

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09807

研究課題名(和文) ストレス脆弱性の形成機序の解明とその分子基盤を標的とした抗ストレス薬の開発

研究課題名(英文) Elucidating molecular mechanisms underlying stress vulnerability

研究代表者

内田 周作 (UCHIDA, Shusaku)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10403669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、精神疾患の発症に深く関わるストレス脆弱性の形成機序における細胞・分子基盤を明らかにすることである。まず、マウス発達段階における神経新生が成体期のストレス脆弱性を調節しているかを検討した。ストレス脆弱性マウスはストレス耐性マウスに比べて海馬歯状回神経新生が減少していることを見出した。また、幼若期のストレス脆弱性マウスに対し、薬理学的手法により神経新生を増加させたところ、成獣期にストレス耐性を獲得した。この分子メカニズムとして、海馬歯状回に特に高発現しているスタタミンを介した海馬神経新生の制御がストレス脆弱性の形成に関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated the role of hippocampal neurogenesis in the development of stress vulnerability during adulthood in mice. To this end, we used two inbred mouse strain: C57Bl/6J (B6) and BALB/c (BALB) as stress-resilient and stress-vulnerable model, respectively. BALB mice had reduced hippocampal neurogenesis at postnatal day 28, when compared to B6 mice, suggesting that hippocampal neurogenesis during development may modulate stress response later in life. To test this possibility, we injected memantine which can enhance hippocampal neurogenesis in BALB mice and investigated chronic stress-induced behaviors. We found that BALB mice given memantine did not show any behavioral abnormality following chronic stress episode. These results suggest that hippocampal neurogenesis plays an important role in the development of stress vulnerability/resilience. We also found that statamin-mediated microtubule dynamics may control stress response in adulthood.

研究分野：分子精神医学

キーワード：ストレス うつ病 レジリエンス

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高ストレス社会を背景に、うつ病などの精神疾患患者数が急増している。うつ病の発症には遺伝的要因のみならず環境的要因(ストレス)が大きく作用することが推測されている。すなわち、うつ病患者はストレスに脆弱な生物学的素因を有し、外的ストレスに対して適応することができずうつ状態に陥るといった“ストレス脆弱性仮説”が支持されている。しかしながら、いつ・どこで・どのようなメカニズムによってストレス脆弱性が形成されるかについては全く不明である。最近、うつ病などの精神疾患の病態に対して、成体海馬における神経新生の役割が注目されている。慢性ストレスを負荷したマウスは海馬神経新生の低下を認め、逆に抗うつ薬投与によって神経新生が増加することが知られている。しかし、申請者らのこれまでの解析から、ストレス脆弱性の臨界期は脳発達期にあると推測するものの、海馬神経新生と行動制御・細胞機能との関連研究は専ら成獣動物を用いており、脳発達段階における海馬神経新生とストレス脆弱性との関連は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、精神疾患の発症に深く関わるストレス脆弱性の形成機序における細胞・分子基盤を明らかにすることである。ストレス脆弱性の亢進はうつ病などの精神疾患の発症リスクを高める。しかし、ストレス脆弱性の分子・細胞基盤に関する基礎的研究は圧倒的に不足している。本研究では、申請者らの先行研究結果から、“脳発達段階における神経新生を介した神経機能障害がストレス脆弱性の形成に深く関与している”との仮説を立てた。この仮説を実証するため、独自に確立したストレス脆弱性マウスを用いて脳発達期海馬神経新生のストレス脆弱性に対する役割を明らかにする。本研究により、

ストレスに強い脳と弱い脳の分子・細胞基盤が明らかとなれば、精神疾患発症機序の理解が深まり、新たな治療法の開発につながる。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

4週齢と8週齢の雄性 C57BL/6 (B6) マウスと BALB/c (BALB) マウス、ならびに恒常的活性化型スタスミン過剰発現マウス(Stat4A 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、使用許可を得た(承認番号 27-010、27-011)。

### (2) 神経新生評価

マウスに 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を投与し、2時間に灌流固定した。脳凍結切片(30 µm)を作製し、Click-iT EdU Imaging Kit (Life technologies)を用いて EdU を蛍光標識した。また、未成熟ニューロンを検出するためのマーカーである doublecortin (DCX) 抗体を用いた免疫染色を行った。蛍光顕微鏡にて切片を観察し、EdU 陽性細胞数(歯状回全体)と DCX 陽性細胞数を定量解析した(Martel et al., 2016)<sup>1)</sup>。

### (3) 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。

### (4) 行動評価

Forced swim test: マウスを 22-23 の水の入ったシリンダーに入れ、5分間における無動時間と最初に無動を示すまでの時間(latency)を測定した(Higuchi et al., 2016)<sup>2)</sup>。

Novelty-suppressed feeding test: 一晩

絶食したテストマウスを 30cm 四方の箱の隅に置いた。この箱の中央にはエサが置いてあり、マウスがエサを食べるまでの時間 (latency) を測定した。Latency が長いほど不安行動が増加していると考えられている (Abe-Higuchi et al., 2016)<sup>3)</sup>。

#### (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) マウス発達段階における神経新生が成体期のストレス脆弱性を調節しているかを検討した。その結果、ストレス脆弱性マウスはストレス耐性を有するマウスに比して幼若期の海馬歯状回における神経新生が有意に低下していた。また、幼若期のストレス脆弱性マウスにメマンチンを投与して神経新生を増加させたところ、成獣期にストレス耐性を獲得すなわちレジリエンス形成を認めた。この結果は、幼若期海馬神経新生がその後のストレス適応機構を制御している可能性を示唆している。

(2) マウス発達段階におけるスタスミンが神経新生ならびにストレス脆弱性の発現に関与しているかを検討した。スタスミンは幼若期マウスの海馬歯状回に特に高発現していること、また、免疫組織化学的解析により、ダブルコルチン陽性細胞に発現していることを確認し、スタスミンが幼若期の神経新生あるいは神経細胞の成熟に関与していることの間接証拠を得ることができた。そこで、幼若期のマウス海馬歯状回に恒常的活性化型スタスミンを過剰発現させたマウスは神経新生の低下を示した。また、幼若期のマウス海馬歯状回に恒常的活性化型スタスミン

を過剰発現させたマウスは、その後の (成体期) ストレス負荷に対して脆弱性を示した。以上の結果から、スタスミンを介した海馬神経新生の制御がストレス脆弱性の形成に関与していることが示唆された。

(3) スタスミンは微小管活性を負に制御する分子である。そこで微小管活性促進剤であり FDA承認薬でもある paclitaxel をストレス脆弱性マウスの脳内に直接投与し (10nM, 1ul/side, n=20)、海馬神経新生ならびにストレス脆弱性への効果を解析した。その結果、paclitaxel 投与により神経新生 (分化) の促進とストレス耐性を確認した。

#### (4) まとめ

以上の一連の結果から、幼若期海馬神経新生と成体期におけるストレス適応機構に関連があることが強く示唆された。さらにこの分子基盤として、歯状回に高発現しているスタスミンが関与すること、ならびにスタスミンによる微小管活性が神経新生制御を介してストレス適応機構に関わっていることが示唆された。今後、本研究成果をさらに発展させて成体期のストレス適応機構の制御法を開発することで、ストレス性精神疾患の新たな治療法の確立が期待できる。

#### < 引用文献 >

- 1) Martel G, Uchida S, Hevi C, Chévere-Torres I, Fuentes I, Park YJ, Hafeez H, Yamagata H, Watanabe Y, Shumyatsky GP: Genetic demonstration of a role for stathmin in adult hippocampal neurogenesis, spinogenesis, and NMDA receptor-dependent memory. *The Journal of Neuroscience* 36(4): 1185-1202, 2016.
- 2) Higuchi F, Uchida S, Yamagata H, Abe-Higuchi N, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Shintaku T, Itoh Y, Suzuki T, Watanabe Y: Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in

Mice. *The Journal of Neuroscience* 36(27): 7253-7267, 2016.

- 3) Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H, Higuchi F, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Watanabe Y: Hippocampal Sirtuin 1 Signaling Mediates Depression-like Behavior. *Biological Psychiatry* 80(11): 815-826, 2016.

## 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 14 件)

Uchida S, Shumyatsky GP. Epigenetic regulation of Fgf1 transcription by CRTG1 and memory enhancement. *Brain Res Bull* 2018 (in press). 査読有. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.02.016.

Uchida S, Yamagata H, Seki T, Watanabe Y. Epigenetic mechanisms of major depression: Targeting neuronal plasticity. *Psychiatry Clin Neurosci* 72: 212-227, 2018. 査読有.

doi: 10.1111/pcn.12621.

Uchida S, Shumyatsky GP. Synaptically localized transcriptional regulators in memory formation. *Neuroscience* 370:4-13, 2018. 査読有.

doi:10.1016/j.neuroscience.2017.07.023.

内田周作: 非コード RNA による脳機能制御とその破綻による精神疾患. *精神神経学雑誌* (印刷中). 2018. 査読無

内田周作: うつ病・不安障害におけるサーチユインの役割と創薬への可能性. *日本生物学的精神医学会誌* (印刷中). 2018. 査読無

Yamagata H, Uchida S, Matsuo K, Harada K, Kobayashi A, Nakashima M, Higuchi F, Watanuki T, Matsubara T, Watanabe Y. Altered plasma protein glycosylation in

a mouse model of depression and in patients with major depression. *Journal of Affective Disorders* 233:79-85, 2017. 査読有.

doi: 10.1016/j.jad.2017.08.057.

Yamagata H, Uchida S, Matsuo K, Harada K, Kobayashi A, Nakashima M, Nakano M, Otsuki K, Abe-Higuchi N, Higuchi F, Watanuki T, Matsubara T, Miyata S, Fukuda M, Mikuni M, Watanabe Y. Identification of commonly altered genes between in major depressive disorder and a mouse model of depression. *Scientific Reports* 7(1):3044, 2017. 査読有. doi: 10.1038/s41598-017-03291-x.

Uchida S, Teubner BJ, Hevi C, Hara K, Kobayashi A, Dave RM, Shintaku T., Jaikhan P, Yamagata H, Suzuki T, Watanabe Y, Zakharenko SS, Shumyatsky GP. CRTG1 Nuclear Translocation Following Learning Modulates Memory Strength via Exchange of Chromatin Remodeling Complexes on the Fgf1 Gene. *Cell Reports* 18(2):352-366, 2017. 査読有. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.052.

内田周作: ストレスに強い脳をつくる運動トレーニングの制御機構. *体育の科学* vol 67 (5): 315-319, 2017 杏林書院. 査読無.

<https://ci.nii.ac.jp/naid/40021181009>

内田周作: 注目の遺伝子「Sirtuin 1 遺伝子」. *分子精神医学* vol 17(3): 63-65, 2017 先端医学社. 査読無.

<https://ci.nii.ac.jp/nrid/9000362196690>

内田周作, 渡邊義文: うつ病におけるヒストン脱アセチル化酵素の役割と新たな治療薬創出の試み. *精神医学* vol. 59, no. 11: 1045-1054, 2017 医学書院. 査読有.

<https://doi.org/10.11477/mf.1405205488>

Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H,

Higuchi F, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Watanabe Y: Hippocampal Sirtuin 1 Signaling Mediates Depression-like Behavior. *Biological Psychiatry* 80(11): 815-826, 2016. 査読有.

doi: 10.1016/j.biopsych.2016.01.009.

Higuchi F, Uchida S, Yamagata H, Abe-Higuchi N, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Shintaku T, Itoh Y, Suzuki T, Watanabe Y: Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. *The Journal of Neuroscience* 36(27): 7253-7267, 2016. 査読有.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0319-16.2016.

Martel G, Uchida S, Hevi C, Chévere-Torres I, Fuentes I, Park YJ, Hafeez H, Yamagata H, Watanabe Y, Shumyatsky GP: Genetic demonstration of a role for stathmin in adult hippocampal neurogenesis, spinogenesis, and NMDA receptor-dependent memory. *The Journal of Neuroscience* 36(4): 1185-1202, 2016. 査読有.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.4541-14.2016.

[学会発表](計8件)

内田周作. うつ病・不安障害におけるサーチュインの役割と創薬への可能性. 第39回日本生物学的精神医学会 第47回日本神経精神薬理合同年会. 2017年

内田周作. 非コードRNAによる脳機能制御とその破綻による精神疾患. 第113回日本精神神経学会. 2017年

關友恵、内田周作. Altered expression of long noncoding RNAs in patients with major depression. 北米神経科学会. 2017年

内田周作. MicroRNA profiling of the ventral hippocampus in stress-resilient and stress-susceptible mice. 北米神経科

学会. 2017年

内田周作. ストレス適応破綻からみたうつ病態における神経可塑性異常とその分子基盤. 第38回日本生物学的精神医学会 第59回日本神経化学会大会合同年会. 2016年

内田周作. Genetic activation of stathmin impairs adult hippocampal neurogenesis, spinogenesis, and NMDA receptor-dependent memory. 北米神経科学会. 2015年

内田周作. エピジェネティクスによるうつ病の分子・細胞基盤. 生物学的精神医学会. 2015年

内田周作. レジリエンスの視点からうつ病の発症・回復の分子メカニズムを理解する. 生物学的精神医学会. 2015年

[図書](計0件)

[産業財産権](計0件)

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 周作 (UCHIDA, Shusaku)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10403669