

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07615

研究課題名(和文) 気分障害の原因となる視床室傍核特異的ミトコンドリア障害におけるMAOBの意義

研究課題名(英文) Significance of MAOB in paraventricular nucleus-specific mitochondrial defects that relevant to a cause of mood disorders

研究代表者

窪田 美恵(坂下美恵)(Kubota-Sakashita, Mie)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・客員研究員

研究者番号：90344035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：モノアミン酸化酵素b(MAOb)のモノアミン代謝に対する役割を追求するため、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用い、Maob遺伝子の全身性、および脳特異ノックアウトマウスを作成し、視床室傍核(PVT)とその関連脳部位において、質量分析によるモノアミン、およびその代謝物の測定を行った。また、凍結切片を用いて、イメージング質量分析での検出方法を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、モノアミン神経伝達の機能不全は多くの神経・精神障害を引き起こすと考えられている。脳内モノアミン濃度は、モノアミン酸化酵素(Mao)によって調節されるが、その一つであるMaobは、脳内では視床室傍核(PVT)および背側縫線核に高発現している。PVTは、感情的な行動に関与する脳領域と、機能的および解剖学的に関連しており、PVTにおけるMaobの基質を探索することが重要である。

研究成果の概要(英文)：To investigate substrates of monoamine oxidase b (Maob) in brain, we developed Maob knockout (KO) mice and Maob flox/flox mice by CRISPR/Cas9 system and measured amounts of monoamines and their metabolites by LC-MS/MS. Noradrenaline, dopamine, 3-methoxytyramine, phenylethylamine (PEA), serotonin, and 5-hydroxyindoleacetic acid was detected in eight brain regions including paraventricular thalamus (PVT). To evaluate the expression level of Maob, qPCR method by SYBR green was applied to quantify the expression. We measured expression level of Maa and NDP genes which locate on the same chromosome as Maob. Maob gene expression was markedly decreased and Maa and NDP genes was not, suggesting that specific KO of Maob was succeeded. Further, we tried imaging mass spectrometry of monoamines using frozen section of the brain. Although signals of serotonin, noradrenaline, dopamine were detected, improved methods such as derivatization should be applied for an accurate quantification.

研究分野：神経科学

キーワード：モノアミンオキシダーゼB 気分障害 フェニルエチルアミン 稀少アミン ミトコンドリア

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 双極性障害は、躁状態とうつ状態を繰り返し、社会生活の障害に至る疾患である。双極性障害では、脳画像解析や死後脳を用いた病理学的解析が進められているが、一致した所見は得られておらず、病態の責任部位や神経基盤は未だ不明である。

当研究チームでは、双極性障害にミトコンドリア機能障害が関与するとの仮説を検証するため、気分障害を高頻度に併発する遺伝性ミトコンドリア病の原因遺伝子ミトコンドリア DNA (mtDNA) 合成酵素 (Polymerase gamma1: *Polg1*) の変異体を神経特異的に発現するモデルマウスを作出した。このマウス (Tg マウス) は、自発性、反復性うつ状態を示し、この表現型は、視床室傍核 (paraventricular nucleus of the thalamus: PVT) に欠失 mtDNA が多く蓄積することにより生じると考えられた。PVT は、視床の中でも、視床上部として松果体や手綱核と同様の発生源を持ち、生物リズムやストレスに関連した機能を持つ。PVT からは、腹内側前頭前野、側坐核、島皮質、扁桃体、外側中隔など、いわゆる辺縁系へ投射し、概日リズムに関わる脳部位 (視交叉上核など) や、縫線核 (Dorsal Raphe: DR) のセロトニン (5HT) 神経、視床下部オレキシン神経などの投射を受けることがわかっている。近年、最新の高感度定量イメージング質量分析法により、PVT には、5HT 神経の起始核である DR に次いで、多くの 5HT が含まれることが見出された。さらに、rs-fcMRI にて、うつ病患者で特徴的に結合が亢進している領域として PVT が同定されるなど、PVT と気分障害の関連が強固になりつつある。

(2) 申請者は、ミトコンドリア呼吸鎖のうち、mtDNA にコードされるチトクローム c 酸化酵素 (cytochrom c oxidase: COX) に対する抗体と核遺伝子にコードされるコハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase: SDH) に対する抗体で二重染色を行うことにより、ミトコンドリア障害細胞を免疫組織化学的に可視化する方法を確立した。この方法により、Tg マウス、およびうつ状態を伴うミトコンドリア病患者の PVT では、COX の染色性のみが欠損する "COX 陰性細胞 (ミトコンドリア障害細胞)" が集積していることがわかった。また、抗 8-OH-dG 抗体 (酸化ストレスマーカー) を用いた免疫組織化学により、双極性障害患者の PVT で酸化ストレスが亢進していることを見出した。この方法で野生型マウスを調べたところ、加齢に伴い、DR 特異的にミトコンドリア障害細胞が出現することを見出した。DR は、うつ病との関連が示唆されている 5HT 神経の起始核であるが、なぜこの 2 領域に共通してミトコンドリア障害細胞が多く出現するのかが謎であった。当研究室およびデータベース上の遺伝子発現データを詳細に解析し、モノアミン酸化酵素 b (monoamine oxidase b : Maob) の脳内発現がこの 2 部位に共通して発現しているという事実に注目した。モノアミンが Maob で代謝される際、同時に過酸化水素が生成され、細胞内に酸化ストレスを引き起こすことが知られており、これが mtDNA の酸化的修飾を引き起こし、両部位にミトコンドリア障害細胞が集積する可能性が考えられた。Maob a, b はいずれもミトコンドリア外膜上に局在するが、両者の機能分担には大きな謎が残っている。基質特異性の研究からは、Maob はドーパミン (DA) およびフェニルエチルアミン (PEA) を代謝するとされているが、PVT にドーパミントランスポーターは存在せず、PEA は脳内に痕跡程度しか存在しない「トレースアミン」であるため、いずれも PVT における Maob の役割を十分に説明することはできない。すなわち、5HT 起始核である DR およびその主要な投射先である PVT に、5HT を基質としないはずの Maob が選択的に発現している理由は未だ不明である。PVT において、どのモノアミンを代謝しているのかを明らかにすべきと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、双極性障害の有力な候補脳部位である PVT に、なぜミトコンドリア機能障害が蓄積するかを明らかにすることにより、双極性障害における責任脳部位はどこかという大きな問題解決につながる重要な手がかりを得ることである。

(1) PVT と DR に共通したミトコンドリア障害細胞の蓄積は、Maob によるモノアミンの酸化に伴う酸化ストレスに起因する、との仮説を検証する。

(2) CRISPR-Cas9 のシステムを用いて、*Maob* ノックアウト (KO) を作製し、脳内モノアミンの変化を全身性、脳特異的 KO マウスの両者で比較する。そのため、PVT のような小さな神経核における高感度モノアミン定量法を確立する。5HT 等のモノアミンの脳内分布の網羅的解析を行うことにより、PVT における *Maob* の基質を明らかにする。

(3) *Maob* 遺伝子に加え、同じ染色体上の遺伝子である *Maoa*、*NDP* (*Norrie disease pseudoglioma*) の発現レベルを qPCR 法により定量し、*Maob* 遺伝子のノックアウトが成功していることを確認するとともに、周囲の遺伝子座に影響を及ぼしていないことを確認する。

(4) *Maob* KO マウスにおける脳内モノアミン類の変化を可視化し、分布の違いを明らかにする目的で、イメージング質量分析法によるモノアミン類の解析を行う。PVT と関連する部位での変化を同時に検出することで、PVT を含む神経回路内モノアミン類の変化を空間情報とともに可視化する。

3. 研究の方法

(1) CRISPR-Cas9 による *Maob* KO マウス作出

CRISPR-Cas9 のシステムを用いて、*Maob* KO マウスを作出した。全身性 KO マウスと共に *Maob* 遺伝子を挟んで *Lox2272* サイトを持つ *flox* マウスを作出し、*Nestin-Cre* マウスと掛け合わせるにより脳特異的な KO マウスを実現した。これにより、*Maob* 欠損がモノアミンの量と分布に与える影響について、解析することにより、PVT における *Maob* の基質を探索した。

(2) *Maob* ノックアウトマウスにおける脳、および血漿中モノアミン量の定量

マウスをイソフルランの麻酔下でマイクロエーブ固定し、脳内モノアミン代謝経路を停止させた状態でサンプリングを行った。摘出した脳スライスより PVT 領域を摘出した。PVT 領域と連絡のある側坐核、島皮質を含む 8 領域についても同時に摘出し、測定に使用した。これらの領域において、モノアミン類 4 種類 (DA, PEA, 5-HT, NA) に加え、その代謝物である 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA)、3-methoxytyramine (3-MT) の量を質量分析法により定量した。同様に血漿中のモノアミン量についても定量し、*Maob* ノックアウトによる変化を検討した。

(3) CRISPR-Cas9 によるノックアウトは時に非特異的な切断も引き起こし、オフターゲットと言われる非特異的なノックアウトも引き起こす。*Maob* 遺伝子がノックアウトされていること、および CRISPR/Cas9 による非特異的な遺伝子の欠失などが無いことを確認するため、KO マウス脳および肝臓、小腸から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により、*Maob* 遺伝子の近傍に存在する *Maoa* 遺伝子、*Ndp* (*Norrie disease pseudoglioma*) 遺伝子について、その発現量を比較した。

(4) *Maob* ノックアウトマウスにおけるイメージング質量分析法を用いたモノアミン類の分布の検討

脳内におけるモノアミンの分布について、*Maob* ノックアウトによる違いを検討するため、新鮮凍結した脳切片を作成し、イメージング質量分析専用のスライドガラスを用いて、5HT、DA、NA の脳内分布を網羅的に観察した。

4. 研究成果

(1) *Maob* KO マウスにおける脳、および血漿中モノアミン量の定量

全身性 KO マウスと共に *Maob* 遺伝子を挟んで *Lox2272* サイトを持つ *flox* マウスを作出し、*Nestin-Cre* マウスと掛け合わせるにより脳特異的な KO マウスを作出した。これらの 2 種類のマウスを用いて、PVT を含む 8 領域におけるモノアミン類とその代謝物 (計 6 種類) を質量分析法で測定したところ、全身性 KO マウス脳では、8 領域すべてにおいて PEA が増加していた。また、*Nes-Cre* マウスと *Maob flox/flox* マウスとを掛け合わせて作出した脳特異的 KO マウスでは、CP を中心に PEA の増加が多少確認される程度にとどまった。また、血漿中 PEA も全身性 KO では野生型に比べて上昇がみられたが、脳特異的 KO マウスでは上昇を認めなかった。

(2) *Maob*、*Maoa*、*Ndp* 遺伝子の定量発現解析

全身性 KO マウス脳の遺伝子発現量解析結果により、*Maob* 遺伝子発現は KO マウスではほぼ検出されず、ノックアウトが成功したと考えられた。また、*Maoa* 遺伝子、*NDP* 遺伝子の発現量は、野生型に比べ、有意な差は見出されず、*Maob* 遺伝子の周囲にオフターゲットによる影響は検出されなかった。

(3) *Maob* KO マウスにおけるイメージング質量分析法を用いたモノアミン類の分布の検討

5HT、DA、NA を同時検出可能なイメージング質量分析の条件検討を行い、各ターゲット分子についてそれぞれ撮影条件を確立した。また、同時に画像取得するための解像度やスキャンスピードなどを設定し、矢状断で作成した脳切片を一度にイメージングする方法を確立した。しかし、イメージング質量分析では、標的物質の抽出を簡略化して組織切片上で直接レーザーによるイオン化を行う性質上、夾雑物によるイオン化阻害や、質量電荷比が標的物質と同じ値を持つ非特異的な成分を検出してしまう可能性があるため、異なる方法における工夫 (モノアミンの誘導体化など) が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Youhei Obata, Mie Kubota-Sakashita, Takaoki Kasahara, Masafumi Mizuno and Tadafumi Kato
2. 発表標題 Identification of the substrates of MAO-B in mouse brain tissues by measuring the monoamines and metabolites using a high sensitive LC-MS/MS method
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Youhei Obata, Mie Kubota-Sakashita, Takaoki Kasahara, Masafumi Mizuno and Tadafumi Kato
2. 発表標題 Neural dysfunction in paraventricular thalamus impacted by MAO-B in bipolar disorder and depression
3. 学会等名 日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 脳神経科学センター 精神疾患動態研究室ホームページ http://mdmd.riken.jp/

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	島 康之 (Shima Yasuyuki) (60815885)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ 上級研究員 (82401)	

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