

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07962

研究課題名（和文）オートファジーを介したうつ病の分子機構解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Deficient Autophagy in Microglia Aggravates Repeated social defeat stress-induced social avoidance

研究代表者

俞 志前 (Yu, Zhiqian)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60451639

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）：日本でのうつ病の生涯罹患率が高く、抗うつ薬効果が得られない人における自殺率の増加が大きな社会問題となり、その病態メカニズムの解明は極めて重要である。本研究はストレス負荷のうつ病モデルマウスによる行動変化、および脳内の免疫担当細胞であるミクログリアにおけるオートファジーの関与を明らかにした。ストレス負荷したマウスの脳内における初期のオートファジーの活性が観察され、うつ病患者の死後脳の前頭前野においても同様な変動が見られた。さらに、オートファジーの制御因子である FKBP5 がストレス耐性群マウスの前頭前野で有意に増加し、新規抗うつ薬の開発につながる重要な生物学的プロセスを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の抗うつ薬の効果が現れるのに数週間がかかる。さらに、既存抗うつ薬の抵抗性も含めて画期的な治療薬の開発が強く求められている。本研究はうつ病モデル動物およびうつ病の死後脳検体を用い、前頭前野の免疫担当細胞である三枚における初期オートファジーの活性および制御因子の変動を見出し、新たな抗うつ薬開発の切口になると期待できる。さらに、本研究結果は、オートファジーを介したミクログリアとニューロンとの制御ネットワークを解明するための新しい戦略につながり、うつ病だけではなく、他の精神疾患、神経変性疾患、および免疫疾患などの研究にも大きく寄与し、臨床応用に向けた研究基盤を提供できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Repeated environmental stress is widely accepted to be involved in the pathogenesis of depression. Here, we used repeated social defeat (RSD) stress to analyze the transcripts of the autophagy-related gene (Atg) and protein levels of autophagosome markers in mouse prefrontal cortical (PFC) microglia under RSD stress. We found that RSD stress induced initial autophagic signals in the PFC. Similar results were confirmed in the postmortem PFC of patients with depression, which indicates that enhanced autophagic flux may alleviate stress-induced depression. Furthermore, we identified an early-stage autophagy regulator, FKBP5, significantly increased in resilient mice's PFC. In addition, the resilient mice exhibited enhanced autophagic flux in the prefrontal cortical microglia, and the autophagic deficiency in microglia aggravated RSD-induced social avoidance, indicating that microglial autophagy involves stress-induced behavioral changes.

研究分野：精神免疫学

キーワード：Autophagy Depression Microglia

1. 研究開始当初の背景

精神疾患の患者数は近年増加し続けており、日本では 2007 年から 2016 年までの重度および中等度の苦痛を示すうつ病の罹患率は 4.0% - 4.2% および 24.2% - 24.9% と示されている。その中、うつ病に伴う苦痛とともに、長期休務・休学、対人関係の悪化など、様々な悪影響をもたらすことが重大な社会問題となっている。さらに、うつ病は再発率が高く、長期化した場合は自殺の危険性も高くなることが知られている。うつ病のメカニズムはモノアミン仮説が提唱されており、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) に属する抗うつ薬が第一選択薬として広く使われている。しかし、抗うつ効果が現れるのに数週間がかかる。また、SSRI による寛解率は半数にも及ばず、SSRI が効かないうつ病も含めて、画期的な治療薬の開発が強く求められている (Kondo et al., 2017)。一方、オートファジーは損傷を受けた細胞小器官とタンパク質凝集体を除去するためのリソソーム分解プロセスであり、古くなった細胞成分をリサイクルし、中枢神経系の恒常性を維持するために極めて重要である (Ralph A Nixon; 2013)。特に、ニューロンはこれらの相互作用の破綻に対して脆弱であり、オートファジーを制御する遺伝子の変異により高頻度で神経変性疾患を引き起こすことが報告されている。アルツハイマー病 (Boland et al., 2008)、筋萎縮性側索硬化症 (Hetz et al., 2009)、家族性パーキンソン病 (Anglade et al., 1997) などの疾患では、オートファジー経路の様々な段階で異常が発生することにより発症に影響を及ぼす。近年、うつ病患者の末梢単球におけるオートファジー関連遺伝子 (LC3, ATG12, BECN1) の発現上昇が報告された (Alcocer-Gómez E et al; 2017)。mTOR キナーゼはオートファジーの誘導にとって決定的な調節因子であり、活性化された mTOR はオートファジーを抑制することが知られている。気分障害の患者において、末梢血 mTOR 遺伝子の発現減少が報告されている (Machado-Vieira R et al; 2015)。さらに、死後脳研究においても、うつ病患者の前頭前野における mTOR シグナルの抑制も報告されている (Jernigan CS et al; 2011)。また、動物実験では、様々な抗うつ薬がオートファジーの誘導タンパク質である Beclin 1 (ATG6) の発現上昇を促進することを示した (Nils C. Gassen et al; 2014)。しかし、オートファジーのうつ病に及ぼす影響およびその分子機構は解明されていない。

本研究の成果は、ストレス下の中枢神経系におけるオートファジー機構の解明および関連遺伝子の情報をデータベースとして提供でき、臨床応用に向けた研究基盤にも提供できるものと考えられる。さらに、本研究結果はオートファジー活性に起因するうつ病の病態解明への新しい戦略につながり、極めて重大な学術的価値があると考えられる。

2. 研究の目的

オートファジー活性のうつ病の病態形成に及ぼす影響、およびその分子機構を解明し、新規抗うつ薬開発を目指す。

3. 研究の方法

8-12 週齢の雄の C57BL/6J マウスに、10 分間/日の反復社会挫折ストレス (Repeated social defeat stress; RSD) を 10 日間負荷し、11 日目に社会接近行動テスト (Social interaction test) を実施し、RSD によるマウスの回避行動を評価して、その回避行動によってマウスをストレス脆弱群 (Susceptible; Sus) とストレス耐性群 (Resilient; Re) に分類した。さらに、12 日目以降、高架式十字迷路試験 (Elevated plus maze; EPM)、ショ糖嗜好性試験 (Sucrose preference test; SPT) を行い、不安様行動および無快感症状を評価した。行動試験終了後、マウスを安楽死させ、脳組織から前頭前野を抽出し、定量リアルタイム PCR 法で遺伝子発現変化を検討した。ミクログリアにおけるオートファジーの関与を検討するために、ミクログリア特異的に GFP を発現させた Cx3cr1GFP/+ マウスに RSD を負荷させ、前頭前野における LC3 タンパク質の発現変化を免疫染色法にて検討した。

また、うつ病患者の死後脳における遺伝子発現を検討するため、アメリカ国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information; NCBI) が提供した遺伝子発現情報データベース (Gene Expression Omnibus database) の GPL10526 データを対象に BRB-ArrayTools v4.6.0 Beta 1 ソフトウェア (<https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>) を用いて解析を行った。GPL10526 データセットからうつ病 (n=29) および健常者 (n=56) 前頭前野の遺伝子発現データ「.SOFT」および「.CEL」ファイルをダウンロードし、BRB-ArrayTools に読み取った後、全プローブのシグナル (Signal intensity; SI) を Quantile normalization 法を用いて標準化した。さらに、シグナル強度 (SI) が 50 より小さい遺伝子を除去した。うつ病患者のオートファジー関連遺伝子の SI 値を健常者と比較して Random variance t-test 29 を用いて有意差検定を行い、P value が 0.05 より小さい遺伝子を有意に変動した遺伝子と判断

した。

4. 研究成果

10日間のストレス曝露終了後の翌日11日目に、C57BL/6Jマウスに対してSIT、12日目にEPMを実施した。SPTは最終ストレス曝露日の4日後から6日後(14日目~16日目)に実施した。SITでは、対照群(Con; n = 7)と比べ、RSD負荷によって50%のマウスが脆弱性(Sus; 社交性スコア < 1; n = 7)および、もう半数のマウスがストレス耐性(Re; 社交性スコア > 1; n=7)を示した。SPTでは、対照群と比べてストレス脆弱群でのスクロース摂取量の有意な減少も確認した(P < 0.01)。一方、ストレス耐性群ではスクロース摂取量の減少が認められなかった。高架式十字迷路試験では、走行路に壁が設置されたclosed armに対して走行路には壁がないopen armでの滞在時間の短縮によって不安様行動が評価される。対照群に比べて、ストレス脆弱群(P < 0.01)およびストレス耐性群(P < 0.001)におけるopen armに滞在する時間の割合が有意に減少した。

行動試験終了後に、対照群、ストレス脆弱性群およびストレス耐性の脳から前頭前野を抽出した。前頭前野からmRNA抽出してオートリソソーム形成の各段階に必須なオートファジー関連遺伝子であるBecn1 (Atg6), Atg7, Atg5, Atg12, およびLC3の発現変動をreal-time PCRで検討した結果、対照群に比べてストレス脆弱性群(P < 0.01)およびストレス耐性群(P < 0.01)における隔離膜の形成および局在化を促進するAtg6遺伝子の有意な発現上昇を確認した(P < 0.01)。また、隔離膜の伸長を促進する「Atg12-Atg7」および「Atg12-Atg5」複合体に必要なAtg12遺伝子は、対照群に比べて脆弱性群(P < 0.01)および耐性群(P < 0.001)で有意な発現上昇を確認した。さらに、耐性群は脆弱性群に比べて有意な発現の上昇が確認された(P < 0.05)。また、対照群に比べてストレス脆弱性群(P < 0.01)およびストレス耐性群(P < 0.01)におけるAtg7遺伝子の有意な発現上昇を確認した。Atg5遺伝子では、ストレス耐性群における有意な発現上昇を確認した(P < 0.05)。オートファゴソームのマーカであるLC3遺伝子も同様に、対照群に比べてストレス脆弱性群(P < 0.05)およびストレス耐性群(P < 0.01)で有意な発現上昇を確認した。さらに、ストレス耐性群はストレス脆弱性群に比べてLC3遺伝子の有意な発現増加が確認された(P < 0.05)。一方、オートファジーの抑制因子であるmTORの遺伝子発現は定量PCRの検出限度以下であり、有意な変動は認められなかった。近年、グルココルチコイド受容体活性の抑制因子であるFK506結合タンパク質51(Fkbp5)がBecln1に結合することでオートファジーを誘導することが報告されている。さらに、Becln1依存的なオートファジーがニューロンへの保護作用を果たすことも報告されており、前頭前野におけるFkbp5遺伝子の発現変動をリアルタイムPCRで検討した。その結果、コントロール群と比べてストレス脆弱群(P < 0.05)およびストレス耐性群(P < 0.05)におけるFkbp5遺伝子の有意な発現増加が確認された。これらの結果から、ストレスによるFkbp5の増加がグルココルチコイド受容体活性を抑制することにより、オートファジーを活性化することでニューロンへの保護作用を示すことが示唆された。

さらに、マウスの前頭前野で有意な変動が認められたオートファジー関連遺伝子をうつ病患者死後脳の既存データを用いて確認した。NCBIが提供している遺伝子発現情報のデータベースからうつ病患者の前頭前野におけるmTOR, Atg6, Atg7, Atg5, Atg12, LC3, SQRTM1(p62)およびFKBP5のシグナルを抽出して健常者と比較した。その結果、マウスの前頭前野では確認されなかったオートファジー抑制因子であるmTORは、健常者と比べてうつ病患者での有意な発現減少が見られた(P < 0.05)。また、隔離膜の形成を誘導するATG6遺伝子の有意な発現増加がみられた(P < 0.001)。オートファゴソームの隔離膜伸長を促進する「ATG12-ATG7」および「ATG12-ATG5」複合体に必要なATG5(P < 0.05), ATG7(P < 0.01)およびATG12(P < 0.01)は、健常者に比べてうつ病患者における有意な増加が認められた。さらに、オートファゴソームのマーカであるLC3(P < 0.001)の有意な増加も確認した。一方、SQRTM1およびFKBP5は有意な発現変化がみられなかった。

ミクログリアにおけるオートファジーの関与を検討するために、ミクログリア特異的にGFPを発現させたCx3cr1GFP/+マウスにRSDを負荷させ、前頭前野におけるLC3B, p62およびFKBP5タンパク質の発現変化を免疫染色法にて検討した。その結果、対照群と比較し、耐性群の前頭前野全域におけるLC3BおよびFKBP5タンパク質の有意な発現増加(P < 0.01)およびミクログリアでのLC3タンパク質の有意な発現増加(P < 0.05)を確認した。p62タンパク質において、脆弱性群マウスは対照群および耐性群と比べて、前頭前野全域とミクログリアの両方で対有意に増加していた。これらの結果から、ストレス刺激に対する前頭前野全域およびミクログリアのオートファジー活性化が、うつ様行動を抑制すると示唆された。

上記の結果に基づいて、ストレス誘発性の回避行動におけるミクログリアのオートファジーの役割を明らかにするために、ミクログリア特異的 Atg7 欠損マウス (CX3CR1-Cre⁺;Atg7^{flox/flox}) を用いて検討した。Cre 非発現マウス (Cre⁻) と比較して、欠損マウス (Cre⁺) では有意に回避行動を増加していた。一方、EPM および SPT では、Cre 非発現マウス (Cre⁻) および欠損マウス (Cre⁺) マウスの両方で、それぞれの対照群と比較して、オープンアームでの滞在時間が減少し、シヨ糖摂取量も同様に減少した。したがって、ミクログリア特異的 Atg7 の欠損は、RSD 曝露後の EPT および SPT には影響しなかった。これらの結果から、慢性ストレス誘発性の回避行動においてミクログリアのオートファジーが選択的に働くことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sakai Mai, Yu Zhiqian, Hirayama Ryo, Nakasato Masa, Kikuchi Yoshie, Ono Chiaki, Komatsu Hiroshi, Nakanishi Miharuru, Yoshii Hatsumi, Stellwagen David, Furuyashiki Tomoyuki, Komatsu Masaaki, Tomita Hiroaki	4. 巻 2022
2. 論文標題 Deficient Autophagy in Microglia Aggravates Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Plasticity	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2022/7503553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 兪志前、平山凌、坂井舞、佐藤志保、富田博秋
2. 発表標題 オートファジー機構がうつ病発症メカニズムに及ぼす影響
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平山 凌, 兪 志前, 坂井 舞, 佐藤 志保, 富田 博秋.
2. 発表標題 オートファジーを介したうつ病発症メカニズムの解明.
3. 学会等名 NPBPPP2020合同年会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zhou Yuan, 兪 志前, 坂井 舞, 富田博秋.
2. 発表標題 オートファジー制御に着目したうつ病発症機構の性差の解明.
3. 学会等名 NPBPPP2020合同年会.
4. 発表年 2020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
研究協力者	富田 博秋 (Tomita Hiroaki)	東北大学 (11301)	

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