

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05091

研究課題名（和文）ストレス性情動障害に関わる細胞外分子脳病態解析

研究課題名（英文）Elucidation of extracellular molecular brain pathology related to stress-related affective disorder

研究代表者

竹本 さやか（木村さやか）（Takemoto-Kimura, Sayaka）

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：70372365

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳によって生起する情動（不安、恐怖、快樂など）は、生物が生存するうえで必要不可欠な生理機能である。現代社会における様々なストレスが一因となり、過度な情動の亢進や消失といった情動障害が生じ、うつ病や適応障害、不安障害をはじめとする精神疾患との病態に関与するとされる。本研究では、情動障害を示す病態モデルマウスを対象とした行動・組織解析や遺伝子発現解析を行うとともに、特に細胞外分子の変化を捉え、それに伴う神経活動の変化を見出すために、脳深部イメージング法やマイクロダイアリシス法などの分子脳生物学的手法を組み合わせ、ストレスに伴う情動障害の病態解明を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自に開発した病態モデルを含めた様々な情動異常を示すモデルマウスを対象とし、多階層の病態解明を推進した。情動の変化は、様々な神経・精神疾患で認められ、患者本人や周囲にも多大な損失を与えるため、その病態解明は喫緊の課題である。本研究により病態モデルが開発されその研究基盤が整備されるとともに、病態の一端が解明された。

研究成果の概要（英文）：Emotions generated by the brain (anxiety, fear, pleasure, etc.) are essential for the survival of animals. Various stresses in modern society are known to lead to some dysfunctions in emotional responses, which are considered to be involved in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases such as depression, PTSD, and anxiety disorders. In this research, using animal models for emotional disorders, we conducted multifaceted analysis, including behavioral and transcriptomic analysis. Furthermore, in order to specifically detect changes in extracellular molecules and find associated changes in neural activity, we developed and performed deep brain imaging and microdialysis were conducted to elucidate alterations in extracellular molecules. By these methods, we aimed to elucidate the molecular pathology of emotional disorders associated with stress.

研究分野：分子神経科学

キーワード：ストレス 情動障害 マイクロダイアリシス イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳によって生起する情動(不安、恐怖、快樂など)は、生物が生存するうえで必要不可欠な生理機能である。現代社会における様々なストレスが一因となり、過度な情動の亢進や消失といった情動障害が生じ、うつ病や適応障害、不安障害をはじめとする精神疾患の病態に關与するとされる。様々なストレスが取り巻く現代社会において、その患者数は増加の一途をたどり社会問題ともなっている。

精神疾患の理解や治療法の確立は遅れており、その分子機序の解明が待望される。この要因として、採取・検出手法が限られ生体脳での分子レベルの研究が困難であること、診断が医師による問診に基づいて行われ客観的指標が乏しいことなどがあげられる。

そこで本研究では、抑うつ状態、不安亢進などを示す病態モデルマウスを用い、情動障害の分子病態解明を目指し、病態モデルマウスの構築、脳深部イメージング法やマイクロダイアリシス法などの分子脳生物学的手法による、ストレスに伴う情動障害の病態解明を行った。さらには、高感度・非侵襲的に生体脳内の細胞外分子の変化を計測することが可能な新たな分析システムの構築を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、情動障害の脳内分子病態の解明を目指した。研究代表者の竹本はこれまでの研究に基づき、情動障害において重要な役割を果たす扁桃体に注目し、扁桃体の微小亜核における分子病態および回路活動の変化を解明することを目的とした。更に、分担研究者の宮田、九州大学の川井と連携し、細胞外物質の変化を検出するため、マイクロダイアリシスにより採取した脳内細胞外物質の網羅解析を可能とする分析系の開発を目指した。また、分担研究者の宮田は、ヒトの脳内においてうつ状態依存的に含有量が変化するとされる γ -アミノ酪酸(GABA)に着目し、遺伝子改変マウスなどうつ・不安病態モデルを使用して脳局所における細胞外 GABA 量の変化とマウス情動行動変化との関連性について追究する。さらに、既存技術ではアクセスできないヒトの生体脳内分子情報を読み解く手段として、代替組織を利用したうつバイオマーカーの可能性について検討した。これらの研究から、精神疾患バイオマーカーの開発や新規治療ターゲットの同定といった次世代の医学研究や臨床応用へと繋ぐうえで不可欠な基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

前項の目的のため、以下の研究項目ごとに研究を推進した。

(1) 扁桃体および前頭前皮質に着目したストレスにより変化する分子神経病態の解明:

不快な情動の中核とされる扁桃体に焦点を当て、急性および慢性ストレス負荷に伴う情動変化をきたしたモデルマウスにおいて、扁桃体の各神経核のトランスクリプトーム解析を実施する。この際に、各微小神経亜核を蛍光標識により分離し微小神経亜核間の差異を比較検討する(Ueda et al. Front. Mol. Neurosci. 2021)。また、この際にどのような神経活動変化が生じるのか明らかとするために、扁桃体脳深部において Ca^{2+} センサータンパク質 GCaMP および小型蛍光顕微鏡を用いた自由行動下 Ca^{2+} イメージングを確立・実施した。また、情動コントロールに関わる前頭前皮質における細胞外分子のストレス負荷に伴う量的変動について検討した。

(2) 脳内細胞外分子採取と高感度分析システムの構築:

情動障害における分子病態を解明するために、分担研究者の宮田、九州大学の川井と連携し、マイクロダイアリシス法による脳内分子回収を行い、高感度液体クロマトグラフィ 質量分析技術ならびに超高感度キャピラリー電気泳動-質量分析技術によるメタボローム解析を行った。更に、共同研究者の安楽らが開発するナノマシンの脳内動態の検討を行った。特に、定常状態ならびに神経過活動状態下における細胞外代謝物の量的変動について解析し、網羅的分析を行う上で必要な前処理法や、それぞれの分析技術によるメリット・デメリットを明らかにした。分析技術が確立されれば、各種病態モデル動物への応用を視野に研究を進めた。

(3) 精神・神経疾患病態モデルマウスの樹立と分子病態の解明:

神経系疾患の新規病態モデルマウスを開発し、情動(不安や恐怖など)に関する、行動学的解析を行うとともに分子病態を解明した。GABA は神経活動調節ならびに情動調節に重要な神経伝達物質であり、GABA 合成酵素の 1 種である GAD67 遺伝子改変マウスおよびラットを使用して脳内分子環境の理解に貢献した。

4. 研究成果

それぞれの研究項目について、以下の点が明らかとなった。

(1) 扁桃体に着目したストレスにより変化する分子神経病態の解明:

電気ショックを与えること恐怖条件付け学習を成立させたマウスモデルにおいて、情動機能の中核である扁桃体の各神経核のトランスクリプトーム解析を実施した。この際に、遺伝子改変マウスを用いて、各微小神経亜核を蛍光標識により分離し微小神経亜核間の差異を比較検討した(Ueda et al. Front. Mol. Neurosci. 2021)。更に、慢性ストレスモデルを作出し、ショ糖嗜好性試

験、強制水泳試験、オープンフィールドテストなどの複数の行動解析により、抑うつモデルであることを確認した。また、前述の手法により、扁桃体亜核における遺伝子発現変動について検討を進め、扁桃体の基底外側核 (BLA) や中心核 (CeA) などの各亜核においてまったく異なる遺伝子発現変動を見出し、現在投稿準備中である。次に、情動変化が生じた際の神経活動計測を行うため、扁桃体脳深部における自由行動下 Ca^{2+} イメージング技術を確立した。扁桃体中心核の複数の細胞種を対象に、どのような刺激に応答するのか検討する中で、味覚刺激を与えた際に、活動変化を示す細胞種を見出した (Hamada et al. Mol. Brain 2023)。今後は、この手法を用いて、情動が変化する際にどのような神経活動レベルの変化が扁桃体で認められるか明らかとする計画である。

(2) 脳内細胞外分子採取と高感度網羅的分析システムの構築：

分担研究者の宮田、九州大学の川井と連携し、細胞外物質の変化を検出するため、マイクロダイアリシスにより採取した脳内細胞外物質の網羅解析を可能とする分析系の開発を行った。竹本・宮田は、摂食中のマウス側坐核や前頭前皮質においてマイクロダイアリシスによる脳内物質の採取を行った。まず、マウス前頭前皮質にマイクロダイアリシスプローブを挿入し、リンゲル液および高濃度カリウム溶液をダイアリシスプローブに灌流させたことによる細胞外代謝物量の変化について高感度液体クロマトグラフィ質量分析装置で解析した。その結果、野生型マウスの前頭前皮質において 57 種におよぶ細胞外代謝物 (アミノ酸、アミン、核酸、脂肪酸など) の同時解析を実現した。この解析技術を利用し、グルタミン酸脱炭酸酵素 65kDa (GAD65) およびグルタミン酸脱炭酸酵素 67kDa (GAD67) をそれぞれノックアウト、ノックダウンした遺伝子改変マウスを使用して細胞外 GABA 量およびグルタミン酸量の変化について検討した。その結果、どちらの遺伝子改変マウスも定常状態下の細胞外 GABA 量には対照群マウスと比べて有意な差を認めないものの、高濃度カリウム溶液を灌流したことによる細胞外 GABA 量の増加率については、両遺伝子改変マウスにおいてその効果が減弱していた。一方、GABA 前駆物質である細胞外グルタミン酸量について解析したところ、両遺伝子改変マウスともに定常状態下の細胞外グルタミン酸量に変化を認めないことに加え、高濃度カリウム溶液を灌流した条件下に置いても両群間に差を認めなかった。このことから、GABA 合成酵素の異常は GABA 合成量を低下させるが、定常状態下の細胞外 GABA 量には変化をおよぼさないことが明らかとなった。一方、GABA 神経が過活動状態になると、細胞外 GABA 量の有意な減少が認められることを明らかにした。この解析を実施するにあたり、リンゲル液中に含まれる高濃度の塩が解析の支障になった。そのため、解析の精度を向上させるためには、分析前にサンプル中に含まれる高濃度の塩を除去する技術が必要と思われた。一方、共同研究者の川井が有するキャピラリー電気泳動質量分析技術では、サンプル中の塩が解析に支障を与えない (影響は少ない) ことが特徴であり、マイクロダイアリシスのような高塩濃度のサンプルを解析する上で非常に有用なツールであることが考えられた。そこで、川井にサンプルを提供し、超高感度質量分析技術による神経伝達物質の網羅解析を可能とする分析システムの構築を行った。その結果、特殊な前処理を行うことなく、複数の神経伝達物質について、脱分極刺激による上昇の検出に成功した。また、その感度は液体クロマトグラフィ質量分析技術よりも高い可能性が示唆された。

(3) 新規に、情動障害を示す神経発達症の病態モデルマウスの開発を推進した。GAD67 ノックダウンマウスはオープンフィールド試験において明らかな不安関連行動を呈した。一方、音刺激に対する驚愕反応は、GAD67 ノックダウンマウスにおいて減弱していた。このマウスの前頭葉皮質、海馬および小脳における GABA 含有量は有意に減少していたが、グルタミン酸量には変化を認めなかった。また、GAD67 ノックアウトマウスは出生日に全例致死するのに対し、GAD67 ノックダウンマウスは成体脳から GAD67 発現量を後天的に減少させることが可能な新規リソースとなることを報告した。興味深いことに、成体のマウスから GAD67 をノックダウンさせると、徐々に生存率が低下した。このことは GAD65 ノックアウトマウスと大きく異なる表現型であり、GAD67 は生存にとって非常に重要なタンパク質であることを意味する (Miyata et al., Mol. Brain, 2019)。次に、脳内微小環境での代謝物分析に関連し、脳腫瘍周囲の微小環境における GABA 神経系の生死について脳腫瘍ラットモデルを用いて検討した。神経膠芽腫は、ときに症候性てんかんを引き起こすが、その原因は明らかにされておらず、腫瘍周囲における GABA 神経の脱落が神経活動の抑制性調節の破綻を引き起こし、興奮神経の過活動状態を引き起こすことで発症すると仮説を立てた。脳腫瘍周囲領域では明らかに GABA 神経細胞数の減少が引き起こされており、腫瘍由来因子などが脳腫瘍周囲に存在する細胞に影響を与えることで、GABA 神経の脱落に寄与している可能性が示唆された (Komiya et al., Sci. Rep., 2022)。すなわち、脳腫瘍周辺領域では部分的に細胞外 GABA 濃度の減少が引き起こされている可能性があり、こうした特定の脳内微小環境をばやぶさ型ナノマシンがモニタリングできれば医療の向上につながると期待される。今後、開発を進める脳内細胞外分子採取と高感度網羅分析システムを独自に開発した病態モデルマウスに適用することで、情動障害の分子病態の一端解明に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang C, Horigane SI, Wakamori M, Ueda S, Kawabata T, Fujii H, Kushima I, Kimura H, Ishizuka K, Nakamura Y, Iwayama Y, Ikeda M, Iwata N, Okada T, Aleksic B, Mori D, Yoshida T, Bito H, Yoshikawa T, Takemoto-Kimura S, Ozaki N	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of ultra-rare disruptive variants in voltage-gated calcium channel-encoding genes in Japanese samples of schizophrenia and autism spectrum disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-022-01851-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamada Shun, Mikami Kaori, Ueda Shuhei, Nagase Masashi, Nagashima Takashi, Yamamoto Mikiyasu, Bito Haruhiko, Takemoto-Kimura Sayaka, Ohtsuka Toshihisa, Watabe Ayako M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Experience-dependent changes in affective valence of taste in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-023-01017-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Hajime, Kidokoro Hiroyuki, Kondo Yayoi, Kawaguchi Masahiro, Horigane Shin-ichiro, Natsume Jun, Takemoto-Kimura Sayaka, Bito Haruhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 F ₁ rster resonance energy transfer-based kinase mutation phenotyping reveals an aberrant facilitation of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent CaMKII activity in de novo mutations related to intellectual disability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2022.970031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koniya Kazuki, Iijima Keiya, Kawabata-Iwakawa Reika, Fujihara Kazuyuki, Kakizaki Toshikazu, Yanagawa Yuchio, Yoshimoto Yuhei, Miyata Shigeo	4. 巻 12
2. 論文標題 Glioma facilitates the epileptic and tumor-suppressive gene expressions in the surrounding region	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10753-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sayaka Takemoto-Kimura
2. 発表標題 Exploring molecular pathways involved in central amygdala-dependent control of emotional behaviors
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sayaka Takemoto-Kimura
2. 発表標題 Essential functions of calcium-dependent signaling in neuronal morphogenesis and neuropsychiatric disorders
3. 学会等名 Circuit Construction in the Mammalian Brain 2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田茂雄、込山和毅、川端（岩川）麗香、好本裕平、柳川右千夫
2. 発表標題 ラット神経膠腫モデルの腫瘍周囲組織におけるてんかんに関連した遺伝子発現の変化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹本 さやか
2. 発表標題 扁桃体微小神経核における情動制御分子基盤の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takemoto-Kimura S, Ueda S
2. 発表標題 Exploring the molecular and neuronal bases involved in central amygdala-dependent control of emotional behaviors
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田茂雄
2. 発表標題 ストレスにより変動するマウス脳内微量細胞外分子の網羅的探索
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹本さやか, 上田修平
2. 発表標題 扁桃体微小神経核を介した情動制御分子基盤の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹本さやか, 上田修平
2. 発表標題 扁桃体微小神経核における情動および社会的行動制御の分子基盤探索
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田茂雄
2. 発表標題 こころの疾患“うつ病”のバイオマーカー探索～脳分子探査に期待すること～
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	宮田 茂雄 (Miyata Shigeo) (40366836)	日本薬科大学・薬学部・准教授 (32425)	

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
---------	---------