

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22415

研究課題名（和文）成体神経新生におけるオルガネラ間接触がPTSD発症に果たす役割

研究課題名（英文）Roles of organelle contacts on PTSD onset during adult neurogenesis

研究代表者

平林 祐介（Hirabayashi, Yusuke）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：80447391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Post-traumatic stress disorder (PTSD)は強烈なショックやストレスにより引き起こされる障害で、罹患率は5-8%に上る。従って、PTSDは日常生活に困難を引き起こし、時には犯罪を誘発することから大きな社会問題となっている。しかしながら、これまでにPTSDの原因として記憶想起メカニズムの異常が提唱されているものの、その分子機構はほとんど不明なままであった。本研究ではPTSD発症の原因に分子的に迫り、その解明の端緒となる結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTSDを罹患すると一般的な環境とPTSDの原因となった特定の状況を過剰に関連付けてしまい、安全な状況下でも恐怖を感じるようになる。例えば火事を原因とするPTSD患者は焚火と火事の匂いについて火の規模や危険性などの「差別化」が出来ず、焚火に必要以上の恐怖を感じるようになる。本研究はこのような問題の解決の糸口を見出す重要な研究である。

研究成果の概要（英文）：Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a disorder caused by intense shock and stress, with an incidence rate of 5-8%. Thus, PTSD is a major social problem because it causes difficulties in daily life and sometimes triggers crime. However, although abnormalities in memory recall mechanisms have been proposed as a cause of PTSD, the molecular mechanisms remain largely unknown. In this study, we investigated the molecular causes of PTSD onset and obtained results that provide a clue to its elucidation.

研究分野：神経幹細胞

キーワード：オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

Post-traumatic stress disorder (PTSD)は強烈なショックやストレスにより引き起こされる障害で、罹患率は5-8%に上る。PTSDを罹患すると通常生活においても過去のショックやストレスが想起され、必要以上に恐怖や不安を感じるようになる。従って、PTSDは日常生活に困難を引き起こし、時には犯罪を誘発することから大きな社会問題となっている。これまでにPTSDの原因として記憶想起メカニズムの異常が提唱されているものの、その分子機構はほとんど不明なままであった。

PTSDを罹患すると一般的な環境とPTSDの原因となった特定の状況を過剰に関連付けてしまい、安全な状況下でも恐怖を感じるようになる。例えば火事を原因とするPTSD患者は焚火と火事の匂いについて火の規模や危険性などの「差別化」が出来ず、焚火に必要な以上の恐怖を感じるようになる。近年の研究の結果、脳の海馬歯状回で成体において産生されるニューロンが「差別化」に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。加えて、放射線照射などによるニューロン新生の抑制は「差別化」能力の低下をもたらし、抗不安薬の投与はニューロン新生を増加させることから、歯状回におけるニューロン新生のPTSDへの関与が示唆されている。

一方で、PTSD発症のメカニズムを網羅的に調べる為にPTSDの罹患と高い相関を持つ遺伝子変異を探すGenome-wide association study (GWAS)が行われて来た。変異の多くはタンパク質をコードしない領域にあり、GWASのみでのメカニズムの特定は難しい。そこで、BharadwajらはGWASで同定された変異と変異近傍にコードされる遺伝子の発現の相関を、死後脳を用いて調べた(Bharadwaj et al., J. Neurosci. Res., 2016)。その結果、PTSD罹患のリスクファクターとしてSLC18A2とPDZD8の二つの遺伝子が同定された。

PDZD8の機能はよくわかっていなかったが、申請者は最近PDZD8が小胞体とミトコンドリアの接触に必須であることを示した(Hirabayashi et al., Science, 2017)。加えて、PDZD8の発現パターンをin situ hybridizationにより調べたところ、特に歯状回においてPDZD8の強い発現が見られた(図1矢印)。

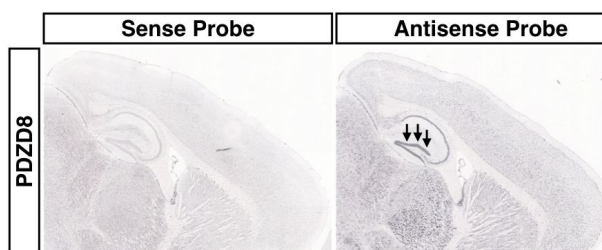


図1 大脑海馬歯状回におけるPDZD8の発現
成体マウスにおけるPDZD8の発現をin situ hybridizationにより調べたところPDZD8は海馬歯状回に強く発現していた(矢印)。Sense Probe (negative control), Antisense Probe (probe against PDZD8 mRNA)。

2. 研究の目的

多細胞生物においては小胞体-ミトコンドリア接触を制御する決定的な因子が発見されていなかったためこの分野の進捗は遅れていたが、この発見によりPDZD8を操作することで初めて哺乳類細胞における小胞体-ミトコンドリア接触の重要性を調べることが出来るようになった。そこで、本研究ではPDZD8を用いて小胞体-ミトコンドリア接触を操作すること、注目する特定の細胞の細胞内微細構造を、EMを用いて観察する方法(CoLSSEM法、Hirabayashi et al., Scientific Reports, 2018)を用いることにより、神経幹細胞の制御をオルガネラ接触の観点から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 成体神経幹細胞におけるPDZD8の発現と役割

休止状態の成体神経幹細胞からニューロンへの分化の際には急激な形態の変化などが起こる

為、神経幹細胞は大きく代謝状態を変化させなければならない。実際に胎生神経幹細胞のニューロン分化の際にはミトコンドリアの形態が大きく変化することが知られている。ミトコンドリア-小胞体接触はミトコンドリアの分裂及びミトコンドリアにおける効率的な ATP 産生に必須であることが強く示唆されていることから、PDZD8 によって制御されるミトコンドリア-小胞体接触が分化に際して起こる代謝状態のスイッチに必要である可能性が高いと考えた。そこでまず、PDZD8 が神経幹細胞からニューロンへの分化のどの段階で発現しているのかを *in vivo* における染色により調べた。申請者は PDZD8 座に LacZ レポーター遺伝子をノックインしたマウスを有しており、このレポーター遺伝子の発現と、神経幹細胞からニューロンへの分化のそれぞれの段階のマーカーとを共染色した。

次に神経幹細胞特異的に発現し Tamoxifen 依存的に活性化する GLAST-CreERT2 マウスを用い成体神経幹細胞特異的に PDZD8 をノックアウトし、PDZD8 の成体ニューロン新生における役割を検討した。

(2) 成体神経幹細胞の分化過程における小胞体-ミトコンドリア接触の観察と操作

成体の神経幹細胞からニューロン分化への過程の様々な段階におけるオルガネラの形態や接触を調べることを計画した。オルガネラの形態やミトコンドリアの内膜の量などを正確に記述するには電子顕微鏡による観察が必要であるが、これまで *in vivo* において細胞種を特定してその細胞の内部構造を観察することは非常に難しく、電子顕微鏡による組織観察は多くの場合組織内のランダムな細胞の観察に過ぎなかった。そこで申請者は、注目する特定の細胞の細胞内微細構造を、EM を用い観察する方法を開発した (CoLSSEM 法; Hirabayashi et al., *Scientific Reports*, 2018)。本研究ではこの方法を用い *in vivo* における特定の分化段階にある細胞における小胞体-ミトコンドリア接触の状態を調べることを目的とした。

(3) PTSD 発症における PDZD8 の発現と役割

PDZD8 が本当に PTSD 発症のリスクファクターなのかを成体神経幹細胞特異的に PDZD8 をノックアウトして調べるための準備をおこなった。

4. 研究成果

(1) 成体神経幹細胞における PDZD8 の発現と役割

本研究開始当初は、PDZD8 座に LacZ レポーター遺伝子をノックインしたマウスを用いて PDZD8 の発現パターンを決定することを試みた。しかしながら、LacZ レポーター遺伝子に対する染色は感度が十分でなく、我々は PDZD8 遺伝子座に HA タグをノックインしたマウスを新たに作成し、PDZD8 の発現パターンを検討した。その結果、PDZD8 は神経幹細胞の分化段階において特定の時期に強く発現する事を示唆する結果が得られた。また PDZD8 ノックアウトして、神経幹細胞の維持と分化について調べたところ、PDZD8 は大脳海馬の神経幹細胞において、適切な増殖と分化に必要であることがわかった。

(2) 成体神経幹細胞の分化過程における小胞体-ミトコンドリア接触の観察と操作

特定の細胞の種類に遺伝子コードされたタグを発現することで、その細胞の核を DAB 染色するシステムを開発した。これにより、細胞質構造は保存したまま、特定の細胞を電子顕微鏡下で同定し、観察することが可能になった。現在、遺伝コードしたタグをマウス内の特定の細胞に発現させたマウスを作成中である。

(3) PTSD 発症における PDZD8 の発現と役割

PDZD8 ノックアウトマウスを繁殖させ、行動実験に十分なマウスを確保することを試みた。しかし、途中でマウスの微生物感染が明らかになりクリーニングを経るなどして、実験が遅延した。現在十分な数が確保出来つつあり、今後このマウスを用いた行動実験を行う。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Rangaraju Vidhya, Lewis Tommy L., Hirabayashi Yusuke, Bergami Matteo, Motori Elisa, Cartoni Romain, Kwon Seok-Kyu, Courchet Julien	4. 巻 39
2. 論文標題 Pleiotropic Mitochondria: The Influence of Mitochondria on Neuronal Development and Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8200 ~ 8208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1157-19.2019	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11件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 シナプス前終末における小胞体-ミトコンドリア接触の役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平林 祐介, 櫻井 結衣, 菅 翔吾, 壺井 將史
2. 発表標題 小胞体 - ミトコンドリア接触の制御と役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Ultrastructural analyses of neurons in vivo using the correlative microscopy
3. 学会等名 ABiS Symposium Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Exploring the regulation of ER-mitochondria contact and its physiological roles
3. 学会等名 ExCELLS若手交流リトリート（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Exploring the regulation of ER-mitochondria contact and its physiological roles
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Roles of ER-mitochondria contacts in neurons
3. 学会等名 Frontiers in Neuronal Development and Physiology（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Exploring the regulation of ER-mitochondria contact and its physiological roles
3. 学会等名 KIST seminar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Exploring the regulation of ER-mitochondria contact and its physiological roles in neurons
3. 学会等名 生理学研究所シナプス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Exploring the regulation of ER-mitochondria contact and its physiological roles in neurons
3. 学会等名 Neuroscience 2019-Society for Neuroscience (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 小胞体局在タンパク質PDZD8による小胞体-ミトコンドリア繫留
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Correlated Light-Serial Scanning Electron Microscopy (CoLSSEM) for ultrastructural visualization of single neurons in vivo
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------