

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07137

研究課題名(和文)性ホルモン依存性精神疾患を規定するエピゲノムコードの解明

研究課題名(英文)Sex steroid hormones function in sex-related psychiatric disease

研究代表者

松本 高広 (MATSUMOTO, Takahiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：70447374

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)：近年では代表的な加齢男性性線機能低下症候群として、うつ病が広く認知されつつあり、その発症に加齢に伴う血中アンドロゲン濃度の低下が関与することが示されている。主要アンドロゲンであるテストステロンの作用は3種類の性ステロイド受容体群を介した、複雑多岐にわたる標的遺伝子の発現調節により発揮される。本研究では、アンドロゲン依存性気分障害モデルマウスの解析を通じ、アンドロゲンの抗うつ作用に寄与するヒストンH3K4のジメチル及びトリメチル化修飾の重要性と、DEAF1を介した階層的なセロトニン1A受容体の転写制御カスケードが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、アンドロゲンの抗うつ作用は、アンドロゲン依存的なヒストンH3K4のジメチル及びトリメチル化修飾を介したDEAF1によるセロトニン1A受容体の転写調節の一旦を担うことが明らかとなった。今回の研究により、性ホルモンとヒストン修飾の機能相関が示唆されたことは、今後の精神疾患研究においても意義は大きいものと考えられる。今後は、アンドロゲン依存性気分障害モデルマウスを用い、抗うつ薬剤の開発を行う際、本研究により同定された標的遺伝子やヒストン修飾を指標としたスクリーニングが有効となるか、さらなる検証を進めていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that AR, ERα and ERβ knockout (TKO) males display increased anxiety-related behavior, owing to the decreased levels of postsynaptic 5-HT1A receptor in the cortex and hippocampus. However, the molecular basis for the transcriptional and epigenomic regulation of the 5-HT1A receptor gene remains unclear. We reported here that DEAF1 binds to a specific sequence in proximal region of the 5-HT1A receptor gene promoter, and transactivates 5-HT1A receptor expression. This transcriptional regulation required methylated histone H3 K4 prior to DEAF1 association with chromatin. Furthermore, AR/ERα and ERβ binding regions of DEAF1 gene was mapped to the minimal promoter sites and 5'-untranslated region (5'-UTR). Finally, we generated Deaf1 knockout mice via a CRISPR/Cas9 system and revealed that disruption of Deaf1 in mice results in neural tube defects and is neonatal lethal.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：男性ホルモン 精神疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気分や不安を伴う疾患の発症には遺伝的要因やストレスなどの心理的、社会的要因に加えて、内分泌的要因が関与していると考えられる。女性では閉経に伴うエストロゲンの急激な低下により、抑うつ、不安やうつ病のリスクが増加する。一方、近年では代表的な加齢男性性腺機能低下症候群(Late-onset hypogonadism: LOH 症候群)としても、うつ病が広く認知されつつあり、加齢に伴う血中アンドロゲン濃度の低下と共に、抑うつ、不安、いらつきを生じることが知られている。また、前立腺癌治療時の抗アンドロゲン療法副作用としてもうつ病が問題となる。女性のうつ病の罹患率は男性の約2倍高いとされるが、うつ病が深く関与する自殺については、その数は圧倒的に男性がまさっている。このように気分、不安障害の発症・進行には明確な性差が存在し、その要因として性ホルモンの内分泌学的関与が挙げられる。これら性ホルモン依存性気分障害発症機序の分子メカニズムを完全に把握し、根本治療となる分子や細胞内情報伝達を理解することが治療に大きく貢献できる。しかしながら、性ステロイドホルモンが抗うつ作用を有していることは明らかであるものの、その作用機序は不明な点が多い。性ステロイドホルモンの多彩な生理作用は、種々の核内ステロイド受容体群を介した、複雑多岐にわたる情報伝達機構により発揮されるが、特に抗うつ作用における標的遺伝子群とその時間・空間かつ階層的な発現調節機構は殆ど知られていない。したがって、性ステロイドホルモンに依存した気分障害関連分子の同定や細胞内情報伝達の解明、またモデル動物の確立と表現型解析が治療に大きく貢献できるものと考えられる。

2. 研究の目的

加齢男性性腺機能低下症候群で生じるうつ病、不安の発症・進行には、主要なアンドロゲンであるテストステロンの血中濃度の低下が強く関与している。精巣で分泌されたテストステロンは血中を介して標的細胞に達すると、アンドロゲン受容体(AR)と結合し作用するが、その際に活性型アンドロゲンである5 α -ジヒドロテストステロンに転換される場合とテストステロンが直接、ARと結合する場合がある。一方で、テストステロンは細胞内で芳香化酵素であるアロマターゼによりエストロゲンに転換され作用することも知られており、この場合は2種類のエストロゲン受容体(ER α 、ER β)を介して作用することになる。このように、アンドロゲン作用は3種類の性ステロイド受容体群を介した、複雑多岐にわたる標的遺伝子の発現調節により発揮される。したがって、これまで作出された従来の、性ホルモン受容体やエストロゲン合成酵素のシングル欠損マウスではお互いの機能補償により、明確な気分障害様の異常が検出されなかった。こうした現状を踏まえ、アンドロゲン作用を完全に遮断するため、Cre-loxPシステムを用い不妊を回避することで樹立されたAR、ER α 、ER β の3重欠損(TKO)雄マウスは、重度の不安様障害を示すこと、大脳皮質、大脳辺縁系におけるセロトニン1A受容体の発現が著しく低下していることが明らかとなった。そこで、この性ホルモン依存性気分障害モデルを用い、性ホルモンの抗うつ作用における真のレセプターシステムの機能を提唱できると考えた。

アンドロゲンの気分障害保護作用は、種々の核内ステロイド受容体群を介した、階層的な標的遺伝子発現制御により発揮されると考えられる。この標的遺伝子の転写制御の段階では、遺伝情報の取捨選択を可能にするエピゲノム修飾制御を介し、性ホルモン依存性のエピゲノムコードが個々の神経細胞の染色体に記憶されると予想される。本研究では性ホルモン依存性気分障害をこうしたエピゲノム修飾破綻として捉え、アンドロゲン依存性気分障害モデルマウスにおける、染色体構造調節を司るエピゲノム修飾制御の解析を通じ、抗うつ作用に寄与する性ホルモン応答性エピゲノムを明らかとする。

3. 研究の方法

アンドロゲン受容体(AR)、エストロゲン受容体(ER α 、ER β)の3重欠損ヘテロ雄マウスと、3重欠損ヘテロにCMV-Creをもつ雌マウスの交配により、3重欠損、2重欠損、及びそれぞれのシングル欠損ホモ(KO)マウスの作出を行った。TKO雄マウスを用いて、神経組織学的な解析を行い、うつ病病態に関連する神経領域の特定をめざした。TKOマウスの脳サンプルを用い

たマイクロアレイ解析を行い、AR、ER α 、ER β により協調的に転写制御をうける下流の標的遺伝子群の網羅的な探索を行った。さらに、神経培養細胞を用いて、ルシフェラーズレポーターアッセイ、免疫沈降法、クロマチン免疫沈降解析を行うことで、DEAF1 による転写調節における各種ヒストン修飾の機能関連を解析した。また、CRISPR/Cas9 法を用い、受精卵へのガイド RNA および Cas9 タンパク質の導入による DEAF1 欠損マウス系統の作出を試みた。

4. 研究成果

重度の気分様障害を示す TKO 雄マウスにおけるセロトニン 1A 受容体の発現低下の背景を探るため、これまでトランスクリプトーム解析により同定された DEAF1 との分子機能関連を検討した。DEAF1 分子は N 末端側に SAND ドメイン、C 末端側に MYND モチーフを有することから転写因子として機能している可能性を想定した。まずは神経細胞株で DEAF1 のノックダウン実験を行った結果、セロトニン 1A 受容体 mRNA 発現が有意に低下することが判った。また、セロトニン 1A 受容体のプロモーター領域における DEAF1 の結合様式を調べるため、DEAF1 結合候補配列に変異を導入したコンストラクトを用いたレポーターアッセイを実施し、DEAF1 はセロトニン 1A 受容体の転写活性促進能を有すること、DEAF1 応答領域がセロトニン 1A 受容体のプロモーターの約 2kb 上流領域に存在することが明らかとなった。この DEAF1 応答配列における実際の DEAF1 のリクルートを ChIP アッセイ法により確認することができた。さらに、DEAF1 がセロトニン 1A 受容体の転写活性を發揮する際には、ヒストン H3K4 のジメチル及びトリメチル化修飾が入ることが重要であることが明らかとなった。また、経時的なクロマチン免疫沈降法により、DEAF1 遺伝子のプロモーター領域に AR 及び ER α がそれぞれリガンド依存的にリクルートされること、一方、ER β は、3'UTR 近傍のイントロン領域にリガンド依存的に結合することが観察された。この結果より、性ホルモン受容体群はそれぞれ転写開始と終結を協調的に制御している可能性が示唆された。また、DEAF1 の神経機能における役割を明らかにするため、ゲノム編集法により Deaf1 遺伝子欠損マウスを作出した。その結果、Deaf1 欠損マウスは出生後に致死に至ること、この要因として神経管の形成異常が起因していることが明らかとなった。一方、生後の Deaf1 の神経機能に対する機能は依然として不明であるため、今後は条件付き欠損マウスの作出のための flox マウスを樹立し、気分様障害における Deaf1 の役割を明確にしていきたいと考える。

次に TKO 雄マウスにおける気分様障害発症のさらなる分子基盤を探るため、脳サンプルを用いたトランスクリプトーム解析を再度試行した。その結果、TKO マウスで発現低下を示す上位の遺伝子群に Y 染色体遺伝子群である Dby、Eif2s3y、Uty、Smcy が確認された。実際に Real time PCR の解析で定量すると Y 染色体遺伝子群の発現が著しく低下していることが明らかとなった。また、Y 染色体遺伝子群のカウンターパートナーである X 染色体遺伝子群 (Dbx、Eif2s3x、Utx、Smcx) の発現低下も確認された。一方、X 染色体不活性化に必要な non-coding 遺伝子である Xist の発現が 4 領域すべてで 100 倍以上上昇しており、Xist 遺伝子座から発現するアンチセンス RNA である Tsix の発現低下も観察された。さらに、TagMan アレイを用いて miRNA 発現解析を実施したところ、22 種の miRNA が TKO マウスで特異的に変動することが明らかとなった。今回、変動が確認された 22 種の miRNA の内、TKO マウスにて約 100 倍の発現低下を示した miR-23a の標的として Xist が候補となることが確認された。本研究により明らかとなった Xist 非コード RNA 制御においては、性ホルモン受容体による直接的な転写制御下にあるかは不明であり、Xist 発現に重要な役割を果たすことが知られている Tsix を含む転写調節機能における、アンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体の寄与を検討して必要がある。また、Xist の作用機序の詳細については未解明な部分もあるが、ヘテロクロマチンの確立や維持に関わる種々のヒストン修飾因子群やポリコーム群との機能的相関を広く調べる必要がある。一方、これまで Xist は雌個体 (XX) における X 染色体不活性化を司ることが知られてきたが、雄個体 (XY) で Xist が誘導されるという事例は報告されていない。成体 TKO マウスの脳において RNA FISH 解析を試行することで、実際に Xist が Y 染色体および X 染色体に集積しているか明らかとしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 盛真友、松本高広
2. 発表標題 X染色体RBMXによるエストロゲン受容体転写抑制化機構の解析
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 池田 彩子、井上 裕康、沖嶋 直子、香川 靖雄、金子 一郎、亀井 康富、木戸 慎介、桑波田 雅士、竹中 優、立花 宏文、中田 理恵子、服部 正平、松本 高広、三坂 巧、宮本 賢一、山下 美、山田 一哉、山本 浩範	4. 発行年 2018年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 14
3. 書名 分子栄養学	

〔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
研究分担者	岡村 永一 (OKAMURA Eiichi) (30755913)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・助教 (14202)	