

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790865
 研究課題名（和文）：動物モデルによる双極性障害とミトコンドリアDNAの欠失蓄積に関する研究
 研究課題名（英文）：Research of the relationship between accumulation of mtDNA deletions and bipolar disorder in an animal model
 研究代表者
 福家 聡 (Fuke Satoshi)
 独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・研究員
 研究者番号：20422660

研究成果の概要（和文）：気分障害を併発する慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）の原因遺伝子の一つである、ミトコンドリアDNA（mtDNA）ポリメラーゼ（*PolgA*）に変異をもつ hetero ノックインマウスの脳と筋において、加齢とともに指数関数的な欠失 mtDNA の蓄積促進が観察された。脳と筋特異的な mtDNA 欠失蓄積は hetero マウスが CPEO モデルマウスとして妥当なことを示唆する。また、この hetero マウスは一般行動解析においては異常を示さなかったが他のモデルマウスと同様の行動の日内リズムに障害が見られ、脳での欠失 mtDNA が気分障害を引き起こす可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We found that exponential accumulation of mtDNAs deletions with ageing, but not mtDNA copy number per cell, are enhanced in muscles and the brains of heterozygous knock-in mice carrying a mutation (D257A) in mtDNA polymerase (*PolgA*), one of the causative genes of CPEO and related diseases, which often accompany mood disorder. Tissue-specific accumulation of mtDNA deletions suggests that *PolgA*^{+D257A} mice are suitable for an animal model of CPEO. *PolgA*^{+D257A} mice did not show behavioural changes by conventional behavioural test battery, but showed distorted day–night rhythm. This phenotype resembled the phenotype seen in the other line of mutant mice. There is possibility that accumulation of mtDNA deletions causes mood disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

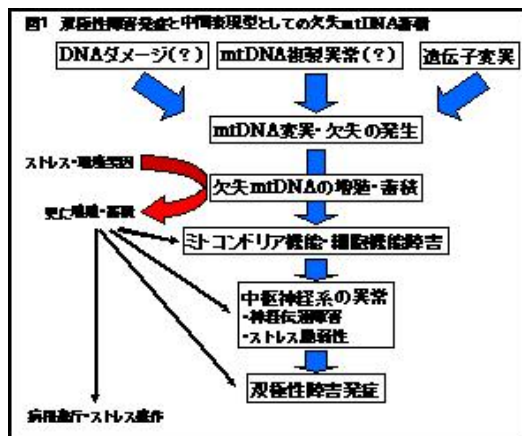
科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・精神神経科学

キーワード：mitochondria, bipolar disorder, mitochondrial polymerase γ , mitochondrial DNA (mtDNA), mtDNA deletion, ageing, behavioral activity rhythm, brain

1. 研究開始当初の背景

二大精神疾患である双極性障害（躁うつ病）や（大）うつ病の気分障害は罹患率が人口の約 1%と頻度が非常に高く、生涯の治療を要する重篤な精神疾患であると共に、その患者が年間 3 万人の自殺者の約半数を占めることから、社会的損失が大きい疾患であり、その解明と治療は社会的急務である。双極性障害は遺伝的な側面を持っていることが知られ、遺伝子多型との相関解析等の遺伝学的な研究が盛んに行われてきた。しかし、2007 年に Nature 誌に発表された 2000 人に及ぶ SNP チップを用いた大規模スクリーニングにおいて (WTCCC, Nature, 2007)、オッズ比 2 以上の特異的に強い相関を示す遺伝子変異は見出されず、双極性障害発症の原因は複数の候補遺伝子・変異あるいは弱いリスクファクターの集積によるものだと考えられる。

一方、ミトコンドリア病様の脳エネルギー代謝障害、脳内のミトコンドリア DNA (mtDNA) の欠失や細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達異常が双極性障害患者でみられることから、双極性障害とミトコンドリア機能との関わりが注目されている。また、欠失 mtDNA が蓄積することにより発症する、ミトコンドリア病の一つである慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO) 家系では、原因遺伝子として *POLG1*, *POLG2*, *ANT1*, *Twinkle* など、mtDNA 複製に関連する遺伝子変異が多く同定され、しばしば脳に mtDNA の多重欠失の蓄積や双極性障害・うつ症状の併発が見られることが知られている。



加えて、校正機能を欠いた変異 *Polg^{D181A}* を神経細胞特異的に発現する Tg マウスは、脳内で加齢に伴う mtDNA の変異・欠失の蓄積、双極性障害様の行動異常を示すこと (Kasahara et al., Mol. Psychiatry, 2006) から、その原因遺伝子や変異は多様であるにも関わらず、共通して観察される欠失 mtDNA の蓄積は気分障害の中間表現型である可能性が示唆される (図 1)。従って欠失 mtDNA の蓄積メカニズムを知ることは、双極性障害発症の分子機構の解明に重要である。

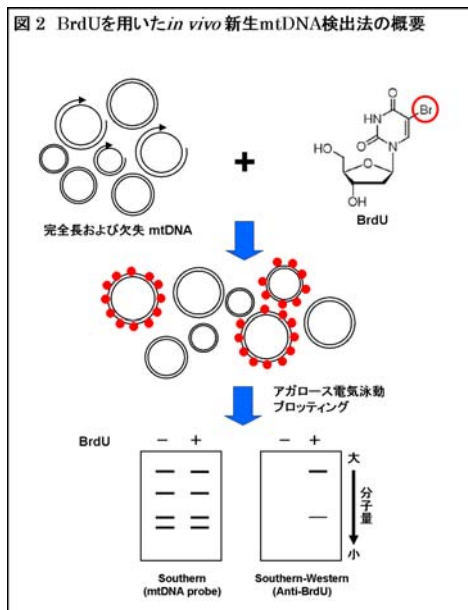
2. 研究の目的

興味深いことに、CPEO 患者の原因遺伝子の多くは全身で発現しているにも関わらず、その表現型は筋および神経系で特異的に見られる。mtDNA が細胞分裂や様々な刺激・環境に応答して分化後の細胞中で合成・分解が繰り返されているとするならば、神経や筋のような細胞が入れ替わりし難い組織では、一旦 mtDNA の欠失が発生し機能異常を起こした細胞が淘汰されないまま、欠失 mtDNA が複製・増幅されていく可能性が考えられる。双極性障害の発症において欠失 mtDNA の蓄積が深く関わっているのであれば、表現型の組織特異性や加齢や環境因に伴う双極性障害の病相進行、ストレスを受けた場合に更なるストレス脆弱性を生じる「感作」についても、欠失 mtDNA 蓄積の速度変化や蓄積量の変化によって、これらの現象を理解できると考えられる。つまり、欠失 mtDNA の蓄積様式や、その組織特異性を明らかにすることで、多様な原因で発症する双極性障害の共通した病因を理解し、それらをターゲットにした診断・予防法や治療法の確立に貢献すると考えられる。しかし、基本的には分裂しない神経細胞において、mtDNA がどの程度複製されているかはほとんど解っていない。従って、中枢神経系における mtDNA 複製の有無、ストレス・加齢や環境因の影響や、それらが持つ完全長 mtDNA と欠失 mtDNA の間の差異を知ることが必要である。よって、本研究では双極性障害の発症を『mtDNA 変異・欠失とミトコンドリア機能異常』という観点から中枢神経系における mtDNA 複製について詳細に調べると共に、疾患と欠失 mtDNA 蓄積との因果関係を明らかにし、先述の変異 *Polg^{D181A}* Tg マウスや変異 *Polg^{D257A}* knock-in マウスなどの動物モデルを中心に、双極性障害発症メカニズムの解明、治療・創薬研究への足がかりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

①BrdU を用いた in vivo 新生 mtDNA 検出法：BrdU は、DNA 複製時にアデニンと対合することで、チミジンアナログとして新たに合成された DNA 中に組み込まれる。多くの研究において、核ゲノム DNA に組み込まれた BrdU は、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学的手法によって、幹細胞の同定、特に神経新生の研究に広く使われてきた。しかしながら、mtDNA が複製されているならば、新生 mtDNA に取り込まれている BrdU を検出することで複製の有無が証明できると考えられる (図 2)。

更に、精製 mtDNA をアガロースゲルに電気泳動後、抗 BrdU 抗体による South-Western blotting 及び、その後の Southern blotting によって分子量に依存した分離・欠失の検出が可能であると同時に、BrdU の取り込み効率 (BrdU/mtDNA) を測定



することで、mtDNAの長さ依存的な複製速度を比較することができる。

②欠失mtDNAを蓄積する動物モデルを用いた解析：精神疾患の研究において、行動学的な解析を行える動物モデルの有用性は言うまでもなく、その表現型を指標とした薬理的な解析や病態について生体内の現象を、より直接的に理解することが可能である。現在までも遺伝子変異マウスにおける研究は多くの功績を残している。しかしながら、精神疾患研究においては、原因遺伝子やその変異が明確なものが少なく、動物モデルの妥当性が問題となる。しかしながら、本研究ではCPEOの原因遺伝子の一つであるmtDNA合成酵素POLG (polymerase γ) に変異をもつマウスを用いることで、双極性障害の中間表現型であると考えられる欠失mtDNAの蓄積を再現し、行動異常や神経機能と欠失mtDNAの蓄積との関係を明らかにすることは、双極性障害発症の直接的な病因の解明に役立つと考えられる。更に、個体レベルでのストレスや治療薬、様々な環境要因の欠失mtDNA蓄積と表現型に対する影響を検討することも可能である。

4. 研究成果

①中枢神経系におけるmtDNA複製の検討：mtDNAの変異・欠失の生成に重要な役割を果たすと考えられるmtDNA複製は、有糸分裂期以降の分化した神経細胞では行われないと考えられてきた。しかしながら、本研究における実験結果から、BrdUを用いた新生mtDNA検出法によって、adultマウスにおいても他の器官と同様に脳内で新たな全長mtDNAが合成行われていることや、マウス胎児の海馬初代培養において、BrdUシグナルがミトコンド

リアに局在することから、分化後の神経細胞でもmtDNA複製が行われていることが示唆された。

②*PolgA*^{D257A}ノックインマウスにおける脳と筋特異的な欠失mtDNA蓄積：CPEO家系の原因遺伝子として同定された*POLG1*遺伝子のマウスホモログである*PolgA*に変異を持つknock-inマウスにおいて、多重欠失mtDNAが検出可能な高感度サザンブロット解析により、homoでは脳をはじめ様々な器官で欠失mtDNAを蓄積するが、CPEO患者と同様heteroでは脳と心臓に特異的な蓄積を生じることを示唆する結果を得た。

更に、定量的real-time PCR法による欠失mtDNA蓄積量の解析を行った。野生型マウスとheteroマウスについて、それぞれ12、24、48、60、72、84、101週齢の欠失mtDNA量を調べたところ、野生型マウスでも見られる年齢依存的な欠失mtDNAの蓄積が、heteroマウスにおいては脳 (frontal lobe, other cortices, hippocampus, basal ganglia, cerebellum) と筋 (heart, skeletal muscle) において促進され、肝臓では促進が見られないというCPEO患者で見られる現象の再現を示唆する結果を得た。一方で細胞あたりのmtDNAコピー数や、mtDNA内の特定の領域における欠失については変化が見られないことから、多重欠失mtDNA特異的な現象であると考えられた。

③*PolgA*^{D257A}ノックインマウスの行動表現型：更に、欠失mtDNAが骨格筋への蓄積を示す以前の週齢において、heteroマウスは行動リズムの異常を示す個体が多く存在した。これらの行動リズム異常は、変異*Polg*^{D181A}を神経細胞特異的に発現するTgマウスにも見られ、気分安定薬であるリチウムや電気痙攣療法による改善が報告されていることから、気分障害様の行動表現型だと考えられる。また、一般行動解析では、他の行動異常 (記憶や情動、運動機能) を示さないことから、*PolgA*^{D257A}heteroマウス脳での欠失mtDNA異常蓄積が気分障害を引き起こす可能性があることが考えられた。一方、homoマウスにおいては、身体各部における欠失mtDNAが運動機能異常を引き起こしていることが示唆された。これらの結果から、気分障害発症においてミトコンドリア機能異常がリスクファクターの一つであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Satoshi Fuke, Mizue Kametani, Tadafumi Kato. Quantitative analysis of the 4977-bp common deletion of mitochondrial DNA in postmortem frontal cortex from patients with bipolar

disorder and schizophrenia. *Neuroscience Letters* 439 (2008) 172-177. 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

① Satoshi Fuke, Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of *Polg^{D257A}* knock-in mice. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月12日神奈川県

② 福家 聡 患者死後脳におけるミトコンドリアDNAの4977bp欠失定量解析 第27回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 2008年6月20日神奈川県

③ Satoshi Fuke, Detection of newly generated mitochondrial DNA in neurons using BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine). *Euromito* 7, 2008年6月12日 スウェーデン、ストックホルム

④ Satoshi Fuke, Quantitative analysis of accumulation of the 4977-bp common deletion of mitochondrial DNA in the postmortem brain from patients with bipolar disorder and schizophrenia. 2nd World Federation of Societies of Biological Psychiatry Asia-Pacific Congress 2008年9月12日富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福家 聡 (Fuke Satoshi)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・研究員

研究者番号：20422660