

令和元年6月5日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07100

研究課題名(和文) うつ病発症における遺伝・環境・個別的要因の相互作用が検討可能な動物モデル

研究課題名(英文) New behavioral animal model to study genetic and environmental factors in the cause of depression

研究代表者

土江 伸誉 (DOE, Nobutake)

兵庫医療大学・共通教育センター・講師

研究者番号：00434879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの水迷路学習場面において、プラットホームサイズの縮小と装置外手掛かりの制限により課題の難度をある一定の水準以上に設定すると、一部の被験体が、適応的な学習を徐々に諦め、顕著な不動反応を特徴とする無力状態に陥ることを発見した。本研究では、この無力マウスのうつ状態の背景にある遺伝子の関わりについて検討するために、海馬サンプルのDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、Ttr(トランスサイレチン)の発現低下を含むいくつかの遺伝子の発現変化が認められた。つまり、海馬におけるTtrの発現低下がマウスのうつ状態の誘発に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で扱ったうつ動物モデルは、遺伝的相同性が極めて高い近交系マウスを被験体としながら、うつ状態に陥る個体と健全性を維持する個体を並行して得ることができる実験系である。今回、うつ状態に陥った個体の海馬において発現低下が認められたTtr(トランスサイレチン)は、エピジェネティックなメカニズムの制御を受けて抗うつ効果の発現に関わっていると推測される遺伝子である。つまり、マウスのうつ状態の誘発には、Ttr等の遺伝子のエピジェネティックなメカニズムを介した変化に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new animal model of depression by modifying the water maze learning task in mice. When the difficulty of the task is increased by downsizing of the platform and removing external cues, some of the mice gradually abandon adaptive learning and become immobile; this response indicates a depression-like states. In this research, DNA microarray analysis of hippocampus was performed to investigate the genes contributing to depression-like phenotypes of the helpless mice. The analysis followed by validation using real-time PCR revealed significant alteration in the expression of several genes, including downregulation of Ttr (transthyretin). Thus, it is possible that the decrease in Ttr expression in the hippocampus may be involved in the induction of depressant-like states in mice.

研究分野：実験心理学

キーワード：うつ病 動物モデル 水迷路学習 マウス 行動的絶望 発症脆弱性 個体差 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病の病因究明や新規治療薬候補の前臨床的評価を行うために、齧歯類を用いたうつ動物モデルは必要不可欠である。研究代表者は、雄性の C57BL/6N マウスを被験体とする水迷路学習実験の場面において、プラットホームのサイズとプールの周囲の環境を操作して課題の難度をある一定の水準以上に設定すると、一部の被験体が、プラットホームへの速やかな逃避という適応的対処行動の学習を徐々に放棄し、遂には行動的絶望状態に陥ることを発見した(鬱モデルマウス作製法(特許第 4619823 号), Doe et al., 2010)。我々は、これらの個体を "Loser"、対して、良好な学習を示す個体を "Winner" と命名した。Loser は、自発活動性の低下、血中コルチコステロンの増加、脳内セロトニンの減少、海馬神経細胞新生の抑制といった特徴を示す。また、Loser は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)を含むいくつかのクラスの抗うつ薬へ明確な感受性を持つ。Loser という動物個体、また、Loser を得るための実験手続きは、従来のうつ動物モデルが抱える問題点の多くを解消しており、次世代の新しいうつ動物モデルとして期待される。

2. 研究の目的

上記のうつ動物モデル(以下 Winner-Loser モデル)は、遺伝的相同性が非常に高い近交系マウスに同一の実験課題を与えるにも関わらず、うつ的な表現型を示す Loser と健全性を維持する Winner が並行して得られるという点を特徴とする実験系である。この特徴を活かし、本研究では、Winner-Loser モデルを、うつ病発症に関わる遺伝、環境、個別要因の相互作用について検討可能なモデルとして確立し、提案することを目指した。

3. 研究の方法

(1) Winner-Loser モデルの妥当性の検証

雄性の C57BL/6N マウスを被験体とし、困難な水迷路学習実験の場面において 1 日 5 試行の逃避訓練を 8 日間連続で行った際、訓練最終日の全試行で規定時間内の逃避に失敗した個体を Loser、同日の全試行で逃避に成功した個体を Winner と定義した。Loser の表面的妥当性を補強する目的で、オープンフィールドや高架式十字迷路等、10 種類以上の実験課題よりなる行動テストバッテリーを用いて行動学的な表現型解析を行った。また、うつ動物モデルとしての構成概念妥当性を検証する目的で、うつの成因に関する様々な生物学的仮説と照らし合わせながら、血中のコルチコステロンやサイトカインの濃度を測定した。Loser の比較対照としては、同時に得られた Winner、実験処置なしに並行飼育したマウス、更に、既存のうつ動物モデルである強制水泳(Porsolt et al., 1977)、オープンスペース水泳(Sun & Alkon, 2003)、慢性的弱ストレス(Wilner, 2005)、ないしは社会的敗北(Golden et al., 2011)といったストレス性の処置を施したマウスを用いた。

(2) Winner-Loser モデルを用いたマウスの行動学的表現型解析

遺伝子改変マウスや病態モデルマウスの行動学的表現型の解析に Winner-Loser モデルが利用可能か否かについて検討した。困難な水迷路学習実験手続きを、うつ的な表現型が想定される遺伝子改変マウスや脳梗塞モデルマウスに対して応用し、学習成績やうつ的な表現型を示す Loser タイプの個体の出現率を指標として分析した。

(3) Loser の海馬サンプルの遺伝子発現解析

Loser のうつ的な表現型に関連する遺伝子群の特定を目指し、うつの発症と関連が深いと考えられる海馬をサンプルに、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を実施した。解析データは、IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 等のソフトウェアを用いて分析し、発現に有意な差が認められた遺伝子の生物学的な機能の特定やうつ病を含む様々な疾患との関連付けを行った。

4. 研究成果

(1) Loser の行動学的表現型とうつ関連の生化学的指標の特徴

網羅的な行動解析の結果、Loser では、オープンフィールド場面における探索行動の抑制やスクロース選好率の低下が見られ、うつ的な傾向が確認された。うつ的な傾向の表れ方や抗うつ薬への感受性に関しては、強制水泳処置、慢性的弱ストレス処置、あるいは社会的敗北処置を負荷したマウスとは異なる傾向があり、オープンスペース水泳処置を負荷したマウスと多くの類似点が見られた。しかしながら、Loser は、行動的絶望状態が長期間にわたって持続し、適応的対処行動への動機づけが総じて低いという点で特徴的であった。ストレス反応の指標のひとつであるコルチコステロン濃度に関して、Loser は、Winner より有意に高い値を示したものの、強制水泳処置、オープンスペース水泳処置、持続的弱ストレス処置、あるいは社会的敗北処置を施したうつ動物モデルマウスよりは低い傾向にあった。更に、うつ病のバイオマーカーとしての可能性が指摘されている血中サイトカイン濃度をマルチサスペンションアレイを用いて測定したところ、Loser は、IL-1 β 、IL-1 α 、TNF- α の上昇等、ヒトのうつ病患者に見られる変化と一部類似した特徴を示した。

(2) マウスのうつ的な傾向の評価系としての Winner-Loser モデルの有用性

強制水泳テストやスクロース選好テスト等の既存のうつ病的傾向の評価系の結果から、うつ的な表現型を持つことが想定された IL-18 遺伝子欠損マウス(Yamanishi et al., 2019)、Ets2 遺伝子欠損マウス(Yamamoto et al., 1998)、および中大脳動脈 M1 遠位部永久結紮によって作製する脳梗塞モデルマウス(Taguchi et al., 2010)に対して Winner-Loser モデルの実験手続きを適用した。その結果、これらのマウスでは、それぞれの比較対照マウスより学習成績が悪く、学習訓練期の後期には単位時間あたりの水泳距離の短縮や水泳速度の低下が見られ、行動的絶望状態を示す Loser タイプの出現率も高かった。つまり、これらのマウスがうつ的な表現型を持つことが示唆されると共に、Winner-Loser モデル(困難な水迷路学習実験手続き)が、マウスのうつ病的傾向の評価系として有用であることが示された。

(3)Loser の海馬サンプルの遺伝子発現解析の結果

Loser の行動的絶望状態の背景要因を探索するために、海馬の DNA マイクロアレイ解析を実施したところ、Loser と Winner(あるいは無処置統制マウス)との間で、うつ、ストレス、認知機能等との関連が報告されている複数の遺伝子の発現に有意な差が見られた。特に注目すべき結果としては、うつ病患者と健常者を比較した臨床研究やマウス・ラットのうつモデルを用いた基礎研究においてうつとの関連が指摘されている Ttr(トランスサイレチン)の発現が Loser で低下していた。

(4)まとめと今後の課題

一卵性双生児のように遺伝的に等しい素因を持つ者が同じ環境で育っても、うつ病を発症する者と健常性を維持する者とは分かれる場合は少なくない。このようなヒトのうつ病の発症に個人差があるという実態を Winner-Loser モデルはよく模し得ている。本研究では、行動指標および生化学的指標に基づく分析によって、Loser とうつ病患者の類似性を多く見出すことができた。一卵性双生児の一方だけがうつ病を発症した場合、その原因は非共有環境(兄弟の一方しか経験しなかった環境要因)に求められるが、発症の有無を担保する生物学的な背景メカニズムとしてはエピジェネティックな変化が仮定される。Loser において発現の低下が認められた Ttr は、エピジェネティックなメカニズムの制御を受けてうつ病の発症ないしは抗うつ効果の発現に関わっていると推測されている(Yamawaki et al., 2012)。つまり、Loser のうつ病的傾向もエピジェネティックなメカニズムを介して形成された可能性があり、今後より詳細な検討を加える価値があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Yamanishi, K., Doe, N., Mukai, K., Ikubo, K., Hashimoto, T., Uwa, N., Sumida, M., El-Darawish, Y., Gamachi, N., Li W., Kuwahara-Otani, S., Maeda, S., Watanabe, Y., Hayakawa, T., Yamanishi, H., Matsuyama, T., Yagi, H., Okamura, H., & Matsunaga, H. (2019). Interleukin-18-deficient mice develop hippocampal abnormalities related to possible depressive-like behaviors. *Neuroscience*, 408, 147-160.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.003>

Tatebayashi, K., Takagi, T., Fujita, M., Doe, N., Nakagomi, T., Matsuyama, T., & Yoshimura, S. (2019). Adipose-derived stem cell therapy inhibits the deterioration of cerebral infarction by altering macrophage kinetics. *Brain Research*, 1712, 139-150.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.01.037>

Kuramoto, Y., Takagi, T., Tatebayashi, K., Beppu, M., Doe, N., Fujita, M., & Yoshimura, S. (2019). Intravenous administration of human adipose-derived stem cells ameliorates motor and cognitive function for intracerebral hemorrhage mouse model. *Brain Research*, 1711, 58-67.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.042>

土江伸誉 (2017). マウスのモリス型水迷路学習課題における実験装置の条件設定の重要性. *行動科学*, 55(2), 1-11.

http://www.jabs.jp/kikanshi_backnum.html#55-2

Ikubo, K., Yamanishi, K., Doe, N., Hashimoto, T., Sumida, M., Watanabe, Y., El-Darawish, Y., Li, W., Okamura, H., Yamanishi, H., Matsunaga, H. (2017). Molecular analysis of the mouse brain exposed to chronic mild stress: The influence of hepatocyte nuclear factor 4 on physiological homeostasis. *Molecular Medicine Reports*, 16, 301-309.

DOI: 10.3892/mmr.2017.6577

Miyake, K., Ohta, T., Nakayama, H., Doe, N., Terao, Y., Oiki, E., Nagatomo, I., Yamashita, Y., Abe, T., Nishikura, K., Kumanogoh, A., Hashimoto, K., & Kawahara, Y. (2016). CAPS1 RNA editing promotes dense core vesicle exocytosis. *Cell Reports*, 17, 2004-2014.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.073>

〔学会発表〕(計6件)

山西恭輔・土江伸誉・橋本卓也・井窪薫・向井馨一郎・澄田美保・大谷(桑原)佐知・前田誠司・李文・渡邊優子・宇和典子・早川徹・山西博道・岡村春樹・松永寿人 (2018). インターロイキン 18 の欠損状態がうつ病など精神症状発現に及ぼす影響について～精神と免疫のクロストーク. 第 114 回日本精神神経学会学術総会

土江伸誉・高橋佑奈・長永夕奈 (2018). 複数の行動実験課題を併用したマウスのうつの傾向の評価. 日本実験動物技術者協会関西支部平成 29 年度春季大会

Yamanishi, K., Doe, N., Mukai, K., Ikubo, K., Hashimoto, T., Uwa, N., Sumida, M., Kuwahara-Otani, S., Maeda, S., Watanabe, Y., Li, W., Hayakawa, T., Okamura, H., Yamanishi, H., & Matsunaga, H. (2017). Interleukin-18-deficient mice develop dysfunction of hippocampus resulting in depression-like behavior. WPA XVII World Congress of Psychiatry

山西恭輔・松永寿人・土江伸誉・橋本卓也・井窪薫・澄田美保・大谷(桑原)佐知・前田誠司・李文・渡邊優子・宇和典子・早川徹・山西博道・岡村春樹 (2017). IL18 の欠損状態がうつ病など精神症状発現に及ぼす影響について -IL18 欠損マウスを用いた多角的検討- 第 113 回日本精神神経学会学術総会

Yamanishi, K., Doe, N., Ikubo, K., Sumida, M., Kuwahara-Otani, S., Maeda, S., Watanabe, Y., Yoshida, M., Li, W., Hayakawa, T., Okamura, H., Yamanishi, H., & Matsunaga, H. (2016). Interleukin-18-deficient mice develop dysfunction of hippocampus resulting in depression-like behavior. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology

村山真人・笠原恵美子・澤野俊憲・山本英幸・桐山美香・土江伸誉・関山敦生 (2016). 水迷路学習場面で出現する行動的絶望マウスの血中サイトカイン濃度パターンの分析. 第 39 回日本分子生物学会年会

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。