は、ほとんどない。研究代表者は、ヒトの投薬量に準じ、3.5 μ g/kg/週で皮下から投与を行い、12週間問題なく投薬を行うことが可能であった。同時にビデオ撮影を行っており、行動変化の解析を行ったところ、食餌にかかる時間や、グルーミングの時間の増加などを見出した。カニクイザルに対する行動評価は確率されていないが、うつ病の病態と関連する変化であると考えている。また、よりうつ病の病態を表現する行動があれば、再度解析したい。

(2) 成体カニクイザル脳におけるオリゴデンドロサイトの増殖

上述したように研究代表者は、大うつ病患者死後脳の前頭極においてオリゴデンドロサイト系譜細胞の細胞数異常を見出している。オリゴデンドロサイトは、げっ歯類成体脳で

分裂能を有することが知られているが、霊長類の脳で証明されていない。そこで、健常カニクイザル死後脳から脳切片を作製し、オリゴデンドロサイト系譜細胞のマーカである Olig2 と分裂細胞のマーカである Ki-67 の 2 重染色を行った。その結果、成体カニクイザル脳においても、分裂しているオリゴデンドロサイト系譜細胞が存在することを見出した。(図参照)



図：カニクイザル大脳皮質におけるオリゴデンドロサイトの新生
緑：Ki-67、赤：Olig2

(3) インターフェロン α 慢性投与したカニクイザル死後脳の解析

本研究期間において、インターフェロン α 慢性投与と生理食塩水投与それぞれ 3 個体ずつの投与が終了した。投与後の前頭前野の細胞数を定量したところ、インターフェロン α 慢性投与した個体では、オリゴデンドロサイト系譜細胞の細胞数が減少傾向にあったが、有意な差はみられなかった。また、投与後の前頭前野から、神経細胞、オリゴデンドロサイトをフローサイトメーターで分取し、DNA を抽出した後、細胞種特異的な DNA メチル化の解析を行った。その結果、オリゴデンドロサイト関連因子である Sox10 のプロモーター領域において、インターフェロン α 慢性投与個体で低メチル化傾向であることが分かった。

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 3 件)

- (1) 林 義剛, 等 誠司. グリア細胞の分化・発生の時期と関連因子. 成体の科学, 68(1): 24-38, 2017. 査読なし
DOI:http://dx.doi.org/10.11477/mf.2425200568
- (2) Seita Y, Tsukiyama T, Iwatani C,

Tschiya H, Matsushita J, Azami T, Okamura S, Hayashi Y, Hitoshi S, Itoh Y, Imamura T, Nishimura M, Tooyama I, Miyoshi H, Saitou M, Ogasawara K, Sasaki E, Ema M. Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body. Scientific Reports, 6: 24868, 2016. 査読有
DOI:10.1038/srep24868

- (3) Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y, Hitoshi S. Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. Journal of Physiological Science, 66(3):197-206. 2016. 査読有
DOI:10.1007/s12576-015-0421-4

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 林 義剛, 福家聡, 瀧上孝裕, 小山なつ, 楯林義孝, 等 誠司. インターフェロン α 誘発性カニクイザルうつ病モデルの解析. 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会合同年会. 2016/9/8-10. 福岡
- (2) 林 義剛, 福家聡, 瀧上孝裕, 小山なつ, 楯林義孝, 等 誠司. 胎生期神経前駆細胞に対する Glial cell missing の機能解析. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会, 2015/12/1-4. 兵庫
- (3) 林 義剛, 福家聡, 瀧上孝裕, 小山なつ, 楯林義孝, 等 誠司. The oligodendroglial abnormality in mood disorders: a study of human and monkey post mortem brain. 25th ISN-APSN Joint Biennial Meeting. 2015/8/23-27. Cairns, Australia.
- (4) 林 義剛, 福家聡, 瀧上孝裕, 小山なつ, 楯林義孝, 等 誠司. 前頭葉オリゴデンドロサイト系譜細胞と精神機能. 第 92 回日本生理学会大会合同大会 (招待講演). 2015/3/23
- (5) 林 義剛, 福家聡, 瀧上孝裕, 小山なつ, 楯林義孝, 等 誠司. 霊長類研究で探る大脳皮質の細胞新生と気分の関係. 第 57 回日本神経化学学会大会 (招待講演). 2014/10/1. 奈良
- (6) 等 誠司, 林 義剛, 瀧上孝裕, 福家聡, 石野雄吾, 池中雄一. Epigenetic mechanisms underlying the generation and differentiation of neural stem

cells. 12th International society for
stem cell research. 2014/6/19.
Vancouver, Canada.

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqphysi1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 義剛 (Hayashi Yoshitaka)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：10631567