

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19781

研究課題名(和文) 双極性障害発症に関わる時計遺伝子Rev-erb のセロトニン神経系制御機構

研究課題名(英文) Controlling mechanisms of the serotonergic system by a clock gene Rev-erb alpha relating to bipolar disorder

研究代表者

大塚 剛司(Otsuka, Tsuyoshi)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：60760395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、時計遺伝子Rev-erb を介した双極性障害発症の分子メカニズムを解明するため、セロトニン神経系に着目して研究を行った。その結果、Rev-erb の機能異常は、縫線核から前頭前皮質に投射されるセロトニン神経系の活動低下を示すことを見出した。さらにRev-erb は神経新生に深く関わり、これが障害されることでセロトニン放出が阻害され、情動障害を発症する可能性が示された。以上より、本研究成果は時計遺伝子Rev-erb を介した新たな双極性障害発症メカニズムの解明に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Dysfunction of Rev-erb , a core circadian clock gene, has been associated with Pathogenesis of affective disorder including bipolar disorder. However, detailed molecular mechanisms remain unclear. In this study, we found dysregulation of serotonergic system in Rev-erb knockout mice. Despite a reduction in genes expression of key enzymes of serotonin synthesis, knockout mice show normal levels of serotonin and its metabolite in the dorsal raphe nuclei. However, prefrontal cortex, an important target of serotonin, shows the reduction of serotonin levels in knockout animals. These results indicate that serotonin release is impaired in Rev-erb knockout mice. In addition, the expression of genes related to neuronal activity was decreased in the prefrontal cortex of Rev-erb knockout mice. Therefore, we have concluded that defect in Rev-erb may play an important role in organizing the serotonergic system in mammals.

研究分野：医歯薬学

キーワード：時計遺伝子 Rev-erb セロトニン 情動障害

1. 研究開始当初の背景

現在、気分障害と呼ばれる精神疾患の患者数が急増しており、国際的に社会問題化している。そのため、気分障害の発症メカニズムや治療法の解明に向けた研究が広く行われている。気分障害の一つに双極性障害がある。双極性障害の発症メカニズムについては、これまで多くの仮説が提唱されてきたが、まだ不明な点が多い。近年、時計遺伝子 *Rev-erb* を介した生体内リズム異常が双極性障害に深く関わることが報告された。これは新たな発症メカニズム解明の鍵を握ると考えられる。しかし、正確な制御メカニズムの解明には至っておらず、これからの研究の発展が期待されている。

これまで、*Rev-erb* をノックアウト(KO)したマウスでは、情動行動に異常を示すことが報告されている。これは *Rev-erb* が中脳における Tyrosine hydroxylase の制御に関わるため、*Rev-erb* を KO するとドーパミン神経系が機能不全を起こし、その結果行動異常を引き起こすと考えられている。申請者のこれまでの研究においても、*Rev-erb* KO マウスは、中脳におけるドーパミン神経系の異常を示すことを確認した。ところが、*Rev-erb* KO マウスの前頭前皮質においては、*Htr2a* の発現低下などのセロトニン(5-HT)神経系の異常が見られた。以上のことから、「時計遺伝子 *Rev-erb* は脳部位特異的なモノアミン神経系の分泌調節に働き、情動を制御している」という仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では上記の仮説に則り、特にこれまで調べられていなかった前頭前皮質における5-HT神経系の異常を引き起こす原因と、その根底にある分子メカニズムを明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

1) 様々な脳部位における *Rev-erb* の発現解析

前頭前皮質における *Rev-erb* の発現が重要であるかを確認するため、様々な脳部位における *Rev-erb* の発現レベルと比較した。野生型(wt)マウスを12時間明期:12時間暗期の条件下で1週間馴化後、行動テストを実行した Zeitgeber time (ZT) 1~2 に脳をサンプリングし、realtime PCR により *Rev-erb* の発現解析を行った。脳は部位ごとにパンチアウトを用いて採取した。採取した部位は情動や行動、報酬、動機付けなどと深く関わる、扁桃核、視床下部、側坐核、線条核、前頭前皮質の計5部位である。

さらに前頭前皮質を再びサンプリングし、脳切片を作成後、X-gal staining により組織

学的に前頭前皮質における *Rev-erb* の局在を確認した。

2) *Rev-erb* KO マウスの行動解析および前頭前皮質における5-HT、5-HIAA 含量測定

Rev-erb KO マウスの情動行動異常を確認するため、ZT1~2 と ZT10~11 に行動テストを実施し、wt マウスと比較した。実行した行動テストはオープンフィールドテスト、Elevated plus maze テスト、強制水泳テストであった。さらに別の個体の KO マウスを用いて血液をサンプリングし、ストレスの指標である血漿コルチコステロン含量を測定して wt マウスと比較した。

次にマウスの前頭前皮質における5-HTおよびセロトニン代謝産物(5-HIAA)の含量を測定するため、行動テスト終了後、マウスの前頭前皮質および5-HT合成部位である縫線核を採取した。そして High performance liquid chromatography (HPLC) を用いて、前頭前皮質および縫線核両部位の5-HT、5-HIAA 含量を測定し、wt マウスと比較した。

3) セロトニン神経系異常の分子生物学的解析

縫線核から前頭前皮質に投射される5-HT神経系において、行動異常の原因と考えられるターゲット因子を分子生物学的な手法により探索した。まず、*Rev-erb* KO マウスの縫線核および前頭前皮質をサンプリングし、5-HT代謝経路に関わる mRNA (縫線核: *Tph2*, *Aadc*, *Slc6a4* 前頭前皮質: *Htr2a*) の発現レベルを realtime PCR を用いて解析し、wt マウスと比較した。さらに *Rev-erb* が5-HT神経系を制御するためのターゲットを特定するため、*Rev-erb* KO マウスの前頭前皮質をサンプリングし、マイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的な解析を行った。そして wt マウスと比較し、5-HT神経系と関わる遺伝子の発現レベルの変化を検証した。

4. 研究成果

1) *Rev-erb* は前頭前皮質に高発現する

wt マウスから得られた扁桃核、視床下部、側坐核、線条核、前頭前皮質の5つの脳部位を用いて、realtime PCR による *Rev-erb* の発現解析を行った結果、*Rev-erb* は線条核および前頭前皮質において、他の部位よりも優位に高発現していることがわかった。さらに X-gal staining による組織学的な検討の結果、前頭前皮質の細胞が最も染色されていたことから、*Rev-erb* は5つの脳部位の中で、前頭前皮質において高発現することがわかった。

2) *Rev-erb* KO マウスは情動行動異常および前頭前皮質の5-HT含量低下を示す

これまでの当該研究の結果から、*Rev-erb* KO マウスは、自発運動量の増加、うつ様行動および不安様行動の減少などのポジティブな行動異常を示すことがわかっている。これを確かめるために、オープンフィールドテスト、Elevated plus maze テスト、強制水泳テストを行ったところ、過去の報告と同様に、ポジティブな行動異常を示すことがわかった。ところが、詳細な行動解析の結果 *Rev-erb* KO マウスはオープンフィールドテストにおいて、不安様行動の増加を示すことがわかった。これを裏付けるように、*Rev-erb* KO マウスは血漿コルチコステロン濃度が wt マウスと比べて有意に高く、ストレスに対する反応性が増加していた。このことから、*Rev-erb* KO マウスはポジティブな行動異常と同時にネガティブな行動異常も示すことがわかった。

次に *Rev-erb* のターゲット部位である前頭前皮質における 5-HT および 5-HIAA の含量を測定した。その結果、*Rev-erb* KO マウスの前頭前皮質における 5-HT は wt マウスと比べて低い値を示した。5-HIAA 含量に有意な差はみられなかった。さらに 5-HT 合成部位である縫線核において、5-HT および 5-HIAA 含量を測定したところ、どちらの含量においても wt マウスと比べて *Rev-erb* KO マウスに有意な差はみられなかった。

3) *Rev-erb* の発現異常は神経新生や神経の活動に影響する

次に、縫線核から前頭前皮質に投射される 5-HT 神経系のどこに異常があるかを探るため、代謝経路に関わる mRNA の発現レベルを測定した。その結果、縫線核における代謝酵素 (*Tph2*, *Aadc*) および 5-HT transporter (*Slc6a4*) さらに前頭前皮質の 5-HT receptor (*Htr2a*) の mRNA の発現レベルが、wt マウスと比べて軒並み減少していることがわかった。そこで、*Rev-erb* が 5-HT 神経系を制御するターゲットを特定するため、マイクロアレイにより前頭前皮質の網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、*Rev-erb* KO マウスは神経新生や神経活動に関わる遺伝子群が減少傾向にあった。さらに神経活動のマーカーとして知られる *Fos*, *Arc*, *Egr1* の発現量を確認したところ、*Rev-erb* KO マウスは wt マウスと比べてこれらの遺伝子発現が有意に減少していた。

総括すると、*Rev-erb* KO マウスはポジティブな行動異常と同時にネガティブな行動異常を示す。このネガティブな行動異常を引き起こす原因として、縫線核から前頭前皮質に投射される 5-HT 神経系の機能低下が考えられた。また、*Rev-erb* が KO されると、神経新生や神経活動に影響し、これが原因となって 5-HT 神経系の機能低下が起きる可能性

も示唆された。したがって、*Rev-erb* の発現異常は、神経新生や神経活動の障害を引き起こし、これが 5-HT 神経系の機能不全につながることで、行動異常を引き起こしている可能性が示唆された。

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1件)

Nakao T, Kohsaka A, Otsuka T, Thein L Z, Le T H, Waki H, Gouraud S S, Ihara H, Nakanishi M, Sato F, Muragaki Y, Maeda M
Impact of heart-specific disruption of the circadian clock on systemic glucose metabolism in mice.
Chronobiology international (査読有) 35 (4):499-510, 2017

[学会発表](計18件)

T. Otsuka, A. Kohsaka, T. H. Le, T. Nakao, Z. L. Thein, M. Maeda
Effect of *Rev-erb* deficiency on the serotonergic system and mood regulation in mice
第95回日本生理学会大会、高松、2018、3月

T. Otsuka, A. Kohsaka, H. T. Le, T. Nakao, Z. L. Thein, M. Maeda
Alteration in mood and serotonergic pathways in *Rev-erb* deficient mice
Consortium of Biological Sciences 2017 (ConBio 2017)、神戸、2017、12月

大塚剛司、向阪 彰、辻本敬之、テン ソーレン、中尾友美、レ ティ フォエ、前田正信
ストレス下の摂食調節における時計遺伝子 *Rev-erba* の役割
第110回近畿生理学談話会、神戸、2017、11月

T. Otsuka, A. Kohsaka, H. T. Le, T. Nakao, Z. L. Thein, M. Maeda
The Nuclear Receptor REV-ERB Alters Mood and Neurotransmission in the Prefrontal Cortex.
Experimental Biology, Chicago, 2017, April

T. Otsuka, A. Kohsaka, H. T. Le, T. Nakao, Z. L. Thein, M. Maeda
Transcriptome analysis reveals dysregulation of the prefrontal neuronal networks of *Rev-erb* deficient mice.
第94回日本生理学会大会、浜松、2017、3月

大塚剛司、向阪 彰、レ ティ フォエ、中尾友美、テン ソーレン、前田正信

Transcriptome analysis reveals dysregulation of genes associated with neuronal development and mood regulation in the prefrontal cortex of *Rev-erb* deficient mice.

第 23 回日本時間生物学会、名古屋、2016、11 月

大塚剛司、向阪 彰、レ ティ フォエ、中尾友美、テン ソーレン、前田正信
トランスクリプトーム解析を用いた *Rev-erb* ノックアウトマウスの情動行動異常の原因探索

第 109 回近畿生理学談話会、大阪、2016、11 月

T. Otsuka, A. Kohsaka, H. T. Le, M. Maeda
Expression profile of mood-related genes in the prefrontal cortex of *Rev-erb* deficient mice.

17th Asian Australasian Animal Production, Fukuoka, 2016, August

T. Otsuka, A. Kohsaka, H. T. Le, M. Maeda
Rev-erb deficiency is associated with mixed affective behaviors in mice.

Society for Research on Biological Rhythms, Florida, 2016, May

他 9 報

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

和歌山県立医科大学・医学部・生理学第二講座
ホームページ :

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakuibu/160414/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 剛司 (Tsuyoshi Otsuka)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員
研究者番号 :

6 0 7 6 0 3 9 5