

令和 3 年 4 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23776

研究課題名（和文）脳内ストレス適応機構の個体差・性差発現に関わる分子・神経基盤解析

研究課題名（英文）Molecular and neural mechanisms of sex difference in stress adaptation in the brain

研究代表者

李 海燕 (Li, Haiyan)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：90840314

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）：本研究は、遺伝・環境相互作用に起因する精神疾患発症脆弱性の性差構築の分子神経メカニズム解明を目的とした。ストレス脆弱性に関わるエピジェネティクス制御分子のヒストンリジン脱メチル化酵素（KDM5C）に着目し、KDM5Cによるストレス脆弱性の性差構築のメカニズム解明を試みた。本研究により、思春期におけるKDM5Cを介したダイナミックなエピゲノム変容がストレス感受性の性差構築に關与する成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な疾患リスク要因の性差は知られているものの、診断や治療法に対する性差はほとんど考慮されていない。つまり、発症機序・病態生理には性差が存在するものの、治療法は同じであるという矛盾が生じている。特に、ストレス脆弱性の性差構築の分子神経基盤については、これまで実証科学的研究がほとんど行われてこなかった。本研究結果により科学的根拠を提示することができ、個体の機能低下の制御にむけた基盤技術の開発が期待できる。また、将来的にストレス性精神疾患に対する個別医療・性差医療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the molecular mechanisms of sex differences in stress-related psychiatric disorders. To this end, we focused on epigenetic molecule KDM5C, a histone demethylase, since we identified previously that this molecule could be involved in stress vulnerability in mice and in depression in clinical depression. We found that dynamic epigenetic regulation mediated by KDM5C might be associated with sex differences in stress susceptibility. This is the first evidence indicating that KDM5C plays an important role in sex-specific control of behavioral response to chronic stress.

研究分野：神経化学

キーワード：ストレス うつ病 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

気分障害や不安障害は遺伝的要因と環境要因が相互作用して発症する多因子疾患と考えられている。大うつ病性障害は抑うつ気分と興味・喜びの減退を主症状とする疾患であり、その遺伝率は約 37%と想定されている(1)。これは、統合失調症や双極性障害における遺伝率(70-80%)(1)に比して低いことから、気分障害・不安障害の発症に対する環境要因の重要性が指摘されている(2,3)。

また、精神疾患の発症頻度・発症年齢・重症度・治療経過には性差や個人差が大きいことが知られている。例えば、うつ病においては、女性の方が罹患率は高く、症状の進行は早く重症度も高いことが知られている。ストレスを受けたすべての人が精神疾患を発症するわけではなく、むしろ大部分の人には発病抵抗性・回復力(レジリエンス)が備わっていると考えられている(2)。このようなレジリエンス機能の性差・個人差はどのようなメカニズムで構築されているのだろうか？

ストレスフルなライフイベントが個体のレジリエンス機能低下を引き起こす性差・個体差構築のメカニズム解明は、精神疾患の発症や再発の予防法の確立につながることで期待される。本申請では、未だ明らかとされていないストレス脆弱性の性差・個体差構築の分子神経基盤の解明を目指す。また、神経回路特異的神経活動操作技術といった革新的分子ツールの開発により、個体の機能低下の制御法を確立する。

2. 研究の目的

気分障害の発症機序仮説の1つに、脳神経細胞の構造的可塑性異常による神経ネットワーク障害といった“神経可塑性障害仮説”が提唱されている(2,3)。実際、うつ病患者死後脳解析から、気分障害患者脳における機能的変化や形態的变化が報告されている。具体的には、海馬の萎縮や前頭前野の神経細胞数の減少などがあげられる(4,5)。また、慢性ストレス負荷モデル動物においても、海馬神経細胞の形態異常や樹状突起のスパイン密度の減少や神経新生の低下が報告されている(6-9)。これらの報告から、気分障害の病態における神経細胞の構造的・形態的变化をとともなう神経可塑性異常が示唆されている。

神経可塑性には脳内の遺伝子発現調節機構が重要な役割を担っている。遺伝的要因やストレスなどの環境要因によって遺伝子発現調節機構に異常が生じると、細胞機能さらには神経ネットワークが変容し、脳高次機能に影響を及ぼす(10)。気分障害患者死後脳や慢性ストレス負荷動物の脳内において、神経可塑性に関わる遺伝子ならびにそれら遺伝子の発現量を制御する転写因子の発現異常が多数報告されている(11-14)。これらの知見は、気分障害の病態における遺伝子発現調節異常の存在を示唆している。

最近、DNAの塩基配列に依存しないエピジェネティックな遺伝子発現調節異常とうつ病との関連が着目されている(15,16)。エピジェネティクスとは、DNAを構成する塩基配列上のsingle nucleotide polymorphism (SNP)などの違いによる遺伝子発現の変化ではなく、DNAメチル化やヒストン修飾(アセチル化、メチル化、リン酸化など)のようなDNA塩基配列の変化とは無関係な後成的な化学修飾によるクロマチン構造の変化を介した遺伝子の転写調節機構と理解されている。事実、気分障害患者死後脳や慢性ストレス負荷動物において、神経可塑性に関わる様々な遺伝子上のヒストン修飾の変化が認められること(14,16)が報告されており、ストレス関連精神疾患におけるエピジェネティクス制御の関与が示唆されて

いる。

これまでの研究成果から、内側前頭前野におけるヒストン脱メチル化酵素 (KDM5C) を介した遺伝子発現制御機構が神経可塑性制御とストレス反応性に密接に関わっていることが示唆された。しかし、いつ、どこで、どのような分子機序でストレス脆弱性の個人差が形成されているかは不明である。申請者所属の研究室で見出されているストレス脆弱性の個体差・性差構築に関わる候補分子の KDM5C に着目し、KDM5C がいつ・どこで・どのようにストレス脆弱性を形成しているのか、さらにその神経基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス

8週齢の雄性 C57BL/6J (B6)、DBA/2(DBA)、KDM5C 過剰発現(KDM5COE)マウスを使用した。餌と水は自由摂取させ、12 時間の明暗周期下で飼育した。動物使用に伴い、本学における動物実験指針及び動物実験規則等の指針に示される基準に適合することを確認し、当該委員会による使用許可を得た。

(2) 慢性ストレス負荷

マウスに社会性敗北ストレス (SDS) を負荷した。テストマウスを攻撃性の高い CD1 マウスと5分間同居させ (肉体的ストレス)、その後一晩、ケージ内に仕切りを置き直接接触できないようにした (心理ストレス)。これを5日間あるいは10日間連続して行った。

(3) 行動評価

Social interaction test: はじめて接触するマウスと5分間同一ケージにいれ、相手マウスとの接触時間を測定した。

Sucrose preference test: 水ボトルと1.5%スクロース液の入ったボトルをマウスに提示し、4時間での飲料水を計測した。スクロース液を飲んだ割合を Sucrose preference (%) として算出した。Sucrose preference はアンヘドニアの症状の1つとされている。

(4) 遺伝子発現解析

マウスから内側前頭前野領域を取り出し、総 RNA を抽出した。HiSeq-1500 を用いた RNA-seq を行った。また、総 RNA を用いた逆転写 PCR 反応により cDNA を調整し、SYBR Green Master Mix を用いたリアルタイム PCR 法にて目的 mRNA 発現量を定量解析した。内在性コントロールには GAPDH mRNA を使用した。

(5) 統計解析

2群間比較には unpaired t-test を、3群以上の比較には On-way ANOVA あるいは two-way ANOVA を使用した。有意差が認められた場合には、Bonferroni correction あるいは Tukey ' s post-hoc test 分析を行った。p 値が 0.05 未満を有意と判定した。

4. 研究成果

(1) ストレス脆弱性に関わるエピジェネティクス制御分子 KDM5C の標的遺伝子の同定。

ストレス負荷後にうつ様行動を示した個体、うつ様行動マウスに KDM5C 阻害剤を投与したマウス、ならびに非ストレスマウスにおける網羅的遺伝子発現変動を解析した。その結果、Npas4 や egr2 といった神経可塑性に関わる遺伝子を抽出した。

RNA-seq 解析の妥当性をリアルタイム PCR 法により検討した。その結果、ストレス負荷後のうつ状態マウスにおける Npas4、egr2 の発現低下と KDM5C 阻害剤投与による正常化を確認した。さらに、閾値下ストレスを負荷した KDM5C 過剰発現マウスにおいても Npas4 と Egr2 の

発現低下を認めた。

Npas4とEgr2がKDM5Cの直接的な標的遺伝子であるかを検討するため、KDM5Cの基質であるH3K4me3に対する抗体を用いたChIPアッセイを行った。その結果、慢性ストレス負荷によってうつ様行動が増大したマウスにおいて、Npas4遺伝子プロモーター上のH3K4me3レベルは有意に減少していた。

これらの結果から、KDM5Cの標的遺伝子としてNpas4とEgr2を同定した。

(2) ストレス脆弱性の臨界期の同定

胎生期から成体期までのマウス内側前頭前野における KDM5C 発現量をリアルタイム PCR 法により検討した。その結果、KDM5C 発現量は生後から徐々に減少し、思春期頃から発現が増大するといった、発達期におけるダイナミックな発現変動を示すことを確認した。この結果から、生後の発達期・思春期における KDM5C を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御が成体のストレス脆弱性形成に關与している可能性が示唆された。

(3) ストレス脆弱性の性差

オスマウスとメスマウスにおける KDM5C 発現を検討した。その結果、メスマウスはオスマウスに比べて KDM5C 発現が亢進していること、この発現増加は胎生期脳において既に認められることを確認した。また、メスマウスはオスマウスに比べてストレスに脆弱であることを行動学的手法により確認した。これらの結果から、メスマウスにおけるストレス脆弱性の形成は KDM5C を介している可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Sullivan, P.F., Neale, M.C., and Kendler, K.S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157, 1552-1562.
- 2) Krishnan, V., and Nestler, E.J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894-902.
- 3) Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., *et al.* (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.
- 4) MacQueen, G., and Frodl, T. (2011). The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Mol Psychiatry* 16, 252-264.
- 5) Price, J.L., and Drevets, W.C. (2010). Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 192-216.
- 6) Abe-Higuchi, N., Uchida, S., Yamagata, H., *et al.* (2016). Hippocampal Sirtuin 1 Signaling Mediates Depression-like Behavior. *Biol Psychiatry* 80, 815-826.
- 7) Duman, R.S., and Aghajanian, G.K. (2012). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 338, 68-72.
- 8) Higuchi, F., Uchida, S., Yamagata, H., *et al.* (2016). Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. *J Neurosci* 36, 7253-7267.
- 9) Watanabe, Y., Gould, E., and McEwen, B.S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588, 341-345.
- 10) Feder, A., Nestler, E.J., and Charney, D.S. (2009). Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci* 10, 446-457.
- 11) Fuchsova, B., Alvarez Julia, A., Rizavi, H.S., *et al.* (2015). Altered expression of neuroplasticity-related genes in the brain of depressed suicides. *Neuroscience* 299, 1-17.
- 12) Kang, H.J., Adams, D.H., Simen, A., *et al.* (2007). Gene expression profiling in postmortem prefrontal cortex of major depressive disorder. *J Neurosci* 27, 13329-13340.
- 13) Ota, K.T., Liu, R.J., Voleti, B., *et al.* (2014). REDD1 is essential for stress-

- induced synaptic loss and depressive behavior. *Nat Med* 20, 531-535.
- 14) Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., *et al.* (2011). Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. *Neuron* 69, 359-372.
 - 15) Nestler, E.J. (2009). Epigenetic mechanisms in psychiatry. *Biol Psychiatry* 65, 189-190.
 - 16) Akbarian, S., and Nestler, E.J. (2013). Epigenetic mechanisms in psychiatry. *Neuropsychopharmacology* 38, 1-2.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------