

令和 3 年 4 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02750

研究課題名(和文) うつ病発症脆弱性の個体差・性差構築に関わる分子神経基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular and neural mechanisms of individual- and -sex differences in behavioral response to stress

研究代表者

内田 周作(Uchida, Shusaku)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：10403669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスによる脳機能低下の個体差構築のメカニズム解明は、うつ病などのストレス性精神疾患の予防・治療法の確立につながることを期待される。本研究は、うつ病発症に関わるとされるストレス脆弱性の個体差構築にはエピジェネティックな遺伝子発現制御異常に起因する神経ネットワーク変容が関わるとの仮説を検証することを目的とした。本研究ではストレス感受性制御に関わる分子としてKDM5Cを同定し、その標的遺伝子の同定にも成功した。KDM5Cを介したエピジェネティックな遺伝子発現がストレス反応の個体差構築に関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスによる脳機能低下の個体差構築のメカニズム解明は、うつ病などのストレス性精神疾患の予防・治療法の確立につながることを期待される。本研究は、うつ病発症に関わるとされるストレス脆弱性の個体差構築にはエピジェネティックな遺伝子発現制御異常に起因する神経ネットワーク変容が関わるとの仮説を検証することを目的とした。その成果として、KDM5Cを介したエピジェネティックな遺伝子発現がストレス反応の個体差・性差構築に関わっていることが示唆され、KDM5Cを標的とした薬剤の抗ストレス・抗うつ作用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the molecular mechanism of individual difference in stress adaptation. To this end, we performed a comprehensive gene expression analysis with stress-susceptible and -resilient mice and in clinical depression. We found increased KDM5C expression in depressed individual and stress-susceptible mice. We generated transgenic mice overexpressing KDM5C and found that these TgM has stress-vulnerability. Conversely, KDM5C knockout mice showed stress resilient phenotypes. We also identified two genes as KDM5C target genes, which are also involved in behavioral response to stress. These data suggest that KDM5C-mediated epigenetic gene expression could be involved in behavioral response to stress.

研究分野：神経化学

キーワード：ストレス うつ病 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病の発症には遺伝的要因のみならず環境的要因(ストレス)が大きく作用することが推測されている(1)。しかし、大部分の人はストレスに適応することで精神的な健康を維持することができる。すなわち、うつ病予備群はストレスに対して脆弱な生物学的素因を有し、環境ストレスに対して適応することができずうつ状態に陥るといった“ストレス脆弱性仮説”が支持されている(2, 3)。神経可塑性には遺伝子発現調節が重要な役割を担っている。うつ病における抑うつ状態の慢性化や抗うつ薬による治療効果発現までには週単位の時間がかかることなどから、気分障害の病態には持続的かつ可逆的な遺伝子発現調節異常が関与すると推測される。従って、ヒストンアセチル化などのDNAの塩基配列に依存しないエピジェネティックな遺伝子発現調節が気分障害の病態を説明できる可能性が考えられている。実際、うつモデルマウスやうつ病患者死後脳・末梢白血球におけるエピジェネティクス制御因子の発現・機能異常が多数報告されている。

我々の先行研究から、内側前頭前野皮質におけるエピジェネティックな遺伝子発現変化がうつ病態に深く関与していることが推測されている。うつ病患者においても当該脳部位の機能異常や可塑性異常が示唆されている。しかし、内側前頭前野皮質におけるエピジェネティック分子異常とうつ症状との関連は不明である。

## 2. 研究の目的

我が国におけるうつ病の発症機序に関する基礎研究は欧米諸国に比べて不足している。うつ病患者における女性比率の高さや薬物治療反応における性差、死後脳解析における遺伝子発現パターンの性差(4)、うつ病患者GWAS解析によるエピジェネティクス要因との関連(5)、女性うつ病患者に特徴的なエピジェネティクス関連遺伝子の同定(6)といった知見から、うつ病の発症・病態ならびに治療反応における性差構築のメカニズム解明への機運が高まっている。しかし、脳内ストレス適応機構の個体差・性差構築のメカニズムは不明である。我々の先行研究から、「内側前頭前野皮質における神経回路の変容に伴うエピジェネティックな遺伝子発現異常がうつ病の発症機序となる」との仮説をたて、この妥当性を分子・神経回路レベルの双方向から検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

8週齢の雄性・雌性 C57BL/6J (B6)、DBA/2(DBA)、KDM5C 過剰発現(KDM5COE)マウスを使用した。餌と水は自由摂取させ、12時間の明暗周期下で飼育した。動物使用に伴い、本学における動物実験指針及び動物実験規則等の指針に示される基準に適合することを確認し、当該委員会による使用許可を得た。

### (2) 慢性ストレス負荷

オスマウスに社会性敗北ストレス(SDS)を負荷した。テストマウスを攻撃性の高いCD1マウスと5分間同居させ(肉体的ストレス)、その後一晩、ケージ内に仕切りを置き直接接触できないようにした(心理ストレス)。これを5日間あるいは10日間連続して行った。メスマウスに対しては慢性予測不能ストレスを3週間負荷した。

### (3) 行動評価

Social interaction test: はじめて接触するマウスと5分間同一ケージにいれ、相手マウスとの接触時間を測定した。

Sucrose preference test: 水ボトルと1.5%スクロース液の入ったボトルをマウスに提示し、4時間での飲料水を計測した。スクロース液を飲んだ割合をSucrose preference (%)として算出した。Sucrose preferenceはアンヘドニアの症状の1つとされている。

### (4) 遺伝子発現解析

マウスから内側前頭前野領域を取り出し、総RNAを抽出した。HiSeq-1500を用いたRNA-seqを行った。また、総RNAを用いた逆転写PCR反応によりcDNAを調整し、SYBR Green Master Mixを用いたリアルタイムPCR法にて目的mRNA発現量を定量解析した。内在性コントロールにはGAPDH mRNAを使用した。

### (5) 統計解析

2群間比較にはunpaired t-testを、3群以上の比較にはOn-way ANOVAあるいはtwo-way ANOVAを使用した。有意差が認められた場合には、Bonferroni correctionあるいはTukey's post-hoc test分析を行った。p値が0.05未満を有意と判定した。

## 4. 研究成果

### (1) ストレス脆弱性の性差・個体差構築に関わる神経ネットワークの同定

ストレス対処行動における腹側海馬 内側前頭前野ネットワークの役割を検討した。申請者らはこれまでに、慢性ストレス負荷後にうつ状態を示したマウスでは、雌雄マウスともに腹側海馬を起点とした神経回路変容を示唆する結果を見出している。そこで、腹側海馬回路の神経活動を活性化あるいは抑制した場合のストレス適応に対する影響を検討した。

ストレス脆弱性を有するDBAオスマウスの腹側海馬にCre依存的活性化型Dreadd発現ウイルスを、腹側海馬から投射を受ける内側前頭前野にCreを発現する逆行性AAVを投与したマウスを作製した。これらマウスにストレスを負荷し、その後の行動を評価した。その結果、社交性試験において、ストレス負荷マウスにおける社交性の低下は、神経活動活性化によって消失していた。また、スクロース嗜好性試験においても、ストレス負荷によるアンヘドニア行動は、神経活動操作によって消失していた。この結果から、腹側海馬から内側前頭前野に投射している神経回路はストレスレジリエンスあるいは抗うつ作用に関わっていることが示唆された。

一方、メスマウスにおいて、腹側海馬→内側前頭前野を刺激してもストレスレジリエンスや抗うつ様行動は観察されなかった。この結果から、ストレス感受性制御ネットワークにおける性差が示唆された。

### (2) ストレス脆弱性の構築に関わるエピジェネティクス制御機構の解明

KDM5Cのストレス脆弱性形成に対する役割を検討した。予備的検討から、内側前頭前野領域におけるヒストンリジン脱メチル化酵素KDM5Cを介したエピジェネティック制御がストレス適応の性差・個体差構築に関与している可能性が考えられた。そこで、内側前頭前野特異的にKDM5Cをノックアウト(ゲノム編集技術)あるいは過剰発現したマウスを作製し、KDM5Cのストレス対処行動に対する役割を検討した。その結果、KDM5C過剰発現マウスはストレス感受性の亢進を、ノックアウトマウスはストレスレジリエンスを獲得していた。

次に、KDM5C を介した新規分子経路の同定を試みた。KDM5C 遺伝子改変マウスを用いて、RNA-seq 解析により KDM5C の標的遺伝子群を同定した。得られた候補因子について、ストレス脆弱性の性差・個体差構築との因果関係を検証した。その結果、内側前頭前野における Npas4 がストレスレジリエンスに必須であることを行動学的解析により確認した。すなわち、KDM5C 過剰発現マウスにおける Npas4 の発現低下、KDM5C ノックアウトマウスにおける Npas4 発現亢進を確認した。

本研究の成果により、内側前頭前野における KDM5C を介したエピジェネティクス制御がストレス感受性に関わっていることが示唆された。また、ストレス感受性制御における性差の存在も示唆された。今後、分子基盤研究をさらに推進することで、ストレス性精神疾患における個別化医療・性差医療の確立につながることを期待できる。

#### <引用文献>

- 1) Sullivan, P.F., Neale, M.C., and Kendler, K.S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157, 1552-1562.
- 2) Krishnan, V., and Nestler, E.J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894-902.
- 3) Uchida S, Yamagata H, Seki T, Watanabe Y. Epigenetic mechanisms of major depression: Targeting neuronal plasticity. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2018 Apr;72(4):212-227. doi: 10.1111/pcn.12621. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29154458.
- 4) Labonté B, Engmann O, Purushothaman I, Menard C, Wang J, Tan C, Scarpa JR, Moy G, Loh YE, Cahill M, Lorsch ZS, Hamilton PJ, Calipari ES, Hodes GE, Issler O, Kronman H, Pfau M, Obradovic ALJ, Dong Y, Neve RL, Russo S, Kazarskis A, Tamminga C, Mechawar N, Turecki G, Zhang B, Shen L, Nestler EJ. Sex-specific transcriptional signatures in human depression. *Nat Med*. 2017 Sep;23(9):1102-1111. doi: 10.1038/nm.4386. Epub 2017 Aug 21. Erratum in: *Nat Med*. 2018 Apr 10;24(4):525. PMID: 28825715; PMCID: PMC5734943.
- 5) Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium. Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. *Nat Neurosci*. 2015 Feb;18(2):199-209. doi: 10.1038/nn.3922. Epub 2015 Jan 19. Erratum in: *Nat Neurosci*. 2015 Jun;18(6):926. Erratum in: *Nat Neurosci*. 2015 Dec;18(12):1861. PMID: 25599223; PMCID: PMC4378867.
- 6) CONVERGE consortium. Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. *Nature*. 2015 Jul 30;523(7562):588-91. doi: 10.1038/nature14659. Epub 2015 Jul 15. PMID: 26176920; PMCID: PMC4522619.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Seki Tomoe, Yamagata Hirota, Uchida Shusaku, Chen Chong, Kobayashi Ayumi, Kobayashi Masaaki, Harada Kenichiro, Matsuo Koji, Watanabe Yoshifumi, Nakagawa Shin	4. 巻 117
2. 論文標題 Altered expression of long noncoding RNAs in patients with major depressive disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Psychiatric Research	6. 最初と最後の頁 92～99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpsychires.2019.07.004	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 Yamagata H, Ogiwara H, Matsuo K, Uchida S, Kobayashi A, Seki T, Kobayashi M, Harada K, Chen C, Miyata S, Fukuda M, Mikuni M, Hamamoto Y, Watanabe Y, Nakagawa S	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct epigenetic signatures between adult-onset and late-onset depression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81758-8	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 Miyata S, Yamagata H, Matsuo K, Uchida S, Harada K, Fujihara K, Yanagawa Y, Watanabe Y, Mikuni M, Nakagawa S, Fukuda M	4. 巻 87
2. 論文標題 Characterization of the signature of peripheral innate immunity in women with later-life major depressive disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Behav Immun	6. 最初と最後の頁 831-839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbi.2020.03.018	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9件（うち招待講演 8件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 Molecular and neural mechanisms of stress susceptibility and resilience
3. 学会等名 Neuro2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 ストレスに強い脳と弱い脳の分子メカニズム
3. 学会等名 日本精神神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 Epigenetic mechanisms of stress-induced depression
3. 学会等名 6th Congress of AsCNP (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 Epigenetic mechanisms of stress susceptibility and resilience
3. 学会等名 American College of Neuropsychopharmacology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 ストレス関連精神疾患におけるカルシウムシグナリングの役割
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 運動によるストレスレジリエンス獲得の分子メカニズム
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 ストレス関連精神疾患におけるエピジェネティクス制御機構の破綻と神経可塑性異常
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 遺伝・環境相互作用によるレジリエンス形成の分子基盤
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会・第42回日本生物学的精神医学会・第4回日本精神薬学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田周作
2. 発表標題 エピジェネティクスの視点から紐解く脳内ストレス適応の分子メカニズム
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------