

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24249063

研究課題名(和文)うつ状態に伴う構造可塑的变化とその病態における意義の解明

研究課題名(英文)Structural plasticity of neurons associated with depressive state and its pathophysiological significance

研究代表者

加藤 忠史(Kato, Tadafumi)

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・チームリーダー

研究者番号：30214381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、反復性うつ病様エピソードを呈する気分障害モデルマウス(変異Polg神経特異的トランスジェニックマウス)において、神経細胞の形態学的変化をGolgi染色により検討した。その結果、トランスジェニックマウスの内側前頭葉錐体細胞の先端樹状突起で、マッシュルーム型スパインが少なく、フィロポディアが多いという変化を見出した。うつ状態に伴う動的な神経細胞の形態変化を検討するため、頭蓋窓を通して長期的に輪回し行動測定を行いながら、2光子励起顕微鏡によりin vivoで形態観察を継続的に行う測定系を確立した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the morphology of neurons of transgenic mice with neuron specific expression of mutant Polg. As a result, apical dendrites of medial prefrontal cortex of transgenic mice showed decreased mushroom spines and increase of filopodia. To further investigate dynamic morphological changes associated with depressive episodes, we established a system to observe morphology of neurons of the transgenic mice in vivo through a cranial window using two photon microscope.

研究分野：神経科学、精神医学

キーワード：うつ病

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病は長期休職の最大の要因であり、自殺の主な要因にもなっているなど、がんと並んで社会的影響の大きな疾患であるが、その原因は未だ不明であり、診断法・検査法もなく、面接診断に頼らざるを得ないなど、原因解明と診断法・根本的治療法の開発が急務である。

抗うつ薬がセロトニン取り込み阻害作用を持つことから、その病態にセロトニンが関与するとの説が有力であったが、セロトニンは数時間で上昇するのに、うつ病の改善には最低数週間かかることなどから、抗うつ薬による長期的な変化が調べられた結果、BDNF(脳由来神経栄養因子)上昇が重要であることが判明した。ストレスにより海馬アンモン角錐体細胞の樹状突起萎縮や海馬歯状回の神経新生抑制が生じることと併せて、うつ病の神経可塑性仮説が確立し、現在、うつ病の中心的な病態仮説となっている。しかし、うつ病患者の死後脳研究で、神経新生は減少していなかった(Reif et al, Mol Psychiatry 2006)。

気分障害患者のMRI研究では、うつ病と双極性障害で共通して前部帯状回の体積減少、扁桃体の体積増加が報告されるなど、こうした部位で神経可塑的变化が生じている可能性が示唆されるが、MRIでは細胞形態変化やその分子基盤などの脳病態を研究することはできず、うつ状態に伴って樹状突起形態が変化しているかどうかは未だ不明のままである。

このように、うつ病に伴う神経細胞形態変化の研究が進まない理由としては、死後脳研究が困難であることに加え、自発的なうつ病エピソードを呈する動物モデルがなかったこと、in vivoで動物の樹状突起を継続的に観察する方法がなかったことなどが挙げられる。しかし、うつ病という重大な疾患の原因を解明するためには、この仮説を正面から検証する必要がある。

我々は、うつ病・双極性障害を伴うことのある遺伝病、慢性進行性外眼筋麻痺に注目し、その原因遺伝子である Polg(ミトコンドリアDNA合成酵素)の神経特異的トランスジェニックマウスを作成した。

さらに、このマウスが、平均半年に1回、2~3週間続くうつ病様エピソード(輪回し行動量の顕著な減少、行動の日内リズムの変化、体温リズムの変化、ショ糖嗜好性の変化を伴う)を示すことを見いだした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ゴルジ染色を用いて、変異 mPolg マウスにおけるうつ病様エピソード中の内側前頭前野において、神経細胞の形態学的変化(樹状突起萎縮、スパインの減少)が見られるかどうかを明らかにすることで

ある。

更に、こうした変化が可逆性のものかどうかを調べ、樹状突起動態の時間経過を明らかにし、行動量変化との対応関係を明らかにするため、in vivo二光子顕微鏡を用いた in vivo 神経細胞形態観測法を確立する。

## 3. 研究の方法

研究には、我々が作成した気分障害モデルマウスを用いる。

これは、Calmodulin kinase II alpha(Camk2a)プロモーター下に点変異(D181A)を導入したミトコンドリアDNAポリメラーゼ遺伝子(Polg)を連結したトランスジェニックマウスである(Kasahara et al, 2006)。遺伝子型判定はPCR法により行い、ヘテロメスマウスを実験に用いる。

25週齢時に輪回し装置に導入し、1週間後より測定を開始する。輪回し装置は、理化学研究所脳科学総合研究センター中央棟9階または回路遺伝学棟に設置された小原医科産業製輪回し装置(赤外線センサーにより、1/3回転につき1カウントされる)を用いる。

輪回し量の変動は、RSI(Relative Strength Index)値を用いて評価する。うつ状態の基準を満たした後、速やかにマウスを sacrifice し、脳を摘出する。

同週齢の、うつ病様エピソードにないトランスジェニックマウス、および、同週齢の野生型マウスを対照群として調べる。各群6匹、計18匹の解析を行う。

摘出した脳を未固定の状態でもリン酸緩衝生理食塩水により洗浄後、FD Rapid Golgi Stain Kit(FD Neuro Technologies社)を用いて、Golgi染色を行う。

まず、クロム酸を含むA液、B液に浸漬し、7日後、ピブラトームを使用して、切片を作成する(厚さ200 $\mu$ m)。スライドガラスにマウント後、発色、脱水、封入を行い、観察を行う。

遺伝子型について blind な状態で、定量的解析を行う。定量的観察には、電動ステージ付きのニコン社顕微鏡を用いて、NeuroLucidaソフトウェアにより解析を行う。

解析は、これまで、ストレスによる構造可塑的变化が報告されており、このモデルマウスでミトコンドリアDNA変異の蓄積が認められ、これまでのMRI研究や動物モデル研究で気分障害との関連が疑われている、内側前頭葉(infralimbic cortex)を中心に行う。

樹状突起の長さの定量的解析には、Sholl解析法を用いて、細胞体を中心とする同心円と神経突起の交叉部までの距離を測定する。スパイン形態は、genotype に関してブライントに、マッシュルーム型(成熟型)、フィロポディア型(未熟スパイン)に分類し、計測する。

スパインの形態と数、樹状突起の長さに加え、樹状突起の数、分岐を三次元的に計測し、

うつ病様エピソード中にこれらのパラメーターが変化するかどうかを、まず明らかにする。

次に、こうした変化が可逆性のものかどうかを調べ、樹状突起動態の時間経過を明らかにし、行動量変化との対応関係を明らかにするため、in vivo 二光子顕微鏡を用いた in vivo 神経細胞形態観測法を確立する。

#### 4. 研究成果

本研究では、我々が作成した、反復性うつ病様エピソード気分障害モデルマウス(カルモディリンキナーゼ $\alpha$ プロモーター下に変異型ポリメラーゼ $\gamma$ (Polg)を発現させた神経特異的トランスジェニックマウス)を用いて、うつ病様エピソードに伴う神経細胞の形態学的変化を明らかにした。

Golgi 染色標本のデータ解析を進めた結果、内側前頭葉錐体細胞の先端樹状突起において、マッシュルーム型スパインが少なく、フィロポディアが増大していることがわかった。

このモデルマウスでは、視床室傍核にチトクロム c オキシダーゼ陰性細胞(Cox 陰性細胞)が集積していることが見いだされているが、視床室傍核から内側前頭葉に線維連絡があることがわかっていることから、この所見は、視床室傍核から内側前頭葉に至る軸索が減少している可能性を疑わせた。

今回の所見では、うつ状態と寛解期の間に明確な差は見られなかったが、うつ状態を経験すると、その後樹状突起スパインが回復しない可能性も考えられるため、経過に伴う変動について、更に検討を進める必要がある。

うつ状態に伴う動的な神経細胞の形態変化を明らかにするためには、マウスに頭蓋窓を設置し、長期的に輪回し行動測定を行いながら、2光子励起顕微鏡により in vivo で形態学的観察を継続的に行う必要があるため、輪回し測定の可能な動物実験施設内に2光子顕微鏡を設置し、繰り返し in vivo 観察が可能な環境を整え、測定系を確立した。

#### 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 4 件)

Kasahara T\*, Takata A\*, Kato TM\*, Kubota-Sakashita M, Sawada T, Kakita A, Mizukami H, Kaneda D, Ozawa K, Kato T (\*co-first authors) (2016) Depression-like Episodes in Mice Harboring mtDNA Deletions in Paraventricular Thalamus. *Molecular Psychiatry*, 21: 39-48

Kato T, Kasahara T, Kubota-Sakashita M,

Kato TM, Nakajima K (2016) Animal models of recurrent or bipolar depression. *Neuroscience*, 321: 189-196

Kato T (2016) Neurobiological basis of bipolar disorder: Mitochondrial dysfunction hypothesis and beyond. *Schizophrenia Research* S0920-9964: 30481-9

Fuke S, Kametani M, Yamada K, Kasahara T, Kubota-Sakashita M, Kujoth GC, Prolla TA, Hitoshi S, Kato T (2014) Heterozygous Polg mutation causes motor dysfunction due to mtDNA deletions. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1: 909-920

[学会発表](計 1 件)

Kato T (2015) Neurobiology of bipolar disorder. The 5th World Congress of Asian Psychiatry, Japan, Fukuoka, Mar. 3-5

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤忠史 (KATO, Tadafumi)

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・チームリーダー

研究者番号: 30214381

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )