

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791247

研究課題名(和文) 双極性障害モデルマウスでの視床室傍核の機能異常の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the dysfunction of the paraventricular nucleus of the thalamus with bipolar disorder model mouse

研究代表者

加藤 智朗 (KATO, TOMOAKI)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40598439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室で作成した前脳神経で変異型polymerase を発現するトランスジェニックマウスは双極性障害と類似した表現型を示す。このマウスは視床室傍核等の領域において欠失したミトコンドリアDNAを多く蓄積する。視床室傍核がどういった特徴を持つかを明らかにするために、視床室傍核やその他に双極性障害との関連が示されている脳領域を含めてRNAを抽出しマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、視床室傍核は他の領域よりもミトコンドリア関連、特に酸化的リン酸化に関わる遺伝子の発現が高いこと、コレステロールの合成に必要な酵素をコードする遺伝子の発現レベルが高いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We previously generated transgenic mice that express mutant form of mitochondrial DNA (mtDNA) polymerase in their forebrain neurons. These mice showed bipolar disorder-like phenotype and accumulated deleted mitochondrial DNA in the several brain regions including the paraventricular nucleus of the thalamus (PVT). To clarify the characteristic features of the PVT, we performed gene expression analysis of the PVT and other brain regions which have been suggested the involvement in bipolar disorder by using microarray. As a result, we found that the genes related to mitochondrial function, especially oxidative phosphorylation, and cholesterol biosynthesis were highly expressed in the PVT compared with the other brain regions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、精神神経科学

キーワード：精神疾患

### 1. 研究開始当初の背景

双極性障害は国内における生涯有病率が0.7%と言われる非常に高い発症率を示す精神疾患であるが(1)、その病因は不明であり診断や治療が困難である。ミトコンドリア病患者が双極性障害を伴う事例が多いことや、双極性障害患者の死後脳では変異ミトコンドリア DNA(mtDNA)が多く検出されたことからミトコンドリア機能の障害が発症に関与しているという可能性が考えられている。その可能性を検証するため、当研究室ではmtDNA合成酵素の変異体を前脳神経細胞で発現するトランスジェニック(*mutPolg Tg*)マウスを作成した(2)。このマウスで行動解析を行った結果、日内リズムの乱れやメスマウスの性周期に伴った行動量の異常変動、2週間程度継続した長期的な行動量低下が観察された。また、このマウスの脳内で欠失したmtDNAがどのように分布するのかを調べたところ、一様に分布するのではなく視床室傍核等の脳領域に特に多くの欠失mtDNAを含むことが明らかになった。なぜこれらの脳領域で欠失したmtDNAが多く蓄積するのかは明らかではない。視床室傍核は主にグルタミン酸やアスパラギン酸といった興奮性神経伝達物質を含むニューロンにより構成されており、概日リズムの中核である視交叉上核を含む多くの視床下部領域からの投射を受け、内側前頭皮質や側坐核、扁桃体等に投射している(2,3)。様々なストレス負荷に強く反応して活性化されることが知られていて、反復ストレスによる視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系の活性化に対する馴化に関与していることが示唆されているが(4,5)、具体的に行動的表現型に関わる分子や結合する脳領域との作用など、ほとんど明らかになっていない。

### 参考文献

- (1) 川上憲人, 医学のあゆみ 219 : 925 - 929, 2010
- (2) Kasahara T. *et al.* (2006) *Mol Psychiatry*. 11(6):577-93.
- (3) Peng ZC and Bentivoglio M. (2004) *J neurocytol.* 33: 101-16.
- (4) Frassoni C. *et al.* (1997) *Exp Brain Res*. 115:95-104.
- (5) Bhatnagar S. and Dallman M. (1998) *Neuroscience*. 84(4) : 1025-39.
- 5, Jaferi A *et al.* (2006) *Endocrinology*. 147(10): 4917-30.

### 2. 研究の目的

本研究の目的は *mutPolg Tg* マウス脳において、特に欠失したmtDNAが多く検出された視床室傍核における遺伝子発現変化を調べ、マウスが示す行動異常に関連し得る遺伝子を同定することである。

### 3. 研究の方法

視床室傍核がどういった特徴を持つかを明らかにするために、視床室傍核やその他、扁桃体中心核、内側前頭前野、視床下部室傍核といった双極性障害との関連が示されている脳領域を含めてRNAを抽出しマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。組織の採取方法は当初、レーザーマイクロダイセクション装置を用いて行い、得られたRNAを2ラウンドのlinear amplification法により増幅してAffymetrix Genechipを用いて遺伝子発現解析を行った。しかし、この方法では収量やクオリティーの点で問題があり、1mm厚脳スライスを作り実体顕微鏡下で目的領域を切り出す方法により良好なRNAサンプルを得ることができた。この方法により得られたRNAからCy3標識cRNAを合成し、Agilent SurePrint G3 Mouse Exon microarrayを用いて遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現比較にはGenespringを使用し、gene enrichment解析にはDAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を使用した。

### 4. 研究成果

最初にレーザーマイクロダイセクション装置を用いてマウス脳の凍結切片から視床室傍核領域を切り出し、RNAを回収して遺伝子発現解析を行った。その結果、野生型マウスに比べ、*mutPolg Tg* マウスではコルチコトロピン放出ホルモン(*Crh*)の発現が高いことが示された。*Crh*はHPA系の制御において起点になる分子として知られている。*In situ* hybridizationにより*Crh*の発現を調べたところ、全体的に*mutPolg Tg* マウスの発現レベルは野生型に高い発現が見られたが、視床室傍核での*Crh*の発現量は他の領域に比べてそれほど高くはなく、野生型でも発現量が高い視床下部室傍核や扁桃体での発現の増加が顕著であった。また、HPA系の活性により副腎皮質から分泌が促進されるコルチコステロンは受容体と結合することによって遺伝子発現を制御することが知られているが、*mutPolg Tg* マウスで発現が低下している遺伝子にはglucocorticoid-attenuated response genesと呼ばれる遺伝子群が多く含まれていた。このことから*mutPolg Tg* マウスはHPA系が過剰に活性化されている可能性があり、これは多くのうつ病患者で見られる所見と合致している。

レーザーマイクロダイセクション装置を用いた組織回収法では、脳の位置や形態をより正確に設定できるというメリットがある反面、レーザーによる組織の切り出し過程で回収できるRNAの質や量を低下させてしまうことや、一度に切り出せる脳切片の厚さに限界があるため厚みのある組織を採取するには非常に手間がかかるなどの問題があった(図1)。

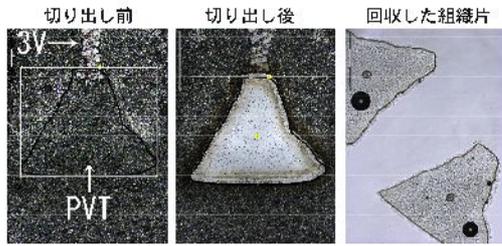


図 1, レーザーマイクロダイセクションによる組織回収 PVT(視床室傍核)

そこで、1mm 厚の脳スライスを作成し、実体顕微鏡下で標的組織を直接取り出し RNA を回収した。この方法では増幅作業を行わなくても、遺伝子発現解析を行える十分量の RNA が回収できた(図 2)。  
視床室傍核の特徴を知るために、他の脳領域を比較対象として、同様に遺伝子解析を行う

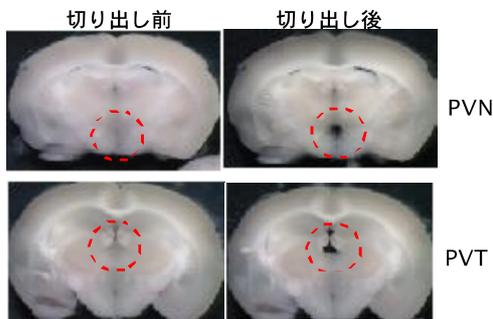


図 2, 1mm 厚脳スライスからの組織回収 PVN(視床下部室傍核)

必要があり、双極性障害との関連が示唆されている内側前頭皮質や扁桃核、視床下部室傍核の組織からも RNA を抽出した。遺伝子発現解析の結果から、野生型マウスと *mutPolg*Tg マウスでの発現比較を行うと、発現を調べた 4 領域に共通して発現が変化している遺伝子はトランスジーンである *Polg* 遺伝子のみであった。各脳領域で複数の遺伝子に有意な発現量の差があったが、それらが行動異常の状態に伴った遺伝子発現変化であるか素因に伴って恒常的に発現が変化している物であるかに関して検討することが行動変化との関係性を調べるために必要であると考えられた。そのためにはサンプリングする際のマウスの状態を考慮する必要があると考え、輪回し行動解析を行いながら、うつ病様の長期行動量低下が見られた時点でマウス脳をサンプリングし、RNA を回収するという実験を行った。今後、回収された RNA サンプルで再度、遺伝子発現解析を行う予定である。一方で、組織間での遺伝子発現の比較をした場合、視床室傍核は他の領域よりもミトコンドリア関連、特に酸化リン酸化に関わる遺伝子の発現が高いことや、アセチル CoA からコレステロールを合成するのに必要な全ての酵素をコードする遺伝子が視床室傍核にエ

ンリッチしていることが明らかになった。しかし、これらのシグナル経路に係る個々の遺伝子が野生型マウスと *mutPolg* Tg で有意に異なるという結果はこれまでのところ得られていない。c-fos や pCREB といった神経活動性を示すマーカーの免疫組織染色により、関連する脳領域を同定しようと試みたが、これらのマーカーの発現状態は非常に短期間で変化する為、サンプリング直前の状態による影響が大きく、長期間続く行動変化の指標とすることは困難であった。そのため、DREADD という薬理遺伝学的により神経を活性化させ視床室傍核を中心とした神経回路の機能を調べるための実験を開始した。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1)Kato, TM., Kubota-Sakashita, M., Kasahara, T., Kato, T.: "Mitochondrial dysfunction in mouse brain causes depression-like behavior and HPA axis dysregulation" FENS Featured Regional Meeting Neuroscience in Prague. September 11<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> 2013, Czech Republic

(2)Kato, TM., Komori, A., Kubota-Sakashita, M., Kasahara, T., Kato, T.: "Gene expression analysis of mood disorder model mice expressing mutant form of mitochondrial DNA polymerase in the forebrain" Neuro2013 2013 年 6 月 20-23 日, 国立京都国際会館.

(3)Kato, TM., Komori, A., Kubota-Sakashita, M., Kasahara, T., Kato, T.: "Overexpression of mutant form of mitochondrial DNA polymerase in forebrain modulates gene expression in the paraventricular nucleus of the thalamus and leads to recurrent depression-like episodes accompanied by HPA axis dysregulation." Society for Neuroscience 2012 in New Orleans, October 13<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2012, USA.

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

加藤 智朗 (KATO TOMOAKI)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研  
究センター・研究員

研究者番号：40598439