

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430008

研究課題名(和文) うつ病の行動異常及び睡眠障害に共通した神経回路病態の解明

研究課題名(英文) Pathophysiology underlying depressive-like behaviors and sleep disturbance

研究代表者

相澤 秀紀 (Aizawa, Hidenori)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：80391837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、手綱核活性化がうつ病様行動や睡眠障害に与える影響を調べるため、グルタミン酸代謝の鍵分子であるGLT-1の手綱核特異的ノックアウトマウスを作成して問題に取り組んだ。実験結果によるとノックアウトマウスは手綱核神経細胞の発火率が対照群と比較して有意に上昇しており、尾懸垂試験、社会回避行動試験でうつ病様行動異常を引き起こしていた。また、ノックアウトマウスではレム睡眠の脱抑制が観察され、うつ病に特長的なレム睡眠障害を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We examined the activity of neurons in habenular pathways and performed behavioral and sleep analyses in mice with pharmacological and genetic inhibition of the activity of the glial glutamate transporter GLT-1 in the LHb. The habenula-specific inhibition of GLT-1 increased the neuronal firing rate and the level of c-Fos expression in the LHb. Mice with reduced GLT-1 activity in the habenula exhibited a depressive-like phenotype in the tail suspension and novelty-suppressed feeding tests. These animals also displayed increased susceptibility to chronic stress, displaying more frequent avoidant behavior without affecting locomotor activity in the open-field test. Intriguingly, the mice showed disinhibition of rapid eye movement sleep, which is a characteristic sleep pattern in patients with depression. These results provide evidence that disrupting glutamate clearance in habenular astrocytes increases neuronal excitability and depressive-like phenotypes in behaviors and sleep.

研究分野：神経解剖学、神経生理学

キーワード：うつ病 睡眠 モノアミン 手綱核

1. 研究開始当初の背景

うつ病患者の約90%は活動性の低下や食欲低下等の行動上の障害に加えて、睡眠障害を訴える。哺乳動物の睡眠はレム睡眠及びノンレム睡眠を周期的に繰り返すが、うつ病における睡眠障害では、レム睡眠時間の延長及び入眠からレム睡眠までの潜時が延長するという特徴的な睡眠パターンが繰り返し報告されており、うつ病のエンドフェノタイプとして近年注目を集めている。このような高い合併率及び特徴的睡眠パターンにも関わらず、うつ病における睡眠障害が多様な精神疾患の原因もしくは結果なのか、共通した神経機構により引き起こされるものかは未だ不明なままである。

外側手綱核は進化的に保存された前脳と中脳を結ぶ神経核であり (Aizawa et al., *Curr Biol*, 2005; Amo and Aizawa et al., *J Neurosci*, 2010)、セロトニンやドーパミンなどのモノアミン神経系の制御中枢として知られる (Aizawa et al., *Front Neurosci*, 2011)。我々は、げっ歯類及び魚類を用いた研究から手綱核の発達機構 (Aizawa et al., *Dev Cell*, 2007) や恐怖情動行動発現における役割について明らかにしてきた (Agetsuma, Aizawa et al., *Nat Neurosci*, 2010)。

このような背景のもと、最近外側手綱核がストレスや嫌悪刺激に反応して活性化することやうつ病患者やうつ病モデル動物において手綱核の病的活性化が報告されており、外側手綱核の過剰興奮はうつ病の責任病巣として急速に注目を集めている (Aizawa et al., *Front Neurosci*, 2011)。しかし、手綱核過剰活性化と多様なうつ病様症状の因果関係や手綱核が動物行動を制御する機構については未解明のままである。

最近我々は、外側手綱核が全般的脳活動に与える影響を明らかにするため、行動及び睡眠中のラット脳活動を電気生理学的に記録した。その結果、外側手綱核を破壊したラットは、一睡眠周期あたりのレム睡眠時間が短縮することで総レム睡眠時間が減少していた。また、外側手綱核神経細胞は、動物がレム睡眠に入ると同期して活動し始め、レム睡眠に特徴的な海馬シータ波と協調して活動する事から、外側手綱核における同期活動がレム睡眠の安定的維持に必須である事が明らかとなった (Aizawa et al., *J Neurosci*, 2013)。

このように最近の研究結果は外側手綱核の行動制御及び睡眠制御の両方における役割を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、仮説「過剰活性化した外側手綱核がモノアミン神経系の抑制を介してうつ病様行動障害及びレム睡眠障害を引き起こす」を検証するため、手綱核特異的なグルタミン酸輸送体の遺伝子欠損マウスを作成し、うつ病様行動及び睡眠パターンに与える影響を明らかにする事である。本研

究では以下の研究項目を通じてこの問題を検討した。

- 1) 手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスを作成し、慢性的な GLT1 機能阻害を行うことで、長期的な手綱核過剰活性化を引き起こす。
- 2) このようにして作成したマウスのうつ病様行動異常を尾懸垂試験や Novelty-suppressed feeding、シヨ糖嗜好性試験を用いて検討する。
- 3) 表面脳波及び頸部筋電図を自由行動下で連続測定することによりマウスの睡眠ステージを調べ、手綱核過剰活性化とうつ病患者に特徴的なレム睡眠亢進の因果関係について検討する。

3. 研究の方法

- 1) 手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスの作成及び手綱核神経細胞の興奮性変化

手綱核の過剰活性化を引き起こすため、GLT-1 条件的欠損マウス (GLT-1^{flox/flox}) の手綱核に Cre 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを注入し、手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスを作成した。AAV ベクターによる遺伝子導入では、アストロサイトに発現する GLT-1 を欠損させるため、アストロサイト特異的 GFAP プロモータを用いた。また、AAV は血清型により異なった感染細胞種特異性もつため (Ortinski et al., *Nat Neurosci*, 2010)、アストロサイトへ指向性のある 5 型及び 8 型のカプシドを持つ AAV を使用した。

このようにして作成するマウスの手綱核神経細胞の興奮性変化を調べるため、麻酔下においてユニット記録を行い手綱核神経細胞の自発発火率や発火パターンを指標に検討した。また、急性ストレス下の手綱核 c-Fos 陽性細胞数を計測し、活性化の指標として評価した。

- 2) 手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスのうつ病様行動異常の解析

上記の遺伝子操作による外側手綱核の慢性的活性化が行動に与える影響を明らかにするため、①ホームケージ行動量測定、②オープンフィールド試験、③Novelty-suppressed feeding 試験、④尾懸垂試験、⑤強制水泳試験を行った。侵襲性の高い試験は後の動物行動に与える影響が大きいので、侵襲性の低い試験から施行した。また、うつ病関連行動試験である尾懸垂試験や強制水泳試験、Novelty-suppressed feeding 試験では抗うつ薬の急性及び慢性投与の効果が知られているため、観察される行動がこれらの抗うつ薬により改善するかを検討した。

- 3) 手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスのうつ病様睡眠障害の解析

上記の遺伝子操作による手綱核の慢性的活性化が睡眠に与える影響を明らかにするため、電気生理学的手法により覚醒、ノンレム睡眠及びレム睡眠の各睡眠ステージの長さ及び出

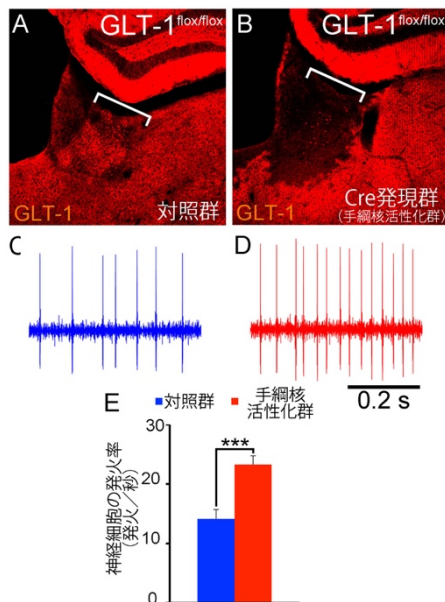
現頻度を測定した。具体的にはマウス頭蓋及び僧帽筋に電極を設置し、自由行動下で48時間にわたり表面脳波及び頸部筋電図を測定した。得られた信号情報をもとに、独自に開発した解析プログラムにより各睡眠・覚醒ステージへと分類した (Aizawa et al., J Neurosci, 2013)。

うつ病患者ではレム睡眠の時間延長や入眠からレム睡眠出現までの潜時短縮がみられ、レム睡眠の脱抑制が示唆されている (Hasler et al., 2004; Steiger and Kimura, 2010)。上記の遺伝子操作による手綱核の慢性的活性化がレム睡眠に与える影響を調べるため、本睡眠解析で得られるレム睡眠時間及びレム睡眠潜時を計算し、対照群と比較して有意に変化するか検討した。

4. 研究成果

1) 手綱核過剰活性化マウスの作成

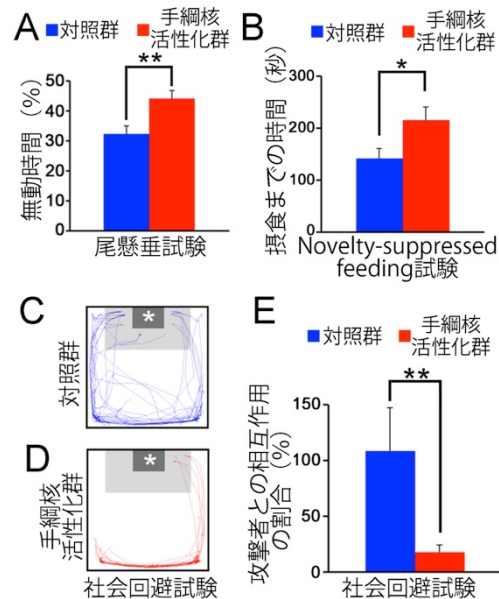
手綱核への遺伝子導入を行うため、アストロサイト特異的に Cre を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV-GFAP:EGFP-Cre) を新たに開発した。手綱核の興奮性神経伝達はグルタミン酸を介しており、細胞外グルタミン酸制御因子である GLT-1 の機能を抑制することは、シナプスグルタミン酸濃度を上昇させ脳局所の興奮性を増加させる。手綱核の興奮性が増加したマウスを作成するため、同ウイルスを脳定位的に GLT-1^{flox/flox} 手綱核へ注入したところ、約4週間後に GLT-1 蛋白質の減少を免疫組織学的に確認できた (下図 A、B)。また、このように GLT-1 を手綱核でのみ欠損したマウスの手綱核神経活動を電気生理学的に測定したところ、EGFP のみを発現する対照群と比較して手綱核神経細胞の発火率が有意に上昇しており、手綱核が過剰興奮の状態にある事を見出した (下図 C、D、E)。手綱核における神経細胞の過剰な活性化は、尾懸垂試験後における神経細胞活性化マーカー蛋白 c-Fos の発現上昇によっても確認された。



2) 手綱核過剰活性化がストレス下の動物行動に与える影響

このようにして作製した手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスの行動の変化をストレス下においてさらに検討した。手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスは対照群マウスと比較して、尾懸垂試験における絶望状態 (下図 A) や Novelty-suppressed feeding 試験における不安様行動 (下図 B)、などを正常なマウスと比べてより頻繁に示す事から、うつ病の症状に似た行動異常が窺われた。また、慢性的な社会敗北ストレス後の行動を社会回避行動において検討したところ、手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスは、攻撃者に対してめったに相互作用せず (下図 C、D)、より短い相互作用時間を示すことが明らかとなった (下図 E)。この事実は、手綱核神経回路の機能異常により、ストレス感受性が亢進した事を示している。

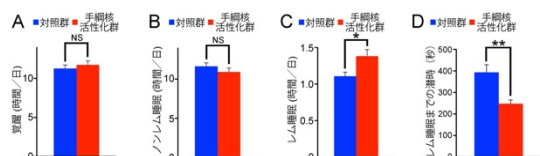
興味深いことに、これらのマウスは攻撃者の居ないところでは対照群と同様の移動量を示していることから、遺伝子改変による行動変化は、ストレス下の行動に特異的なものと考えられる。



3) 手綱核過剰活性化による睡眠異常の発現

我々によるこれまでの研究により外側手綱核はセロトニン神経系を介してレム睡眠の安定化に寄与することが明らかとなっている。手綱核の過剰活性化がレム睡眠に与える影響を調べるため、手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスの脳波及び筋電図を48時間にわたり測定し、解析した。実験の結果、手綱核特異的 GLT-1 欠損マウスは総睡眠時間におけるレム睡眠の割合が対照群と比較して有意に上昇しており、睡眠開始からレム睡眠に移行するまでの潜時が有意に短縮していた (次頁図 C、D)。一方、覚醒やノンレム睡眠の時間は手綱核特異的 GLT-1 欠損マウス群と対照群の間で差は見られず、睡眠の変化はレム睡眠特異的に生じている可

能性を示唆している（下図 A、B）。



これらの研究結果は、手綱核の病的活性化がセロトニンやドーパミンなどの脳内モノアミンの代謝不全を引き起こし、絶望状態や不安、ストレス感受性のみならず、うつ病に特異的な睡眠障害の原因となり得る可能性を示唆している。

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 3 件）

1. Aida T, Nakade S, Sakuma T, Izu Y, Oishi A, Mochida K, Ishikubo H, Usami T, Aizawa H, Yamamoto T, Tanaka K. (2016) Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. BMC Genomics, 査読有、17:979、DOI: 10.1186/s12864-016-3331-9
2. Ishizu N, Yui D, Hebisawa A, Aizawa H, Cui W, Fujita Y, Hashimoto K, Ajioka I, Mizusawa H, Yokota T, Watase K. (2016) Impaired striatal dopamine release in homozygous Vps35 D620N knock-in mice. Hum Mol Genet, 査読有、25:4507-4517, DOI:10.1093/hmg/ddw279
3. Cui W, Mizukami H, Yanagisawa M, Aida T, Nomura M, Isomura Y, Takayanagi R, Ozawa K, Tanaka K, Aizawa H (2014) Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance. J Neurosci, 査読有、34:16273–16285、DOI:10.1523/JNEUROSCI.1465-14.2014

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Aizawa H. Role of the habenula in murine stress-coping behaviors. Lateral habenula under the spotlight, 6th June, 2016, Paris (France)
2. 相澤秀紀 ゲノム編集によるマウス成体脳の遺伝子改変、第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 21 日、横浜
3. 相澤秀紀 ストレス感受性におけるモノアミン制御経路の役割、第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会、2016 年 9 月 10 日、福岡
4. 相澤秀紀 グルタミン酸トランスポータのうつ病様行動における役割、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 13 日、横浜
5. 相澤秀紀 Ontogeny and phylogeny of the habenula regulating animal behaviors., 日本動物学会第 85 回仙台大会、2014 年 9 月 12 日、仙台

6. 相澤秀紀 うつ病様行動異常と睡眠障害における手綱核活動異常の役割、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学大会合同年会、2014 年 9 月 30 日、奈良

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/neurobio>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 秀紀 (AIZAWA, Hidenori)
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号 80391837

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()