

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18891

研究課題名(和文) エピジェネティクスに注目したGABAB1a発現制御の病態的意義に関する研究

研究課題名(英文) The involvement of epigenetic regulation of GABAB1a in the pathophysiologies

研究代表者

荒木 良太 (ARAKI, Ryota)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：90710682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの検討から我々は、エピジェネティクスの変動による背側縫線核の興奮制御異常が環境要因による精神疾患の発症/病態に關与する可能性を想定している。本研究では、社会的敗北ストレス負荷マウスの背側縫線核におけるGABA/5-HT神経系関連遺伝子の発現変動やエピジェネティクス変動と、大脳皮質前頭前野における5-HT神経系の機能変調を明らかにした。これら異常が精神機能異常に關与する可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have implied the possibility that epigenetic modification-induced abnormal regulation of neuronal excitability in the dorsal raphe nucleus may cause environmental factor-induced psychiatric disorders. In this study, we showed that alterations of the expression and epigenetic modification in GABA/5-HTergic neuron-related genes in the dorsal raphe nucleus of social defeat stress model mice. Furthermore, we also found the alterations of the prefrontal 5-HTergic function in the social defeat stress model mice. These transcriptional and neurochemical alterations may be involved in the environmental factor-induced psychological dysfunctions.

研究分野：神経精神薬理

キーワード：エピジェネティクス セロトニン GABA 環境要因

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに精神疾患の分子基盤を明らかにすることを旨とし、ゲノムワイド関連解析や遺伝子改変動物の解析など遺伝的要因に注目した研究が多数行われてきた。しかしながら、遺伝的要因に注目した研究だけでは精神疾患の分子基盤のすべてを説明するには至らず、こうした研究とは異なるアプローチ、すなわち環境要因に注目した精神疾患の分子基盤解析が求められている。

幼弱期より1匹で隔離飼育した雄性マウスは、成熟後に多動、過剰な攻撃行動、うつ様行動、不安様行動などの異常行動を示す。こうした異常行動は抗精神病薬、抗うつ薬、抗不安薬により抑制されることから、本マウスは環境要因により精神疾患が発症するメカニズムを追究する上で有用なモデルと考えられる。我々はこれまでに、セロトニン(5-HT)神経の起始核である背側縫線核に発現しているGABA<sub>B</sub>受容体により隔離飼育マウスの多動や攻撃行動が制御されること、隔離飼育マウスの背側縫線核ではGABA<sub>B</sub>受容体のサブユニットであるGABA<sub>B1a</sub>の発現量が増加していることなどを明らかにしてきた。背側縫線核のGABA<sub>B</sub>受容体は5-HT神経系の興奮制御において重要であることが知られていることから、我々は、環境要因により背側縫線核の興奮制御に異常が生じることで、多動や攻撃行動などの異常行動が誘発される可能性を考えている。

さらに我々は、隔離飼育マウスの背側縫線核では、GABA<sub>B1a</sub>遺伝子のプロモーター領域においてDNAの低メチル化とヒストンの高アセチル化を見出し、環境要因により誘発される背側縫線核の興奮制御異常に、DNAやヒストンタンパク質の化学的修飾による遺伝子発現制御、すなわちエピジェネティクスが関与するものと想定している。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて我々は、「エピジェネティクスの変動による背側縫線核の興奮制御異常が環境要因による精神疾患の発症/病態に関与する」という仮説を立てた。本研究では上述の仮説を検証するために、複数の精神疾患モデル動物において、背側縫線核の興奮を制御する遺伝子のエピジェネティクス制御について解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 社会的敗北ストレス負荷マウスの作製方法

社会的敗北ストレス負荷マウスの作製には7週齢の雄性C57BL/6Jマウスを用いた。雄性ICR系リタイアマウスを1匹で飼育しているケージの中にC57BL/6Jマウスを入れ、

ICRマウスにC57BL/6Jマウスを10分間攻撃させた。その後、小さな穴の開いたアクリル板でC57BL/6JマウスとICRマウスを分離し、約24時間同ケージ内で飼育した。こうした一連の作業を10日間繰り返すことで、社会的敗北ストレスを負荷した。mRNA発現量の解析、タンパク質発現量の解析、DNAメチル化の解析、5-HT代謝回転の解析、社会性相互作用試験はストレス負荷最終日の翌日に、高架式十字迷路試験はストレス負荷最終日の2日後に、細胞外5-HT量の解析はストレス負荷最終日の2~7日後に行った。

### (2) コルチコステロン慢性投与マウスの作製方法

コルチコステロン慢性投与は、7週齢のddY系雄性マウスにコルチコステロンを40mg/kgの用量で1日1回14日間皮下投与することで作製した。mRNA発現量の解析は最終投与の翌日に行った。

### (3) mRNA発現量、タンパク質発現量、DNAメチル化量、Egr-1結合量の解析

mRNA発現量はreal-time PCRにより、タンパク質発現量はウェスタンブロット法により、DNAメチル化量はMethylated CpG island recovery assayにより、Egr-1結合量はクロマチン免疫沈降(ChIP)法により解析した。

### (4) 5-HT代謝回転の解析

マウスから解析脳領域を採取後、ホモジナイズし、高速液体クロマトグラフィー-電気化学検出器(HPLC-ECD)システムを用いて5-HTの含量と5-HTの代謝物である5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)の含量を測定した。5-HTの代謝回転は5-HIAA/5-HTとして算出した。

### (5) 脳内の細胞外5-HT量の解析

脳内の細胞外5-HT量は、*in vivo*脳微小透析法により解析した。麻酔下のマウスにおいて、大脳皮質前頭前野(ブレグマより1.9mm前方、0.5mm右側方、頭蓋表面より深さ0.8mm)にガイドカニューレを挿入固定した。測定時に透析プローブを挿入し、リンゲル液を流速1.0μL/分で灌流し、20分毎にサンプルを回収し、直ちにHPLC-ECDシステムに連続自動注入し、経時的に測定した。脱分極刺激は、50mMの高カリウム溶液を大脳皮質前頭前野に20分間局所灌流することで負荷した。定常状態の遊離量の評価は、5-HT再取り込み阻害薬であるフルオキセチンを10μMの用量で大脳皮質前頭前野に局所灌流し、5-HTの再取り込みを阻害した状態での細胞外5-HT量を測定することで評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 精神疾患モデル動物の背側縫線核におけるGABA神経系関連遺伝子の発現量解析

まず我々は、うつ病のモデル動物として頻用されている社会的敗北ストレス負荷マウスおよびコルチコステロン慢性投与マウスを用いて、背側縫線核における GABA 神経系関連遺伝子の mRNA 発現量を解析した。その結果、社会的敗北ストレス負荷マウスおよびコルチコステロン慢性投与マウスともに、背側縫線核において GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量が減少していた。

#### (2) GABA<sub>B1a</sub> の発現量を調節する機序の解析

隔離飼育マウスの背側縫線核では GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量が増加していたことや、社会的敗北ストレス負荷マウスやコルチコステロン慢性投与マウスでの背側縫線核では GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量が減少していたことから、背側縫線核の GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量は環境要因による影響を受けやすい遺伝子であるものと考えられる。そこで次に、GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量を調節する機序を明らかにするために、*in vitro* において検討を行った。これまでに、GABA<sub>B1a</sub> 遺伝子の CpG アイランド領域に最初期遺伝子 Egr-1 の結合配列が存在すること、Egr-1 は DNA メチル基転移酵素やヒストン脱アセチル化酵素といったエピジェネティクス状態を変動させる酵素と複合体を形成すること、隔離飼育マウスの背側縫線核では Egr-1 の mRNA 発現量が減少していることが明らかとなっており、Egr-1 の発現量が GABA<sub>B1a</sub> のエピジェネティックな発現調節に関与する可能性が考えられる。そこで、マウス神経芽細胞腫由来細胞株 Neuro2a 細胞を用いて、GABA<sub>B1a</sub> の発現調節における Egr-1 の関与を解析した。まず ChIP 法を行うことで、GABA<sub>B1a</sub> の CpG アイランド領域に Egr-1 が結合することを明らかにした。さらに、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (100 ng/ml) の添加により Egr-1 の発現を誘導させることで、GABA<sub>B1a</sub> の CpG アイランド領域における Egr-1 の結合量が PMA 添加 4 時間後をピークに増加することを見出した。また、GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量は PMA 添加の 48 時間後から減少する傾向が見られた。本結果から、発現誘導された Egr-1 が GABA<sub>B1a</sub> の CpG アイランド領域に結合することで、GABA<sub>B1a</sub> の発現量を調節している可能性が示された。今後、こうした Egr-1 による GABA<sub>B1a</sub> の発現制御におけるエピジェネティクスの関与を明らかにしていく必要があるものと考えられる。

#### (3) 精神疾患モデル動物の背側縫線核における 5-HT 神経系関連遺伝子の発現量解析

次に、社会的敗北ストレス負荷マウスおよびコルチコステロン慢性投与マウスの背側縫線核において、5-HT 神経系関連遺伝子の mRNA 発現量を解析した。その結果、社会的敗北ストレス負荷マウスにおいて、5-HT の合成酵素である Tph2 の mRNA 発現量が増加していることを見出した。また、Tph2 の発現増加はタンパク質レベルでも確認された。コルチコ

ステロン慢性投与マウスでは Tph2 の mRNA 発現量に変動は見られなかった。

#### (4) 社会的敗北ストレス負荷マウスの背側縫線核における Tph2 遺伝子のエピジェネティクス解析

社会的敗北ストレス負荷マウスでは、背側縫線核において 5-HT 合成酵素である Tph2 の発現量が増加していたことから、次に Tph2 遺伝子の DNA メチル化状態について解析した。Tph2 遺伝子に存在する 8 個の CpG アイランド領域の DNA メチル化割合について解析したところ、社会的敗北ストレス負荷マウスの背側縫線核では Tph2 遺伝子の exon4 近辺に存在する CpG アイランド領域での DNA のメチル化が大きく減少していることを見出した。今回 DNA メチル化の減少が見られた領域は、一般的に転写調節に関与すると考えられているプロモーター領域ではなく、実際に転写される gene body 領域であった。現段階では gene body 領域の DNA メチル化と転写調節との関連性は不明であるが、今回見出した gene body 領域の DNA メチル化が Tph2 の転写調節に関与している可能性も考えられる。

#### (5) 社会的敗北ストレス負荷マウスの 5-HT 神経系の解析

社会的敗北ストレス負荷マウスの 5-HT 神経系の機能に関しても解析を行った。その結果、社会的敗北ストレス負荷マウスでは背側縫線核において 5-HT の代謝回転が減少していた一方で、大脳皮質前頭前野においては 5-HT の代謝回転が増加していることを見出した。側坐核や扁桃体においても解析を行ったが、これらの脳領域では 5-HT 代謝回転に変動は見られなかった。さらに、*in vivo* 脳微小透析法による解析から、社会的敗北ストレス負荷マウスでは大脳皮質前頭前野の細胞外 5-HT 量が増加していること、定常状態での 5-HT 遊離量および脱分極刺激による 5-HT 遊離量とともに減少しているも明らかにした。こうした結果から、社会的敗北ストレス負荷マウスでは、背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射する 5-HT 神経系に異常が生じているものと考えられた。また、これら 5-HT 神経系の異常は、高架式十字迷路試験におけるオープンアーム侵入回数といった不安様行動と相関していることを見出した。本結果は、社会的敗北ストレスの負荷により、背側縫線核において Tph2 遺伝子などの 5-HT 神経系関連遺伝子領域のエピジェネティクスが変動することで、5-HT 神経系の機能に変調が生じ、不安様行動が誘発される可能性を示すものである。

#### 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)

[学会発表](計1件)

田中佑樹、田中絵理、平城陽介、吾郷由希夫、  
荒木良太、矢部武士、社会的敗北ストレス負  
荷マウスの行動異常とセロトニン神経系機  
能異常の相関性、日本薬学会第 137 年会、金  
沢、2018 年 3 月 26 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

荒木 良太 (ARAKI, Ryota)  
摂南大学・薬学部・助教  
研究者番号：9 0 7 1 0 6 8 2