

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07086

研究課題名(和文) 軸索分枝形成の制御を介した、うつ・不安障害の調節メカニズム

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of depression and anxiety via the control of axonal branch formation

研究代表者

島田 忠之 (SHIMADA, Tadayuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：80379552

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)：Neuritinタンパク質によるセロトニン神経の軸索分枝形成能と、マウス個体のうつ・不安様行動との関連を解析した結果、NeuritinによるFGF受容体シグナルの活性化がセロトニン神経の軸索分枝形成を促進することを明らかにした。また、マウスに対するストレス負荷やFGFシグナル阻害剤の投与により扁桃体におけるセロトニン神経軸索の密度が低下し、マウスのうつ・不安様行動が誘発することを確認した。以上の結果から、ストレス負荷によりNeuritinの発現が低下し、それに伴い扁桃体におけるセロトニン神経の軸索密度が低下し、うつ・不安様行動が引き起こされると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗うつ・抗不安薬に関する研究から、セロトニンシグナルが重要な寄与を果たしていることは知られているが、具体的なメカニズムは不明である。本研究はセロトニン神経の軸索密度の変化がうつ・不安様行動を誘発することを示唆した。また、軸索密度を制御するメカニズムについても明らかにした。このことは、新たなうつ・不安治療のターゲットを提示するものであり、メカニズムの解明は治療薬の開発にもつながるものである。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the relationship between Neuritin-mediated axonal branch formation in serotonin neuron and high anxiety/depressive behavior in mouse. As the results, we found that Neuritin-mediated activation of FGF signal promoted the axonal branch formation in serotonin neurons.

In addition, chronic stress condition or administration of FGF signal inhibitor to mice decreased the axonal fiber density of serotonin neuron in baso-lateral amygdalae, inducing high anxiety/depressive behavior in the animals.

Based on these results we hypothesized that stress condition on mouse decreased the expression level of Neuritin, resulting in the less dense axonal fibers of serotonin neuron. This axonal changes cause high anxiety/depressive behavior in the animals.

研究分野：神経科学

キーワード：うつ・不安 セロトニン 軸索分枝形成 FGFシグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経細胞の形態が可塑性を有していることを示す例の一つとして、ストレス応答における細胞形態の変化がある。マウスでは、個体がストレスにさらされると、海馬、前頭葉において樹状突起の分枝が減少することが知られている。(Watanabe et al., Brain Res. 588:341-5 (1992); Cook et al., J. Neurobiol. 60:236-48 (2004); Vyas et al., J. Neurosci. 22:6810-8 (2002))。この変化はストレス応答の一つであり、うつ・不安様行動を引き起こすと考えられている。樹状突起と同様に軸索もストレスに応答して分枝の変化を起こすと考えられるが、軸索のストレス応答に対する変化と行動への影響に関する知見は乏しい。その中で、モノアミン系神経細胞の軸索形態の変化は注目に値する。モノアミン仮説によれば、脳内のモノアミン(ドーパミン・セロトニン・ノルアドレナリン)の異常がうつ病の発症、不安障害につながるとされているが、モノアミンのどのような変化が行動や情動の変化につながっているのかについては、様々な報告があり明確な答えはない。

(2) 研究代表者は神経活動依存的に発現が上昇するタンパク質の中から Neuritin を得た。Neuritin タンパク質は神経細胞軸索分枝形成を促進する活性を持つ。また、海馬歯状回顆粒細胞においては発作などにより神経活動が亢進すると、軸索に過剰分枝が形成される苔状繊維芽という現象が知られているが、neuritin ノックアウトマウスの顆粒細胞では神経活動依存的な軸索分枝形成は野生型よりも抑えられていた。このとき、ノックアウトマウスでは発作の悪化も緩やかであった。さらに、この Neuritin 依存的軸索分枝形成には Neuritin による FGF シグナルの活性化が必須であることを示した。(Shimada et al., J. Neurosci. 36:4534-48 (2016))。このように Neuritin は軸索分枝形成を誘導し、個体の行動に影響を与えている。

(3) 研究代表者が Neuritin の他の神経細胞への影響を解析したところ、neuritin ノックアウトマウスでは、扁桃体におけるセロトニン神経の軸索密度が野生型に比べて低下しているという予備的な結果を得た。また、ノックアウトマウスでは行動試験により、うつ・不安の程度が高くなっていった。これらの結果は Neuritin によるセロトニン神経の軸索形成調節がうつ・不安行動に関連することを示唆している。

2. 研究の目的

(1) 神経細胞の形態は外界からの刺激に応じて柔軟に変化する可塑性を有しているため、慢性ストレス刺激により、樹状突起だけでなく軸索もその分枝を減らす可能性がある。そこで、マウスを用い、慢性ストレス刺激によりセロトニン神経の軸索分枝が減少することを示す。

(2) Neuritin がセロトニン神経の軸索分枝形成を制御していること、その時に Neuritin 依存的な FGF シグナルの活性化が生じていることを示し、ストレス負荷によるセロトニン神経の軸索分枝減少は、Neuritin-FGF シグナルが不活性化することが原因であることを示す。また、Neuritin-FGF シグナルの不活性化がうつ・不安様行動を引き起こす要因であることを示す。

3. 研究の方法

(1) 培養セロトニン神経細胞を用いて、Neuritin 依存的な軸索分枝形成を解析する。また、免疫組織学的解析により扁桃体におけるセロトニン染色陽性繊維の密度を計測し、Neuritin 依存的なセロトニン神経の軸索密度の変化を解析する。これらの結果から、Neuritin がセロトニン神経の軸索分枝形成を促進することを示す。

(2) 培養セロトニン神経に FGF を作用させる、あるいは Neuritin を作用させた上で FGF 受容体阻害剤を添加することで、Neuritin によるセロトニン神経の軸索分枝形成に FGF シグナルが関与することを示す。さらには、FGF 受容体阻害剤を投与した個体に対する免疫組織学的解析を行い、FGF シグナルがセロトニン神経の軸索分枝形成に関与することを明らかにする。

(3) 免疫組織学的解析を用い、Neuritin の発現量がストレス応答により脳内でどのように変化するか、それに伴い扁桃体におけるセロトニン神経の軸索密度が変化するかを明らかにする。そのうえで、セロトニン軸索密度とマウスのうつ・不安様行動との相関を解析する。また、FGF シグナルを阻害したときにマウス個体にうつ・不安様行動が誘発できるのかを解析する。以上より、Neuritin シグナルと FGF シグナルが生体内においてもセロトニン神経の軸索密度の制御に関与しており、それが、個体のうつ・不安様行動を制御していることを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 野生型ラットより得た培養セロトニン神経に対し、培地中に精製 Neuritin を添加したところ、軸索分枝形成の促進が観察された。しかしながら、Neuritin を添加しても、軸索の伸長は引き起こされなかった(図1)。

また、neurtin ノックアウトマウスより得た培養セロトニン神経はコントロール神経と比較して、軸索分枝形成が抑制されていた。(図2)

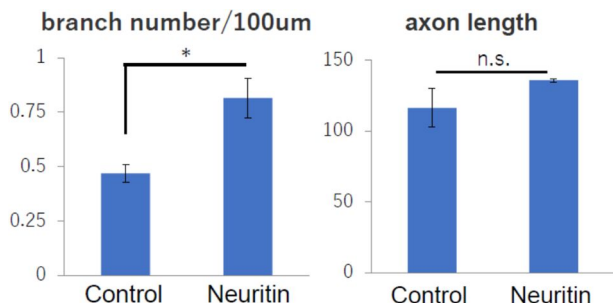


図1: 精製 Neurtin を添加することでセロトニン神経の軸索分枝形成が促進された。

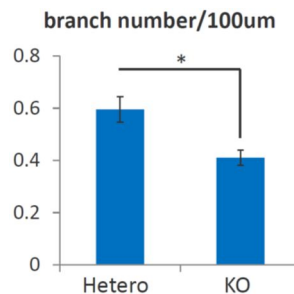


図2: neurtin ノックアウトマウスより得た神経では軸索分枝形成が抑制されていた。

(2) BALB/c マウスを用い、免疫組織学的染色を行い、扁桃体におけるセロトニン神経軸索を、抗セロトニン抗体に対する染色陽性繊維の密度として計測すると、Neurtin ノックアウトマウスでは野生型と比較して、セロトニン神経軸索の密度が有意に低下していた(図3)。このことは Neurtin ノックアウトマウスではセロトニン神経の軸索分枝形成能が低いことを示唆する。

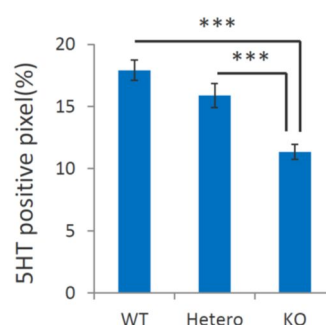


図3: neurtin ノックアウトマウスでは扁桃体におけるセロトニン神経の軸索密度が低下していた。

以上から、セロトニン神経の軸索分枝形成能は Neurtin の発現量に依存すると考えられた。すなわち、Neurtin の発現量が低下するような状況ではセロトニン神経の軸索形成能が低下し、軸索密度が下がると予想された。

(3) BALB/c マウスに対して慢性ストレス刺激を与えたのち、テイルサスペンションテスト、ノベルティサプレストフィーディングテストにより、動物のうつ・不安様行動を測定したところ、ストレス負荷群でうつ・不安様行動が誘発されていた(図4)。

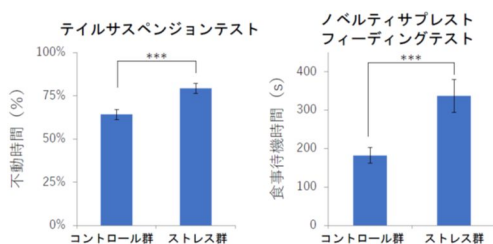


図4: ストレス負荷により、マウスにおいてうつ・不安行動が誘発された。

この時、扁桃体におけるセロトニン神経軸索の密度を計測したところ、ストレス負荷群ではコントロール群と比較して密度が低下していた(図5)。加えて、扁桃体における Neurtin の染色強度は低下していたが、染色のバックグラウンドが高く定量的な評価はできなかった。これらの結果は、個体が慢性ストレスを受けることで Neurtin の発現量が低下し、それに伴い扁桃体におけるセロトニン神経の軸索密度が低下することでうつ・不安様行動が誘発されるという仮説を支持する。

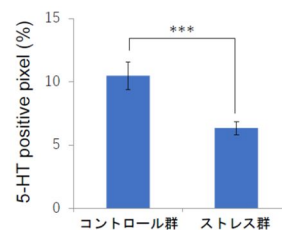


図5: ストレス負荷により、扁桃体におけるセロトニン神経の軸索密度が低下していた。

(4) セロトニン神経の軸索分枝形成能における Neurtin の作用に、FGF シグナルが関与する可能性について検討するため、培養セロトニン神経に対し培地に精製 Neurtin を加え、さらに FGF 受容体の活性阻害剤を添加した。その結果、FGF 受容体阻害剤を培地に添加した神経細胞では軸索分枝形成が抑制されていた。また、精製 Neurtin を加えないコントロールにおいても FGF 受容体阻害により軸索分枝形成は抑制された(図6)。

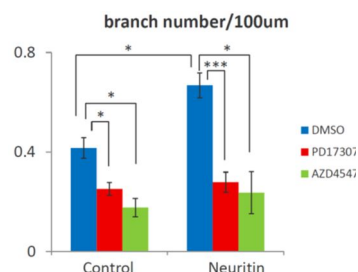


図6: FGF 受容体阻害剤添加により、Neurtin 依存的な軸索分枝形成が抑制された。

このことは、通常のセロトニン神経でも一定の Neuritin 発現と FGF シグナルの活性化があり、軸索分枝形成に寄与していることを示唆している。また FGF シグナルを阻害することで Neuritin ノックアウトと同様にセロトニン神経の軸索分枝形成能を低下させると考えられた。

(5) FGF による軸索分枝形成と Neuritin との関連を解析するため、野生型ラットより得た培養セロトニン神経に各種 FGF を添加した。その結果、FGF2 のみがセロトニン神経の軸索に分枝形成を誘導する能力を持つことが明らかとなった (図 7)。

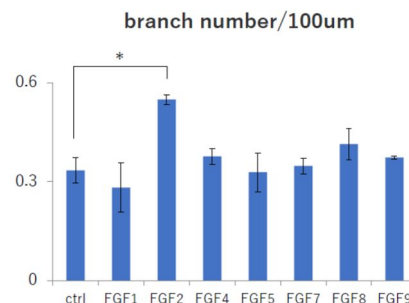


図 7 : FGF2 を添加することで培養セロトニン神経の軸索分枝形成が促進された。

(6) Neuritin による FGF シグナルの制御と個体におけるうつ・不安様行動の誘導との関連を明らかにするため、マウスに FGF 受容体の活性阻害剤を慢性投与した。投与期間終了後、テイルサスペンションテスト、ノベルティサプレストフィーディングテストにより、動物のうつ・不安様行動を測定したところ、阻害剤投与群ではうつ・不安様行動が誘発されていた (図 8)。

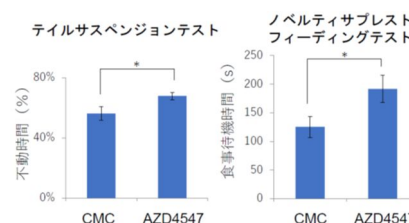


図 8 : FGF 阻害剤を投与することで、マウスにうつ・不安様行動が誘発した。

この時、扁桃体におけるセロトニン神経軸索の密度を計測したところ、阻害剤投与群ではコントロール群と比較して密度が低下していた (図 9)。

これらの結果は FGF シグナルを抑制することでセロトニン神経の軸索分枝形成が抑えられることと、それにより個体にうつ・不安様行動が引き起こされることを示している。

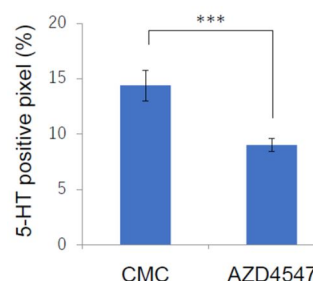


図 9 : FGF 阻害剤を投与することで扁桃体におけるセロトニン神経軸索の密度が低下した

以上の結果から、マウス個体が慢性ストレスを受けると、Neuritin の発現が低下し、それに伴い FGF シグナルが不活性化することで扁桃体におけるセロトニン神経の軸索分枝の密度が低下することが示唆される。これらの現象がマウス個体のうつ・不安様行動の誘導につながると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tadayuki Shimada, Shin Yasuda, Hiroko Sugiura, and Kanato Yamagata.	4. 巻 20(17)
2. 論文標題 Syntenin: PDZ Protein Regulating Signaling Pathways and Cellular Functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 4171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20174171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Baba K, Yoshida W, Toriyama M, Shimada T, Manning CF, Saito M, Kohno K, Trimmer JS, Watanabe R, Inagaki N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Gradient-reading and mechano-effector machinery for netrin-1-induced axon guidance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e34593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.34593.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimada T, Yamagata K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/56573.	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 Azuchi Y, Namekata K, Shimada T, Guo X, Kimura A, Harada C, Saito A, Yamagata K, Harada T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Role of neuritin in retinal ganglion cell death in adult mice following optic nerve injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-28425-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山形 要人、杉浦 弘子、島田 忠之	4. 巻 50
2. 論文標題 自閉症におけるシナプス異常の新知見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura, and Kanato Yamagata
2. 発表標題 Astrocyte-mediated social memory deficiency in tubular sclerosis complex model mouse
3. 学会等名 FENS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura, and Kanato Yamagata
2. 発表標題 Astrocyte-mediated impaired social memory in tubular sclerosis complex model mouse
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura, and Kanato Yamagata
2. 発表標題 Inhibition of Rheb improved abnormal social behavior in astrocyte-specific Tsc1 knockout mice.
3. 学会等名 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura, and Kanato Yamagata
2. 発表標題 Memory impairment in astrocyte-specific Tsc1 knockout mice was recovered by Rheb inhibition
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura, and Kanato Yamagata
2. 発表標題 アストロサイト特異的Tsc1ノックアウトマウスにおける記憶障害のメカニズム
3. 学会等名 第61回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuriko Azuchi, Kazuhiko Namekata, Tadayuki Shimada, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Atsuko Nishigaki, Kanato Yamagata, Takayuki Harada
2. 発表標題 Loss of neuritin accelerates RGC loss and retinal degeneration in adult mice following optic nerve injury
3. 学会等名 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥田忠之 杉浦弘子 山形要人
2. 発表標題 アストロサイト特異的Tsc1欠損マウスにおける神経膠症と行動異常
3. 学会等名 第58回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura, and Kanato Yamagata
2. 発表標題 Astrocyte-specific Tsc1 knockout mice show abnormal behavior and harbor severe gliosis
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----

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