

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19459

研究課題名(和文)うつ病の中核症状「アンヘドニア」におけるカレハ島仮説の検証

研究課題名(英文)Role of islands of Calleja in anhedonia

研究代表者

相澤 秀紀(Aizawa, Hidenori)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：80391837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の概要は以下のようにまとめられる。1. マウス腹側線条体の組織学的解析によりカレハ島にはGad67を発現するGABA作動性NeuN陽性神経細胞が存在することが明らかとなった。2. アンヘドニア様行動異常の定量的解析法として脳内自己刺激の閾値を自動解析する実験系を開発した。実際抗うつ薬Nomifensineの投与により嗜癢行動に対する閾値が有意に低下することを確認した。3. カレハ島細胞特異的にリボソームタンパク質-GFP融合蛋白質を発現させたマウスを作成し、免疫沈降法とRNA-seqを組み合わせ、カレハ島特異的な遺伝子発現セットを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「楽しい」と感じなくなる無快楽症(アンヘドニア)は、うつ病の診断基準に含まれるうつ病のコア症状である。また、日常生活での喜びや興味、生きがいに快楽情動は不可欠であり、その喪失はうつ病患者のQOLを著しく損ねる。この問題に取り組む上で、分子的解析を可能にする動物実験が不可欠であるが、アンヘドニアの病態モデルや定量的解析は研究伸張が不十分である。本研究は、アンヘドニアの基盤として腹側線条体の機能異常に注目し、その解剖学知見を明らかにするとともに、新たなアンヘドニア検証系を開発する点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：Abstract of the current study is summarized as follows. 1. Histological analysis revealed that mouse ventral striatum included the islands of Calleja expressing Gad67 mRNA, NeuN-positive GABAergic neurons. 2. A novel behavioral system for quantitative measurement of anhedonia-like behaviors was developed for mice. Specifically, sequential sweep of the descending stimulation frequencies for the intracranial self-stimulation upon nose poking of the port in the operant chamber enabled the quantification of the behavioral measure useful for anhedonia-like behaviors. Indeed, antidepressant nomifensine decreased significantly threshold for the hedonic behavior revealed by the current methods. 3. Gene expression sets specific to the murine islands of Calleja was established by applying immunoprecipitation and RNA-seq analyses to the mouse line expressing ribosomal protein-GFP fusion protein specifically in the islands of Calleja.

研究分野：神経解剖学

キーワード：カレハ島 腹側線条体 ドーパミン うつ病 アンヘドニア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、精神疾患病態において中心的役割を果たすセロトニン及びドーパミン等のモノアミン神経系の制御中枢、手綱核の機能についてモデルの解析を中心として研究を進めてきた。これまでに当時分子特性や動物行動の役割が不明であった手綱核に注目し、手綱核の網羅的遺伝子発現解析 (Aizawa et al., J Comp Neurol, 2012), 電気生理学的特性 (Aizawa et al., J Neurosci, 2013) およびうつ病様行動障害との因果関係 (Cui et al., J Neurosci, 2014) を明らかにしてきた。

これまでの我々の研究により手綱核の機能失調がうつ病におけるモノアミン代謝異常に関与する事が明らかとなってきたが、一方でモノアミン異常を背景にうつ病症状の発現を説明する実際の神経回路の同定は未だ進んでいない。

そこで本研究で注目したのはドーパミンなどのモノアミン神経投射を最も強く受ける領域の一つである側坐核である。うつ病の PET/fMRI など機能画像研究により複数の研究グループが一貫して失望・不快と関連した側坐核の血流減少を報告しており、「楽しい」と感じなくなる無快楽症 (アンヘドニア) の病態生理において中心的な役割を果たすことは広く知られている。一方、側坐核の支配血管を取り囲むカレハ島の機能については外科的・薬理的な操作が困難である事から研究は手つかずの状態である。実際、カレハ島の研究は、1970 年代後半を中心にゴルジ染色やニッスル染色を用いた記述的研究が散発的に行われたのみで、近年の遺伝子改変技術を用いた分子レベルの解析は皆無である。

### 2. 研究の目的

哺乳動物の脳には未だに機能の不明な脳部位が残されている。現在の神経科学の隆盛の中で、腹側線条体の一部に存在するカレハ島は陸の孤島のように最先端の研究から取り残されているものの、うつ病の症状発現の鍵を握る脳領域かもしれない。

申請者はカレハ島が、脳底部の血管に絡み付くように存在する細胞群から構成され、その多くが血管拡張物質である一酸化窒素を発現する事を見出しており、「カレハ島がうつ病の中核症状であるアンヘドニアの責任病巣である」という仮説に至っている。これらの脳底部の血管は快・不快の中枢と考えられる側坐核を栄養しているため、その機能低下は「楽しい」と感じなくなるアンヘドニアを生じる可能性が高い。実際、側坐核はうつ病において一貫して血流低下が報告され、アンヘドニアの病態生理において中心的役割を果たすと考えられる。また、アンヘドニアの客観的な診断技術は未確立であり、有効な治療手段の開発は QOL 改善のため喫緊の課題である。

カレハ島は腹側線条体に島状に存在し、従来の破壊実験や電気刺激等によりその機能を検討することは不可能なため、これまで上記仮説を検討することはできなかった。本研究の目的はマウスをモデルとしてカレハ島の分子細胞特性を明らかにし、アンヘドニアの基盤となる細胞基盤としての可能性を明らかにすることである。具体的には、マウスカレハ島にはドーパミン 3 型受容体が特異的に発現することに注目し、Cre-loxP 遺伝子組換え系を利用することでカレハ島特異的に遺伝子改変を行った。この技術を応用して光遺伝学プローブをカレハ島細胞へ発現させ、動物行動に与える影響を調べる。また、これらの細胞の網羅的遺伝子発現解析を世界に先駆けて行うことで、カレハ島の機能を制御するシグナル伝達系を明らかにする事で、アンヘドニアの治療薬開発の創薬標的を同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) カレハ島細胞の組織学的解析

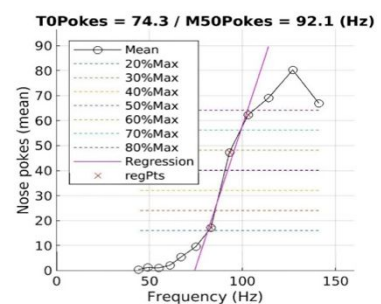
カレハ島を可視化するため、D3-Cre; Rosa-Rpl10a-EGFP マウスを作成し、その成体マウス脳を腹側面より蛍光顕微鏡で観察した。前脳基底部の表層に存在する GFP 陽性細胞を確認した上で、冠状断切片を作成し、遺伝子組織化学及び免疫組織化学によりマーカー遺伝子およびタンパク質の発現を可視化した。

#### (2) カレハ島細胞の興奮特性

カレハ島細胞の興奮性を最初期遺伝子 c-Fos の免疫反応性により検討した。免疫組織化学による予備的検討によると、非刺激時における腹側線条体神経細胞では c-Fos 免疫反応性に乏しく、定量的解析が困難であった。そこで、ラットにおける活性化が報告されている血管拡張薬 hydralazine の全身投与を行い、マウス腹側線条体における c-Fos 免疫反応性に対する影響を組織学的に検討した。

#### (3) アンヘドニア様行動異常の定量的解析法

成体雄マウスの内側前脳束に双極電極を慢性的に留置し、151Hz から漸減する定電流刺激に対する脳内自己刺激応答を調べた (右図)。すなわち、オペラントチャンパー内に設置し



たポートへの近接に応じて特定の電気刺激を行うことにより嗜癮行動を確立した。刺激頻度は特定の周波数で急激な減少を示すことから、その頻度をもって嗜癮行動に対する閾値を定量した。

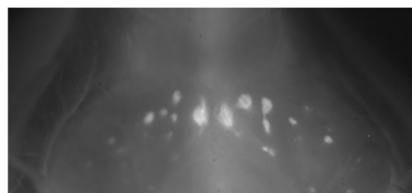
#### (4) カレハ島の遺伝学的標識と遺伝子発現解析

カレハ島細胞特異的にリボソームタンパク質-GFP 融合蛋白質を発現させたマウスを作成し、前脳広域および腹側線条体特異的組織を採取した。腹側線条体サンプルに対して免疫沈降実験および RNA-seq を行い、遺伝子発現特性からカレハ島特異的な遺伝子発現を解析したところ、

### 4. 研究成果

#### (1) カレハ島細胞の組織学的解析

カレハ島の組織学的特性については、免疫組織化学による検討が殆ど行われていないため、不明な点が多く残されている。我々がこの度開発した D3-Cre; Rosa-Rpl10a-EGFP マウスを用いてカレハ島を可視化したところ、腹側線条体の腹側面に点在する GFP 陽性の細胞塊が観察された(右図)。この GFP 蛍光を指標に複数の分子マーカーについて免疫組織化学的に検討したところ以下の所見を得た。1) カレハ島には樹状突起もしくは軸索など神経突起で主に構成される neuropil 部が存在すること、2) 上記 neuropil には Muscarinic acetylcholine 受容体 4 型が豊富に存在すること、3) カレハ島には Gad67 を発現する NeuN 陽性神経細胞が存在すること、4) 最内側のカレハ島が最も大きく発達していること、5) チロシン水酸化酵素を発現する神経線維の支配を受けていることなどを見出した。これらの所見は、カレハ島細胞が分子マーカーの発現を伴う特異的な分子特性を持っている可能性を示唆しており、ドーパミン受容やアセチルコリン受容などの神経伝達物質特性に特徴を持つことが明らかとなった。

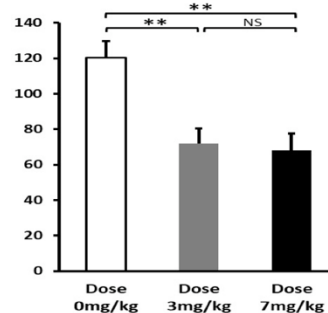


#### (2) カレハ島細胞の興奮特性

カレハ島細胞は腹側線条体に島状に点在している解剖学的特徴から、電気生理学的な測定が困難である。実際、カレハ島細胞の活動パターンを記載した論文は非常に限られている。一方で、前脳基底部の血管と近接するカレハ島は局所脳血流の影響を受けている可能性が考えられる。本研究では、この問題に取り組むため、最初期遺伝子 c-Fos の発現をもとに血圧変化の与える影響について調べた。ラット腹側線条体で c-Fos 発現誘導効果の報告されている血圧降下剤 hydralazine もしくは vehicle を全身投与し、腹側線条体における c-Fos 陽性細胞の発現変化を組織学的に検討した。c-Fos 免疫反応性の有無については、陽性細胞の豊富な海馬や視床室傍核などの領域を参照し、確認した。定量的解析の結果、カレハ島を含む腹側線条体領域の c-Fos 陽性細胞数は hydralazine 群及び vehicle 群で有意な差異は見られなかった。この結果は、カレハ島細胞の興奮性の種差の可能性を示唆している。

#### (3) アンヘドニア様行動異常の定量的解析法

アンヘドニアはうつ病のコア症状でありながら、動物実験での検討が困難な行動指標の一つである。遺伝学的モデルとして優れたマウスではシヨ糖嗜好性試験が広く使われているが、ヒトでのシヨ糖嗜好性がうつ病では変化しないこと、マウスうつ病様モデル間でシヨ糖嗜好性試験の結果が異なることなどから、より妥当性の高い行動試験が求められている。この問題に取り組むため、動物報酬行動をもとにした定量的行動試験を開発した。この新規に開発した実験系では、安定した嗜癮行動への閾値を得ることが可能であり、実際抗うつ薬 Nomifensine の投与により嗜癮行動に対する閾値が有意に低下することを確認した(右図)。この開発によりアンヘドニア様の定量的解析への道が大きく開かれるものと期待される。



#### (4) カレハ島の遺伝学的標識と遺伝子発現解析

カレハ島の細胞特性については、未だ不明な点が多く、分子的なツールの確立が急務である。ニッスル染色での所見によるとカレハ島は嗅結節に島状に点在する構造で細胞質の少ない顆粒細胞で主に構成されている。この中に GABA 作動性神経細胞を同定した。さらに、カレハ島細胞の分子特性を明らかにするために遺伝子発現プロファイリングに着手した。前脳広域サンプルに対して免疫沈降により標的細胞からの mRNA を回収したサンプルでは、GFP 遺伝子の排他的な発現が確認された。さらに予備的な検討では、ドーパミン 3 型遺伝子や神経細胞特異的な遺伝子

群の特異的な発現がみられたことから、これらのサンプルはカレハ島細胞の遺伝子セットとして矛盾しないと考えられた。

今後、このようにして得られた遺伝子発現プロファイルを詳細に解析することにより、カレハ島細胞の分子特性を明らかにするとともに、うつ病関連遺伝子や特異的代謝経路を同定することにより、カレハ島の機能およびうつ病病態への関与を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aizawa Hidenori, Zhu Meina	4. 巻 73
2. 論文標題 Toward an understanding of the habenula's various roles in human depression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 607 ~ 612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12892	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 Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Ohgidani Masahiro, Yamawaki Yosuke, Sahin Ezgi Hatice, Kitajima Takashi, Katsumata Seishi, Yamawaki Shigeto, Kato Takahiro A., Aizawa Hidenori	4. 巻 162
2. 論文標題 Antidepressant effect of the translocator protein antagonist ONO-2952 on mouse behaviors under chronic social defeat stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 107835 ~ 107835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2019.107835	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 該当する
1. 著者名 Yamawaki Yosuke, Shirawachi Satomi, Mizokami Akiko, Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Asano Satoshi, Oue Kana, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto, Hirata Masato, Kanematsu Takashi	4. 巻 131
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates lipopolysaccharide-induced hypothalamic inflammation-mediated anorexia in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104563 ~ 104563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.104563	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 相澤秀紀	4. 巻 19
2. 論文標題 手網核	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 分子精神医学	6. 最初と最後の頁 45-47
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 -

1. 著者名 吉野敦雄、相澤秀紀、高村真広、市川奈穂、柴崎千代、山脇洋輔、笹岡貴史、岡本泰昌、山脇 成人	4. 巻 70
2. 論文標題 うつ病における手綱核の役割 これまでのヒト脳に関する知見を中心に	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 神経研究の進歩	6. 最初と最後の頁 1017-1023
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 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 Yamawaki Yosuke, Yoshioka Norika, Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Oda Keisuke, Harada Kana, Shirawachi Satomi, Asano Satoshi, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto, Kanematsu Takashi, Akagi Hiroyuki	4. 巻 1680
2. 論文標題 Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 13 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1016/j.brainres.2017.12.004	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 Sugimoto Junya, Tanaka Moeko, Sugiyama Kaori, Ito Yukiko, Aizawa Hidenori, Soma Miho, Shimizu Tomoko, Mitani Akira, Tanaka Kohichi	4. 巻 66
2. 論文標題 Region-specific deletions of the glutamate transporter GLT1 differentially affect seizure activity and neurodegeneration in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 777 ~ 788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/glia.23281	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 Aikawa Tomonori, Watanabe Takaki, Miyazaki Taisuke, Mikuni Takayasu, Wakamori Minoru, Sakurai Miyano, Aizawa Hidenori, Ishizu Nobutaka, Watanabe Masahiko, Kano Masanobu, Mizusawa Hidehiro, Watase Kei	4. 巻 26
2. 論文標題 Alternative splicing in the C-terminal tail of Cav2.1 is essential for preventing a neurological disease in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3094-3104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/hmg/ddx193	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 相澤秀紀
2. 発表標題 うつ病における手綱核神経回路と神経炎症の役割
3. 学会等名 情動研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wanqin Tan, Miho Matsumata, Tomomi Aida, Harumi Ishikubo, Takako Usami, Kohichi Tanaka, Tatsumi Hirata, Hidenori Aizawa
2. 発表標題 Genetic labeling of the subpopulation of neurons in the mouse habenula
3. 学会等名 第125回日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidenori Aizawa
2. 発表標題 Glia in the habenula and its role in depressive-like behaviors and sleep
3. 学会等名 Takeda Habenula Day（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidenori Aizawa
2. 発表標題 Glial mobilization in the murine lateral habenula increases susceptibility to the chronic stress
3. 学会等名 6th Congres of asian college of neuropsychopharmacology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相澤秀紀
2. 発表標題 うつ病における手綱核神経回路と神経炎症の役割
3. 学会等名 情動研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wanqin Tan, Miho Matsumata, Tomomi Aida, Harumi Ishikubo, Takako Usami, Kohichi Tanaka, Tatsumi Hirata, Hidenori Aizawa
2. 発表標題 Genetic labeling of the subpopulation of neurons in the mouse habenula
3. 学会等名 第125回日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidenori Aizawa
2. 発表標題 Glia in the habenula and its role in depressive-like behaviors and sleep
3. 学会等名 Takeda Habenula Day (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidenori Aizawa
2. 発表標題 Glial mobilization in the murine lateral habenula increases susceptibility to the chronic stress
3. 学会等名 6th Congres of asian college of neuropsychopharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 野崎 香菜子、伊藤 日加瑠、扇谷 昌宏、加藤 隆弘、北島 貴司、勝又 清至、山脇 洋輔、山脇 成人、相澤 秀紀
2. 発表標題 Effect of TSP0-targeting compound ONO-2952 on the mouse behaviors under the chronic social defeat stress
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanao Nozaki, Hikaru Ito, Masahiro Ohgidani, Yosuke Yamawaki, Takashi Kitajima, Seishi Katsumata, Shigeto Yamawaki, Takahiro Kato, Hidenori Aizawa
2. 発表標題 TSP0-targeting compound ameliorates the abnormal behaviors of mice received social defeat stress
3. 学会等名 9th Fedaration of the Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidenori Aizawa
2. 発表標題 Dopaminergic and serotonergic transmission and stress-coping behavior
3. 学会等名 Behavioral adaptation and functional recovery from pathological states (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相澤秀紀
2. 発表標題 脳内モノアミン代謝における手綱核神経回路の役割と気分障害の病態生理
3. 学会等名 日本睡眠学会第42回定期学術集会シンポジウム (招待講演)
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
--	---------------------------	-----------------------	----