

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K13749

研究課題名（和文）心理・社会的ストレスへの感受性を制御する脳内メカニズムのマルチスケール解析

研究課題名（英文）Mechanisms of stress resilience and susceptibility

研究代表者

坂井 祐介（Sakai, Yusuke）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任助教

研究者番号：40843066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、心理・社会ストレスに対する感受性制御の脳内メカニズムをエピゲノム・分子・細胞・行動のマルチスケール解析により解明することである。本研究から、心理社会ストレス依存的なエピゲノム修飾による遺伝子発現制御が神経可塑性に関わる標的タンパク質の局在制御に重要であること、また、うつ病態におけるエピゲノム修飾の重要性が示唆された。これまで不明であった心理ストレス反応に対するエピゲノム修飾と行動との因果関係ならびその間を埋める分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心理ストレスが及ぼす脳内適応機構の理解を深化させるため、「特定のゲノム上のエピゲノム修飾の操作によりストレス適応が変容するか」との問いを設定した。申請者が確立した新規エピゲノム編集技術を用いて、ストレス感受性制御のメカニズムをエピゲノム・分子・細胞・行動の多階層の視点から解明する。この学術的問いに答えることは、ストレス適応機構に対する心理生物学的基盤としてのエピゲノム修飾の理解につながる。成果として、環境ストレスによるエピゲノム修飾が神経可塑性に重要であることが示唆された。これまで不明であった心理的ストレス反応に対するエピゲノム修飾と行動との因果関係ならびその間を埋める分子機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the brain mechanisms of sensitivity control to psychological and social stress through a multiscale analysis of epigenomics, molecular biology, cellular biology, and behavior. The study demonstrates the importance of gene expression control by stress-dependent epigenetic modifications in regulating the localization of target proteins involved in neural plasticity, and suggests the significance of epigenetic modifications in depression. The study revealed the previously unknown causal relationship and molecular mechanisms between epigenetic modifications in response to psychological stress and behavior. By developing control methods that can acquire stress resilience and exhibit antidepressant effects, this study contributes to a comprehensive understanding of mental illnesses caused by psychological and social stress and the establishment of new therapies.

研究分野：神経科学

キーワード：ストレス レジリエンス うつ病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心理・社会ストレスはうつ病の主要なリスク要因として知られている。うつ病はストレス適応機構の構成要素の1つと想定される神経可塑性が障害されて発症に至ると考えられている。すなわち、「うつ病患者は素因としてストレスに対する脆弱性を有し、慢性的なストレス暴露により神経可塑性異常を引き起こすことでうつ状態に陥る」というストレス脆弱性仮説である。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(1-3)。

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。エピジェネティクスとは、環境の影響を細胞内に“記憶”して遺伝子の働きに変換する仕組みであり、心理ストレスに対する応答や精神疾患発病脆弱性や病態との関連が示唆されている(4)。しかし、心理ストレスに対する脳内適応メカニズムとエピゲノム修飾の因果関係、ならびに特定のエピゲノム変容が、その上位階層(細胞・行動)に及ぼす影響は不明である。

### 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、申請者が新たに開発した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。

我々がストレス感受性マウスにおいて既に見出しているカルシウム・カルモデュリン依存性キナーゼ II 遺伝子(Camk2b)上のエピゲノム異常を正常化させ、細胞レベル・行動レベルの検討を行い、ストレス耐性マウスとなるかを検証する。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・治療法の確立につながる波及効果も期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス

8週齢の雄性・雌性 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

オスマウスに軽度慢性社会性敗北ストレス(smSDS)を負荷した(5,6)。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。メスマウスに対しては慢性予測不能ストレスを3週間負荷した。

#### (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

マウスから内側前頭前野領域を取り出し、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) エピゲノム修飾によるストレス応答変容の解析

心理・社会ストレスに対する感受性制御の脳内メカニズムをエピゲノム・分子・細胞・行動のマルチスケール解析により解明することである。我々が開発した任意のカルシウムカルモデュリン依存性キナーゼ (Camk2b) 遺伝子領域のエピジェネティクス異常を修復させることが可能なエピゲノム編集技術を用いて、ストレス感受性マウスにおけるエピゲノム異常の修復が分子細胞 行動レベルといった上位階層に及ぼす影響をマルチスケールで検討した。ストレス脆弱性を有する個体がエピゲノム編集によりストレス耐性を獲得すること、ならびにそのメカニズムを検証した。成果として、dSaCas9 に m6dA メチル基転移酵素 (N6amt) を融合した dSaCas9-N6amt タンパク質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。このウイルスを投与した BALB マウスに心理・社会ストレス (社会性敗北ストレス) を負荷し、脳内 Camk2b 遺伝子発現量を検討することで dSaCas9-N6amt の効果を確認した。また、不安レベル・社会行動・アンヘドニア・意欲等の行動学的解析を行うことでストレスレジリエンスを獲得したかを検証した。

本実験により、特定のゲノム領域を狙った DNA メチル化修飾 (m6dA) の操作が可能となることが示され、Camk2b 遺伝子のエピゲノム変容がストレス誘発性の行動変容を引き起こすことを示すことができた。

#### (2) 分子細胞メカニズム解析

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・行動レベル (ストレス対処行動) への影響を解析した。上記分子技術を用いた Camk2b のエピゲノム操作による AMPA 受容体局在に対する影響を検討した。ストレス負荷マウスはシナプス膜上の AMPA 受容体発現量が低下していたが、m6dA エピゲノム操作によりこの AMPA 受容体異常をブロックすることができた。また、上記分子技術を用いた Camk2b のエピゲノム操作による神経細胞スパインに対する影響を検討した結果、ストレス負荷マウスはスパイン密度低下を示すが、m6dA エピゲノム操作により構造的可塑性異常をブロックすることができた。

本実験の特定のゲノム領域を狙った DNA メチル化修飾 (m6dA) の操作がその上位階層 (細胞レベル) に及ぼす影響が明らかとなり、ストレス感受性制御の構成的理解につながる。これまで不明であった心理ストレス反応に対するエピゲノム修飾の直接的な役割と行動との因果関係を明らかにする。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の開発により、心理・社会ストレスに起因する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。

<引用文献>

1. 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.
2. Hultman R, Ulrich K, Sachs BD, Blount C, Carlson DE, Ndubuizu N, Bagot RC, Parise EM, Vu MT, Gallagher NM, Wang J, Silva AJ, Deisseroth K, Mague SD, Caron MG, Nestler EJ, Carin L, Dzirasa K. Brain-wide Electrical Spatiotemporal Dynamics Encode Depression Vulnerability. *Cell*. 2018 Mar 22;173(1):166-180.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.012. PMID: 29502969; PMCID: PMC6005365.
3. Anacker C, Luna VM, Stevens GS, Millette A, Shores R, Jimenez JC, Chen B, Hen R. Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature*. 2018 Jul;559(7712):98-102. doi: 10.1038/s41586-018-0262-4. Epub 2018 Jun 27. PMID: 29950730; PMCID: PMC6118212.
4. Nestler EJ. Epigenetics: Stress makes its molecular mark. *Nature*. 2012 Oct 11;490(7419):171-2. doi: 10.1038/490171a. PMID: 23060173; PMCID: PMC4858713.
5. Funayama Y, Li H, Ishimori E, Kawatake-Kuno A, Inaba H, Yamagata H, Seki T, Nakagawa S, Watanabe Y, Murai T, Oishi N, Uchida S. Antidepressant Response and Stress Resilience Are Promoted by CART Peptides in GABAergic Neurons of the Anterior Cingulate Cortex. *Biol Psychiatry Glob Open Sci*. 2022 Jan 17;3(1):87-98. doi: 10.1016/j.bpsgos.2021.12.009. PMID: 36712563; PMCID: PMC9874166.
6. Inaba H, Li H, Kawatake-Kuno A, Dewa KI, Nagai J, Oishi N, Murai T, Uchida S. GPCR-mediated calcium and cAMP signaling determines psychosocial stress susceptibility and resiliency. *Sci Adv*. 2023 Apr 5;9(14):eade5397. doi: 10.1126/sciadv.ade5397. Epub 2023 Apr 5. PMID: 37018397; PMCID: PMC10075968.

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 Yusuke, Li Haiyan, Inaba Hiromichi, Funayama Yuki, Ishimori Erina, Kawatake-Kuno Ayako, Yamagata Hiroataka, Seki Tomoe, Hobara Teruyuki, Nakagawa Shin, Watanabe Yoshifumi, Tomita Susumu, Murai Toshiya, Uchida Shusaku	4. 巻 24
2. 論文標題 Gene-environment interactions mediate stress susceptibility and resilience through the CaMKII/TARP -8/AMPA pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102504 - 102504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102504	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0件

〔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
---------	---------