

令和 3 年 4 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23775

研究課題名（和文）新規エピゲノム編集技術を用いた脳内ストレス感受性制御のマルチスケール解析

研究課題名（英文）Multiscale analysis of stress susceptibility and resilience in mice

研究代表者

坂井 祐介（Sakai, Yusuke）

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：40843066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、精神疾患発病脆弱性に関わるストレス感受性の脳内メカニズムを解明することである。本研究の成果として、遺伝・環境相互作用に起因するうつモデルマウスの腹側海馬におけるカルシウム・カルモデュリン依存性キナーゼIIb遺伝子(Camk2b)の発現低下と、そのゲノム領域におけるエピジェネティクス修飾異常を見出した。Camk2b遺伝子上のDNAメチル化レベルが慢性ストレス負荷によって変化することを見出し、このエピゲノム修飾を正常化させるエピゲノム編集操作によって個体のレジリエンスを獲得できる技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病発症リスクとして遺伝・環境相互作用が知られているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、遺伝・環境相互作用に起因するうつ病モデルマウスを用いて、うつ様行動発現に関わる脳部位・原因分子の同定に成功した。さらに、エピゲノム編集技術の介入によって、ストレスレジリエンスの獲得や抗うつ作用を発揮することのできる制御法を開発することができた。これらの成果は、将来的にはストレス性精神疾患の構成的理解ならびに新たな治療法の確立につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the molecular mechanisms of stress susceptibility and depression. We used gene x environment animal model and measured mRNA levels of plasticity-related genes in the ventral hippocampus and found that Camk2b mRNA was down regulated in stress-susceptible mice, but not in stress-resilient mice. Camk2 overexpression drives stress resilience, whereas camk2 knockdown increased stress susceptibility in mice. Thus, camk2 function is essential for behavioral response to chronic stress. We also found altered DNA methylation at Camk2b gene promoter. When DNA methylation was ameliorated by epigenome editing technique, aberrant behaviors were rescued, suggesting a critical role of DNA methylation at Camk2b gene for stress susceptibility and resilience. We provide first evidence indicating that epigenome editing rescues aberrant behavior in mice.

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

近年の高ストレス社会を背景に、うつ病などの精神疾患患者数が急増している。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)。すなわち、うつ病患者はストレスに脆弱な生物学的素因を有し、外的ストレスに対して適応することができずに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)。しかしながら、いつ・どこで・どのようなメカニズムによってストレス脆弱性が形成されるかについては不明である。

現在までに、遺伝・環境相互作用に起因するストレス性精神疾患の発病脆弱性、特にストレス感受性とストレス耐性(レジリエンス)制御の解明に向けた生物学的基盤研究が行われている(3)。最近、ストレス感受性・レジリエンス形成に対するエピジェネティックな遺伝子発現調節の重要性が明らかとなりつつある。しかし、特定の遺伝子上のエピジェネティクス変容が、細胞・回路レベルに及ぼす影響とストレス感受性形成に対する役割は不明である。

本研究では、「ゲノム上の特定部位のエピジェネティクス修飾を操作することで神経可塑性やストレス感受性が変容するか?」という問いに対し、ゲノム領域特異的エピゲノム編集技術を創出することによってストレス感受性制御のメカニズムを多階層の視点から解明する。ストレス感受性マウスに認められる特定遺伝子上のエピゲノム異常を正常化させ、ストレス耐性マウスへと導く。得られた成果は、ストレス感受性のメカニズム解明にとどまらず、エピゲノム変容に関わる様々な疾患の予防・治療法の確立に対する波及効果も期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、精神疾患の発症に関わると想定されているストレス感受性の制御機構を分子-細胞-行動の多階層アプローチにより検討することで、ストレス性精神疾患の構成的理解をめざす。この目的達成のため、新規エピゲノム編集技術を用いて、精神疾患発病脆弱性に関わるストレス感受性の制御法を確立する。

申請者らは、遺伝・環境相互作用に起因するうつ病モデルマウスにおける Camk2b 遺伝子の発現低下と、Camk2b の機能獲得実験によるレジリエンス形成を確認している。また、Camk2b 遺伝子上の DNA メチル化異常を確認している。

そこで本研究では、Camk2b 遺伝子上のエピゲノム異常と行動変容との直接的な関連を検討するために、異常なエピゲノムを修復することが可能なエピゲノム編集操作によって、個体のストレス反応を制御可能かを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

8週齢の雄性 C57BL/6 (B6) マウスと BALB/c (BALB) 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

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。

### (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

マウスから腹側海馬を取り出し、総 RNA を抽出した。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) 特定ゲノム上の DNA メチル化修飾 (m6dA) を操作可能なエピゲノム編集技術の創出

dCas9 に m6dA メチル基転移酵素 (N6amt) を融合した dCas9-N6amt 発現マウスを作出し、このマウスの腹側海馬内に *Camk2b* プロモーター上の特定の領域を認識するガイド RNA を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を投与した。このマウスにおける *Camk2b* 発現量を定量解析したところ、コントロールマウスに比べて発現増加を確認した。

### (2) ストレス感受性制御に関わる候補遺伝子 *Camk2b* のエピゲノム編集操作を行った際に表出する細胞・可塑性・行動レベル (ストレス対処行動) への影響の解析

上記エピゲノム編集マウス (*Camk2b* 発現増大マウス) に慢性ストレスを負荷し、行動評価試験を行った。社会性試験の結果、エピゲノム編集マウスはコントロールマウスに比して社交性が高まっていた。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消失していた。これらの結果から、*Camk2b* 遺伝子のエピゲノム編集操作による *Camk2b* 発現増大はストレスレジリエンスを誘導することが示唆された。

本研究により、*Camk2b* 遺伝子のエピゲノム編集技術の確立 (DNA メチル化) とストレス対処行動における *Camk2b* の役割を解明できた。特に、エピゲノム変容と行動との因果関係を証明できた意義のある成果といえる。

### <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) 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.
- 3) Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Suzuki T, Miyata N, Watanabe Y. Epigenetic status of *Gdnf* in the ventral striatum determines

susceptibility and adaptation to daily stressful events. *Neuron*. 2011 Jan 27;69(2):359-72. doi: 10.1016/j.neuron.2010.12.023. PMID: 21262472.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井祐介、葛西秀俊、中山寿子、深谷昌弘、前田達也、中尾和貴、橋本浩一、阪上洋行、狩野方伸、饗場篤
2. 発表標題 mTORC1シグナル亢進による小脳プルキンエ細胞の細胞内ホメオスタシスの攪乱
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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
---------	---------