

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17095

研究課題名(和文) うつ病における前頭前野テロメア短縮の病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological significance of prefrontal telomere shortening in depression

研究代表者

鹿内 浩樹 (SHIKANAI, Hiroki)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：00632556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：テロメアは細胞周期にわたって染色体の安定化機能をもつ構造体である。近年、うつ病やPTSDなどの精神疾患において、テロメア長が異常短縮することが報告された。本研究では、生後3週齢時にストレスを負荷することで作製されるうつ病動物モデル(3wFS)を用いてうつ病におけるテロメア長短縮のメカニズムについて追究した。分子生物学的実験の結果、海馬において、3wFS群のテロメア伸長酵素テロメラーゼ(TERT)のタンパクの減少が認められた。免疫組織化学染色実験の結果、海馬におけるTERTは、神経幹細胞ではなく成熟神経細胞に存在する可能性が高いことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでうつ病の病態については、モノアミン仮説やダウンレギュレーション仮説など抗うつ薬の薬理作用機序から逆行的に導かれることが主流であった。近年よく考察される神経新生仮説についても、抗うつ薬による神経由来成長因子(BDNF)の増加と神経新生亢進の所見が決め手であり、本質的には同一の考え方である。そのため病態仮説に基づいたこれまでのうつ病の創薬は、モノアミン神経系に作用するものに限られていた。本研究は既存の抗うつ薬やモノアミン系に捉われない、うつ病研究の新しい切り口や創薬ターゲットを示すものであり、うつ病の新規治療戦略を開拓する上で一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The telomere is an essential structure to stabilize chromosomes throughout the cell cycle. Recently, it was reported that telomere length was abnormally shortened in psychiatric disorders such as depression and PTSD. In this study, we investigated the mechanism of telomere length shortening in depression using the animal model of depression (3wFS), exposed to aversive stress (foot shock: FS) at 3 weeks-age. We revealed that telomere length was shortened in the medial prefrontal cortex and hippocampus in the 3wFS group. Moreover, we elucidated the down-expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) protein in the hippocampus. In the immunohistochemical experiments, we revealed that TERT protein in the hippocampus was detected in mature neurons but not neural stem cells.

研究分野：神経薬理学

キーワード：うつ病 テロメア テロメラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

テロメアは細胞周期にわたって染色体の安定化機能をもつ構造体であり、染色体末端に存在して繰り返し DNA 配列を有している。このテロメアの長さは細胞寿命の決定因子の一つとして考えられ、テロメアを伸長させる酵素テロメラーゼによって再生・維持されるが、一般的に老化・細胞分裂毎に短縮していく。しかし、がん細胞においてはテロメラーゼ活性の亢進が認められており、細胞不死化の要因であると推測されている。一方で、糖尿病や高血圧、さらにはうつ病や PTSD などの精神疾患においてはテロメア長の異常短縮が報告されている。

最近、我々の共同研究グループである神戸大学大学院医学研究科精神医学分野は、自殺者の血液および前頭葉におけるテロメア長の異常短縮を報告した(1)(図 1)。自殺はうつ病と強い相関関係にあることが知られている。従って、この自殺者の血液や脳におけるテロメアの異常短縮は、うつ病の病態の一つである可能性が高い。

これまでに我々の研究グループでは、生後 3 週齢のラットに嫌悪ストレスを反復負荷することで作製される 3wFS 群(2)は、成熟後に強制水泳試験における無動時間の延長うつ様行動を示すこと、さらに抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬フルボキサミンの反復投与により改善することを報告した(3)。従ってこの 3wFS 動物は、うつ病のモデル動物として高い行動薬理学的妥当性を有している。この動物の内側前頭前野(mPFC)、海馬(HIP)および扁桃体(AMY)におけるテロメア長を測定したところ、mPFC および HIP において対照群と比較して異常な短縮を示す所見を得ている (preliminary data)。しかしながらその詳細なメカニズムと病態生理学的な意義については不明なままである。

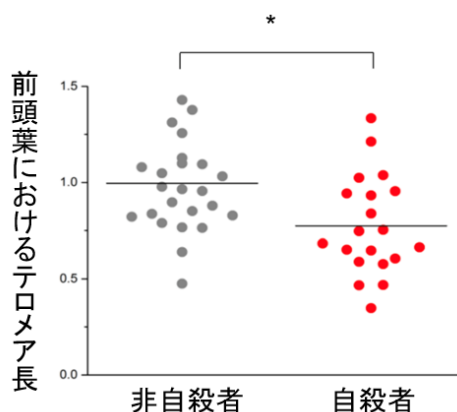


図 1. 死後脳前頭葉におけるテロメア長の比較。自殺既遂者のテロメア長は異常な短縮が認められる (Otsuka et al., 2017 より抜粋・改変)。

2. 研究の目的

本研究は、うつ病とテロメアの関係性を明らかにすることを目的とし、うつ病モデル動物 3wFS を用いた脳内テロメラーゼの発現解析を試みた。さらに、抗うつ薬の反復投与が脳内テロメア長の測定とテロメラーゼの発現に及ぼす影響についても解析した。また、一般的に神経細胞は胎生期、幼若期に新生され、成熟期では新生されないとされてきたが、近年、海馬などの一部領域成熟期においても神経幹・前駆細胞が存在し、それらが増殖分化する、すなわち神経新生 (neurogenesis) が起きていることが報告されている(4)。そこで脳内 TERT の発現分布について組織形態学的解析を試みた。

3. 研究の方法

実験はすべて動物実験委員会の承認を受け、「北海道医療大学動物実験規定」に準拠して行った。実験に用いるうつ病モデル動物(3wFS)の作製は、生後 3 週齢の雄性 Wistar/ST ラットをフットショック箱にいれ、足蹠電撃ショック嫌悪ストレスを 5 日間連続で負荷することにより作製した(図 2)。脳組織のサンプリングは、生後 10 週齢の 3wFS 群および対照群の脳から mPFC、HIP および扁桃体(AMY)を氷冷下でトリミングした。トリミングした脳組織は、①ウェスタンブロット法による TERT タンパクの発現解析、②定量 RT-PCR 法による TERT mRNA の発現解析に用いた。また、正常動物のホルマリン灌流固定した脳を用いて、③免疫組織化学染色法による TERT タンパクの脳内発現分布解析を行った。

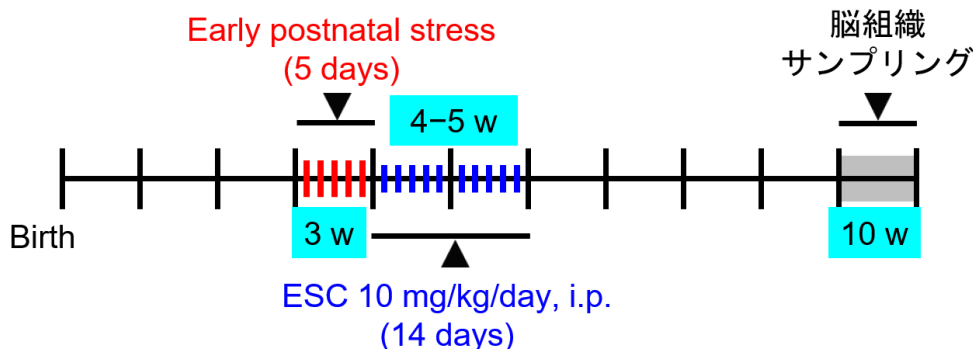


図 2. うつ病モデル動物の作製、薬物投与、サンプリングのプロトコール。

4. 研究成果

①ウェスタンブロット法による TERT タンパクの発現解析

対照群(n=15)と比較して 3wFS 群(n=16)の HIP において、TERT タンパク発現の減少が認められた。一方、mPFC および AMY においては有意な変化は認められなかった(図 3)。

3wFS に抗うつ薬であるエスシタロプラムを 14 日間連続投与すると、3wFS 群で認められた TERT タンパクの減少は回復した。

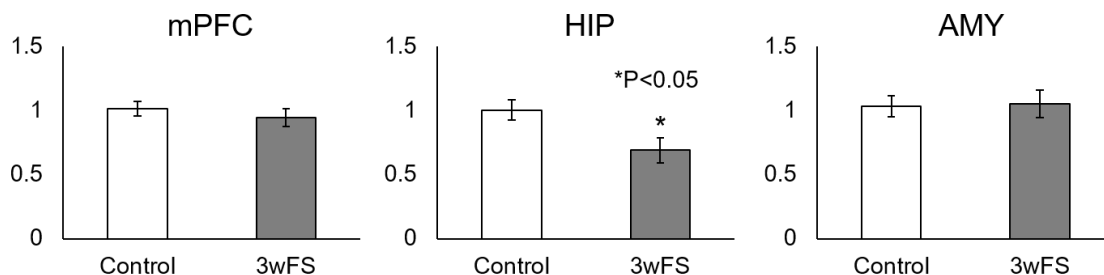


図 3. うつ病モデル動物 3wFS の脳内 TERT タンパクの発現量。GAPDH のバンド輝度をローディングコントロールとして、2 群間の相対値の平均を比較した。

②定量 RT-PCR 法による TERT mRNA の発現解析

対照群(n=10)と比較して 3wFS 群(n=10)の mPFC および HIP においては、減少傾向が見られたが統計学的に有意な変化は認められなかった。また、AMY においては有意な変化は認められなかった(図 4)。

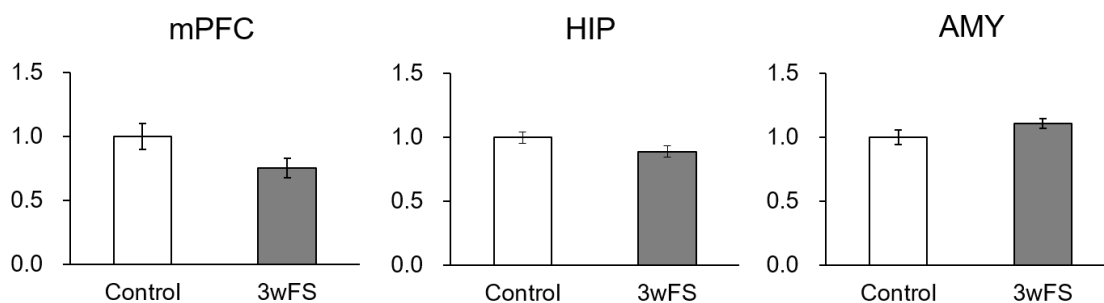


図 4. うつ病モデル動物 3wFS の脳内 TERT mRNA の発現量。TATA binding protein の発現量をローディングコントロールとして、2 群間の相対値の平均を比較した。

③免疫組織化学染色法による TERT タンパクの発現分布解析

正常動物において脳内の TERT 陽性細胞は、神経細胞のマーカーの 1 つである NeuN を共発現していた。一方、未熟神経細胞のマーカーの 1 つである doublecortin の陽性細胞中に TERT は検出されなかった。さらに神経細胞やグリア細胞に分化する前の状態である神経幹細胞(神経上皮細胞)のマーカーの 1 つである Sox2 陽性細胞中にも TERT は検出されなかった。すなわち成体脳における TERT は、成熟した神経細胞に存在する可能性が高い。しかし、成熟したグリア細胞内にも存在している可能性は否定できないため、グリア細胞マーカーを使用した検討も必要であると考えている。

先の報告と合わせて本研究による実験結果を総合的にみると、うつ病モデル動物 3wFS の HIP においては TERT 発現量の減少によりテロメア長の短縮が引き起こされると解釈できた。また抗うつ薬 ESC により TERT の発現量低下が回復することから、ESC には、シナプス間隙におけるセロトニンの遊離量を増大させる機序以外の、未知の作用機序が存在することが推察された。一方で mPFC におけるテロメア長短縮のメカニズムについては明らかとならなかった。これは TERT 以外にテロメア長を調整する因子が存在することを示唆する。また、海馬の TERT は予想と反して成熟神経細胞に存在する可能性が示された。このことは TERT にはテロメア長を伸長させる機能以外の生理作用が存在する可能性を考える必要性を提示した。

なお、これらのデータは論文投稿準備中であり、上記以上のデータ図表やウェスタンブロット現像写真、共焦点顕微鏡画像等の掲載は控えたい。

<引用文献>

- 1) Otsuka I, Izumi T, Boku S, Kimura A, Zhang Y, Mouri K, Okazaki S, Shiroiwa K, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I, Hishimoto A. Aberrant telomere length and mitochondrial DNA copy number in suicide completers. *Sci Rep*. 2017 Jun 9;7(1):3176. doi: 10.1038/s41598-017-03599-8
- 2) Shikanai H, Kimura S, Togashi H. Early life stress affects the serotonergic system underlying emotional regulation. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(9):1392-5. doi: 10.1248/bpb.b13-00337.
- 3) Lyttle K, Ohmura Y, Konno K, Yoshida T, Izumi T, Watanabe M, Yoshioka M. Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. *Brain Res*. 2015 Aug 7;1616:88-100. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.058.
- 4) Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):897-914. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野 匡祐、鹿内 浩樹、大橋 敦子、菱本 明豊、泉 剛
2. 発表標題 うつ病モデル動物における脳内テロメラーゼの発現
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿内 浩樹、山日 祐平、安西 萌、竹村 惇志、吉岡 充弘、泉 剛
2. 発表標題 反復拘束ストレス負荷うつ病モデル動物の辺縁系におけるFKBP5の発現変化
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿内 浩樹、Rebel Ghebream, 吉田 隆行、菱本 明豊、吉岡 充弘、泉 剛
2. 発表標題 うつ病モデル動物における扁桃体FKBP5の発現様式
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿内 浩樹、渡曾 明希、相山 友里奈、大島 伸宏、平出 幸子、飯塚 健治、泉 剛
2. 発表標題 注意欠如/多動性障害モデル動物SHRSP/Ezoの辺縁系D-セリン系の機能異常
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鹿内 浩樹、進藤 つぐみ、平出 幸子、飯塚 健治、泉 剛
2. 発表標題 D-アミノ酸化酵素阻害薬の前頭前野局所投与は、SHRSP/EzoのAD/HD様行動を改善する
3. 学会等名 第94回薬理学会年会
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