

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17815

研究課題名（和文）非ヒト霊長類うつ病モデルの脳細胞種特異的エピゲノム解析

研究課題名（英文）Cell type-specific epigenomic analysis of brain in a non-human primate model of depression

研究代表者

林 義剛（Hayashi, Yoshitaka）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10631567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、大うつ病患者死後脳の解析において、脳の前頭前野に特異的にオリゴデンドロサイト系譜細胞の減少が生じていることを見出した。また、この異常が生じる原因としてエピゲノム変化によるものであるという仮説をたて、本研究を行った。まず、野生型カニクイザル脳を用いてオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖数を、脳部位別に計測したところ、前頭前野や帯状回といった精神疾患との関連が示唆されている部位で多いことを見出した。カニクイザルにインターフェロンを慢性投与したうつ病モデルの脳の解析を行ったところ、オリゴデンドロサイト系譜細胞に特異的にSox10のDNAメチル化変化を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2011年に厚生労働省が特に対策を進める5大疾患に精神疾患を加えたように、精神疾患の病態解明が期待されている。これまで、神経細胞を標的とした研究が多く行われてきており、一定の成果を上げているが、未だ病因の解明には至っていない。本研究では、オリゴデンドロサイト系譜細胞を標的とし、非ヒト霊長類を用いた研究により、病態解明を目指した。脳部位によってオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖数が異なることや、DNAメチル化変化を見出し、今後の病態解明に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：In the postmortem study of brains from patients with major depression, we found the reduction of oligodendrocyte lineage cells specifically in the prefrontal cortex of the patient brains. We hypothesized that this abnormality is caused by epigenetic changes and conducted the current study. The number of proliferating oligodendrocyte lineage cells was measured in wild-type crab-eating macaque brains and found higher numbers in the prefrontal cortex and cingulate gyrus which have been suggested to be associated with psychiatric disorders. We analyzed the brains from depression models of crab-eating macaques established by chronically treated with interferon-alpha, and found DNA methylation abnormality in the Sox10 promoter in oligodendrocyte lineage cells.

研究分野：脳神経科学

キーワード：大うつ病 オリゴデンドロサイト エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

大うつ病は、抑うつ気分、興味・喜びの減退、焦燥感、不眠・過眠などを症状とする精神疾患の一つである。近年、社会ストレスの増加によって大うつ病が増加しており、通常の社会生活をおくることが困難になるとともに、ついには自殺企図に至ることが、問題視されており、その病態解明が急がれている。大うつ病患者の脳画像研究において、複数の脳部位で萎縮や脳血流・代謝の異常が報告されている。脳画像研究で異常が見られた脳部位において、患者死後脳の脳組織の解析が多く行われ、前頭前野や前部帯状回では神経細胞体サイズの縮小やグリア細胞密度の減少が報告されている。また、前頭前野の遺伝子発現解析では、オリゴデンドロサイト・ミエリン関連遺伝子の発現異常が多く報告されている。研究代表者は、フローサイトメーターを用いた迅速かつ簡便な脳細胞数定量法を確立し、大うつ病を含む気分障害の患者死後脳を解析し、前頭極灰白質においてオリゴデンドロサイト系譜細胞の減少を認めた(Hayashi et al., *Mol Psychiatry* 2011; Hayashi et al., *PLoS ONE* 2012)。オリゴデンドロサイトの多くは生後に発生・成熟することから、大うつ病では、環境要因などによる、オリゴデンドロサイト系譜細胞の異常が生じている可能性を示唆している。また近年、環境要因によって変動するものとして、DNAメチル化などのエピゲノム変化が強く関係すると考えられてきており、大うつ病の脳内におけるエピゲノム変化を調査することで、その病態解明に繋がると考えられる。一方、C型肝炎などの治療薬として用いられているインターフェロン α は、投与した患者の約20-50%がうつ症状を呈することが報告されている。また、前頭葉機能の関与が示唆される大うつ病の病態解明において、前頭葉の発達が弱いマウスを用いる研究では限界があるため、脳構造や機能がヒトに近い霊長類での解析が必要であると考えられる。本研究では、カニクイザルにインターフェロン α を慢性投与し、うつ病モデルサルの作製を行い、その評価、死後脳の解析を通じて、大うつ病の病態解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト死後脳研究とマウスを用いた研究とのギャップを埋めるものとしてカニクイザルを用い、大うつ病モデル動物の脳内で生じる異常を解明することにより、大うつ病の病態解明や新規治療ターゲット、バイオマーカーの同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1) カニクイザル：年齢は性成熟後の7歳以上13歳未満、体重5-10kg、滋賀医科大学動物生命科学研究センターで飼育している600頭以上のカニクイザルから健康状態、行動が良好な個体を選択する。個体数は、インターフェロン α 投与群、生理食塩水投与群を各3頭ずつ用意する。

2) インターフェロン α の投与：ヒト型PEG-インターフェロン α を、週1回(3 μ g/kg皮下注射)x12週間投与する。コントロール群は生理食塩水を投与する。

3) 行動解析：滋賀医科大学・動物生命科学研究センター内のサル飼育施設では、行動解析のためのビデオカメラが設置しており、投薬後のカニクイザルの行動を撮影することが可能である。行動解析には、食餌量、行動量、グルーミングの回数・時間、睡眠時間などの変化を計測する。

4) カニクイザル脳の解析：薬剤投与終了後、カニクイザルを安楽死させ、脳を採取する。さらに、解剖学的に脳を背外側前頭前野、眼窩前頭前野、前頭極、前部帯状回、海馬・扁桃体を含む側頭葉に部位分けする。同時に、脳室周囲から神経幹細胞を分離培養し、増殖能や分化能の変化を解析する。各脳部位は、マウスを用いた解析同様①フローサイトメーターによる脳細胞構成変化の解析およびDNA採取、②脳凍結切片を細胞周期マーカーであるKi-67とオリゴデンドロサイト系譜細胞マーカーであるOlig2で免疫染色を行い、新生細胞数を計量する。

5) 脳からの細胞種特異的DNAの採取：インターフェロン α または生理食塩水を投与した個体の前頭前野から神経細胞やオリゴデンドロサイト前駆細胞、成熟オリゴデンドロサイト、アストロサイト/マイクログリアを含む集団などの細胞をフローサイトメーターを用いて特異的に分取してくる。神経細胞の標識にはNeuN、オリゴデンドロサイト系譜細胞の標識にはOlig2を使用する。分取した細胞はその後、DNAを抽出し、凍結保存する。

6) 細胞種特異的なDNAメチル化解析：フローサイトメーターによって分取した神経細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞や成熟オリゴデンドロサイトから抽出したDNAは、バイサルファイト-シーケンス法によるプロモーター領域のメチル化解析を行う。バイサルファイト処理は、DNA上に存在するシトシン(C)のうち、メチル化していないCをチミン(T)に変換し、メチル化している場合はCのまま維持される。この処理を行うことでDNA上のメチル化を受けるCpGサイトのメチル化状態を把握することができる。バイサルファイト処理を終えたDNAを鋳型として、大うつ病の原因となり得る遺伝子のプロモーター領域メチル化状態をDNAシーケンサーで確認する。

4. 研究成果

1) カニクイザル成体脳におけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の新生

オリゴデンドロサイト系譜細胞は、成体脳でも分裂・増殖することが知られている。10歳の成体カニクイザル脳組織を用いて、細胞周期マーカーであるKi-67とオリゴデンドロサイト系譜細胞であるOlig2の免疫染色を行い、オリゴデンドロサイト系譜細胞において成体でも増殖が起きているか検討した。その結果、神経幹細胞が不在の大脳皮質灰白質において、Ki-67陽性細胞が見られ、その多くがOlig2陽性であることを見出した(図1)。

また、Ki-67は増殖細胞のマーカーであるが、増殖した細胞がその後生存しているか確認するため、カニクイザルに対し核酸アナログであるBrdUを50mg/kgの濃度で5日間投与し、1ヶ月後に脳を採取し、BrdUとOlig2の染色を行った。その結果、BrdUとOlig2に共陽性の細胞が存在することを認めた。つまりこれは、増殖したオリゴデンドロサイト系譜細胞は、1ヶ月後も生存・生着していることを示唆する。大うつ病患者死後脳において、脳部位特異的なオリゴデンドロサイト系譜細胞数の異常が見られたことから、この異常が生じる原因がオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖に、脳部位特異性があると考え、1個体のカニクイザル脳のオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖数を、脳部位別に数えたところ、後頭葉や下部側頭葉に比べ、前頭前野や前部帯状回において、増殖オリゴデンドロサイト系譜細胞の数が多く見出した。

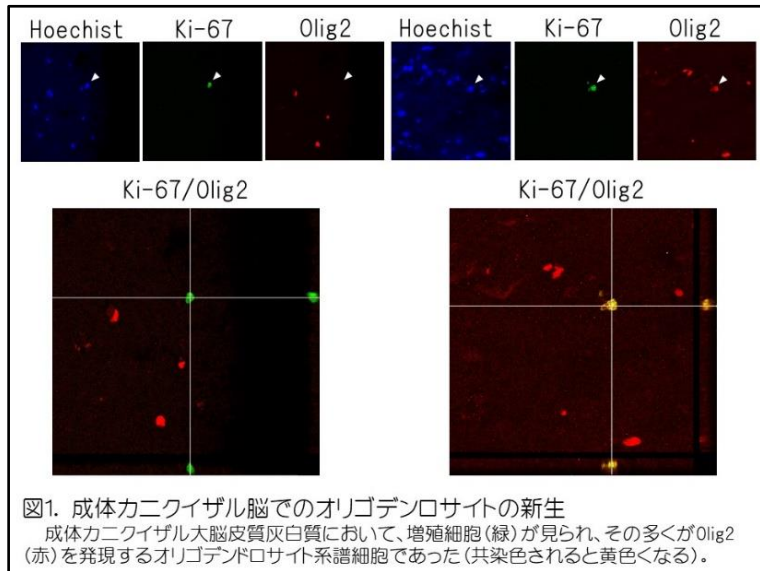


図1. 成体カニクイザル脳でのオリゴデンドロサイトの新生
成体カニクイザル大脳皮質灰白質において、増殖細胞(緑)が見られ、その多くがOlig2(赤)を発現するオリゴデンドロサイト系譜細胞であった(共染色されると黄色くなる)。

2) インターフェロン慢性投与によるうつ病モデルカニクイザルの行動解析

カニクイザルにインターフェロン α を投与している際、ビデオ撮影を行い、投与によって行動に変化が出るか検討した。その結果、インターフェロン α 投与によって、食餌にかかる時間が延長した個体があらわれた。また、グルーミングを行う時間が延長する傾向にあるといった変化も見られた(図2)。カニクイザルの行動については、まだ未解明なものもあり、これらの行動変化が大うつ病の病態を反映するかは、不明であるが、インターフェロン α の慢性投与によって生じた変化であることから、何らかの関係性があると考えている。

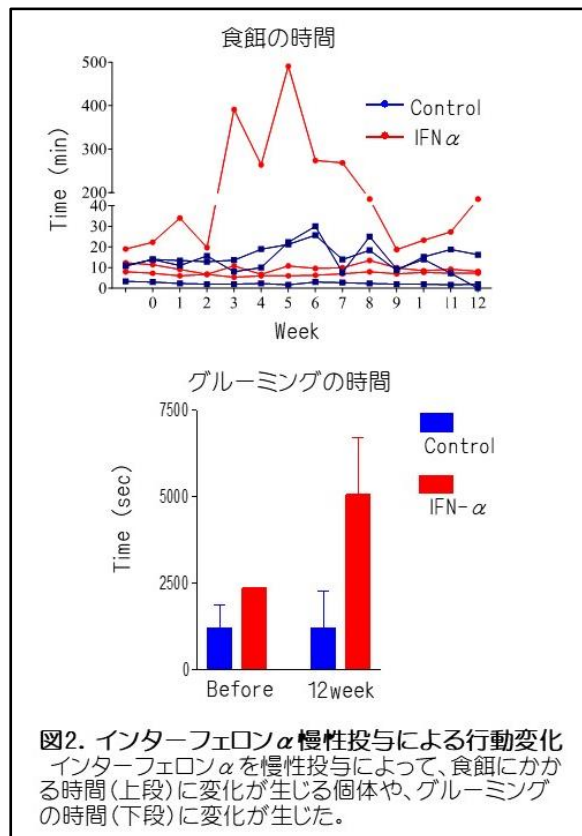


図2. インターフェロン α 慢性投与による行動変化
インターフェロン α を慢性投与によって、食餌にかかる時間(上段)に変化が生じる個体や、グルーミングの時間(下段)に変化が生じた。

3) インターフェロン α 慢性投与カニクイザルの死後脳解析

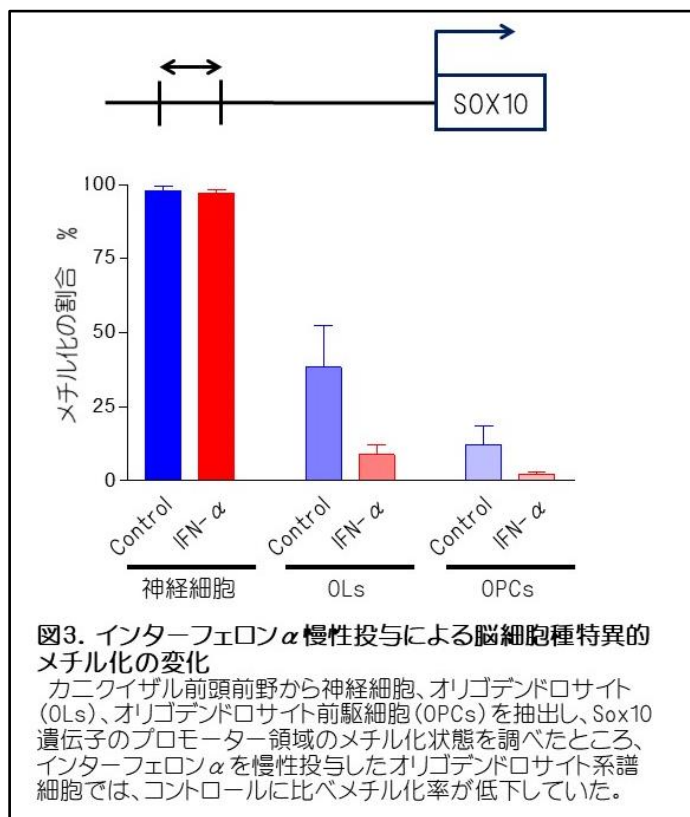
3-1 脳細胞数の定量

インターフェロン慢性投与したカニクイザル脳で生じている異常を明らかにするため、死後脳解析を行った。凍結した前頭葉灰白質から細胞核のみ無傷な状態で抽出し、神経細胞のマーカーであるNeuN、オリゴデンドロサイト系譜細胞のマーカーであるOlig2で染色を行い、フローサイトメーターを用いて細胞数を測定した。その結果、神経細胞には細胞数の異常はなかったものの、オリゴデンドロサイト系譜細胞において、コントロールに比べ

減少傾向にあることを見出した。これは、マーカーとして使用してしている Olig2 の発現が減少した細胞が増えたのか、オリゴデンドロサイト系譜細胞の細胞数が減少したのかは不明だが、研究代表者が大うつ病患者死後脳で見出した異常と類似した所見がみられた。

3-2 Sox10 プロモーターのメチル化解析

大うつ病を含む精神疾患は、DNA メチル化の異常が、その病態と関連することが示唆されている。オリゴデンドロサイト系譜細胞に関連する Sox10 遺伝子のメチル化異常は、精神疾患の患者死後脳でメチル化異常が生じていると報告がある。そこで、本研究で用いたインターフェロン α 慢性投与の死後脳の前頭極灰白質から、神経細胞、オリゴデンドロサイト (OLs)、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) の DNA を抽出し、サンガーバイサルファイトシーケンス法により、Sox10 プロモーターのメチル化を調べた。Sox10 プロモーターは、神経細胞では、高メチル化状態であり、OLs、OPCs では、神経細胞に比べ低メチル化状態であった (図 3)。Sox10 プロモーターのメチル化は神経細胞では、インターフェロン α 慢性投与群、コントロール群に変化はなく、OLs、OPCs において、コントロール群と比べ、インターフェロン慢性投与群で、低メチル化状態であることを見出した。これは、精神疾患で関連が示唆されているメチル化異常は、細胞種特異的に生じていることを示しており、これまで行われてきた脳組織全体から抽出した DNA を用いる方法ではなく、各種脳細胞から DNA を抽出し、解析したほうが、より病態に迫れることを示唆する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Aoi, Ishida Shohei, Fuchigami Takahiro, Hayashi Yoshitaka, Kuroda Anri, Ikenaka Kazuhiro, Fukazawa Yugo, Hitoshi Seiji	4. 巻 30
2. 論文標題 Life-Long Neural Stem Cells Are Fate-Specified at an Early Developmental Stage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 6415 ~ 6425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhaa200	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 Hayashi Yoshitaka, Jinnou Hideo, Sawamoto Kazunobu, Hitoshi Seiji	4. 巻 147
2. 論文標題 Adult neurogenesis and its role in brain injury and psychiatric diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 584 ~ 594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14557	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 林 義剛、等 誠司	4. 巻 68
2. 論文標題 特集 大脳皮質-成り立ちから機能へ グリア細胞の分化・発生の時期と関連因子	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 24 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425200568	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi, Satoshi Fuke, Yasuhiro Go, Asmaa Abdullah, Takahiro Fuchigami, Naoko Morimura, Natsu Koyama, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 Glial cells missing 1 promote cell differentiation and angiogenesis by growth factor expression.
3. 学会等名 2019 ASN-1SN (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi, Satoshi Fuke, Yasuhiro Go, Kazuhiko Nakabayashi, Takahiro Fuchigami, Naoko Morimura, Natsu Koyama, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 Glial cells missing 1 は成長因子分泌を促進し、細胞の分化・増殖 および血管新生を誘導する
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi
2. 発表標題 Gcm1 regulates glial cell differentiation and angiogenesis in the mammalian brain
3. 学会等名 グリア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi
2. 発表標題 Glial cells missing 1 promote cell differentiation, proliferation and angiogenesis in the mammalian brain
3. 学会等名 15th Meeting of Asian-Pacific Society for Neurochemistry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi, Satoshi Fuke, Takahiro Fuchigami, Naoko Morimura, Natsu Koyama, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 Glial cells missing 1 promote cell differentiation and angiogenesis in the mammalian brain
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi, Yasuhiro Go, Natsu Koyama, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 The oligodendroglial abnormalities in the postmortem brain from human patients and monkey depression model
3. 学会等名 Towards Understanding " INDIVIDUALITY " (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林義剛, 福家聡, 郷康広, 中林一彦, アスマピンティアブドゥラー, 淵上孝裕, 守村直子, 小山なつ, 等誠司
2. 発表標題 Glial cells missing 1は損傷脳において 細胞分化・増殖と血管新生を促進する
3. 学会等名 第15回成体脳ニューロン新生懇談会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi, Satoshi Fuke, Kazuhiko Nakabayashi, Takahiro Fuchigami, Naoko Morimura, Yoshitaka Tatebayashi, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 The oligodendroglial abnormalities in the postmortem brain from human patients and monkey depression model.
3. 学会等名 ISN-ESN 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi, Satoshi Fuke, Takahiro Fuchigami, Naoko Morimura, Natsu Koyama, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 Functional analysis of Glial cell missing 1 in the mammalian brain.
3. 学会等名 第60回日本神経化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 義剛, 福家 聡, 郷 康広, 中林 一彦, Abdullah Asmaa, Mohd Zakiyyah, 守村 直子, Daun Kenny, 小山 なつ, 等 誠司.
2. 発表標題 Glial cells missing 1は損傷脳においてグリア細胞分化と血管新生を促進する.
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会. 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀医科大学 生理学講座 統合臓器生理学部門 ホームページ http://www.shiga-med.ac.jp/~hqphys1/
--

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