

研究課題名 「うつ病における神経幹細胞特異的な遺伝子発現異常の解析」

研究代表者： 鹿内 浩樹 (薬学部 薬理学講座 臨床薬理毒理学)  
研究分担者： 泉 剛 (薬学部 薬理学講座 臨床薬理毒理学)  
寺崎 将 (薬学部 衛生薬学講座 環境衛生学)

### 【背景】

うつ病は自殺や就業不能の主要な原因であり、大きな社会問題である。従って、うつ病の疾患病態生理解明に向けた基礎研究には、時代的に大きなニーズが存在する。

当研究グループは、生後 3 週齢のラットに嫌悪ストレスを反復負荷することによって作製されるうつ病モデルラット(幼若期ストレスモデル: 3 weeks foot shock, 3wFS)を用いて、うつ病の病態解明を目指した医学・薬学基礎研究を進めている。このモデル動物は成体 (10 週齢) でうつ様行動 (強制水泳試験で無動時間延長) を示す。この行動はストレス負荷後の抗うつ薬反復投与で拮抗されることから、高い薬理的妥当性を示すモデル動物であると言える。

躁うつ病治療薬である炭酸リチウムがグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3(glycogen synthase kinase 3 $\beta$ : GSK3 $\beta$ )を阻害することから、気分障害と GSK3 $\beta$  の関連が見出された。GSK3 $\beta$  はその下流で  $\beta$ -catenin の分解を促進する作用を有している。GSK3 $\beta$  と  $\beta$ -catenin が前頭皮質と海馬において作用することで、うつ様行動を制御する報告がなされている。我々は、3wFS の海馬における GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin のシグナル異常を見出した(in preparation)。 $\beta$ -catenin は核内に移行してがん関連遺伝子や細胞寿命を決定づけるテロメアの伸長酵素テロメラーゼの転写を活性化することが知られているが、中枢神経領域においては細胞の分化や神経新生を誘導すると考えられている。

我々のこれまでの実験手法では、海馬組織内のすべての細胞を採取して GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin シグナルを解析したため、細胞種特異的な変化は検討できていない。うつ病の発症仮説として古くから「モノアミン仮説」が提唱されてきたが、近年では海馬において神経新生が障害されることがうつ病発症の要因である、という「うつ病の神経新生仮説」が提唱されている。神経細胞は発生初期に増殖し、中枢神経系を形成した後は再生・分裂することがないと長らく考えられてきた。しかし 1998 年、Eriksson らは海馬においては神経新生が起こることを報告した。さらに近年、成体マウスに対し反復ストレスを負荷にすることにより海馬歯状回における臭素化デオキシウリジン (BrdU)陽性細胞(神経前駆細胞)が減少することが報告された。これは神経幹細胞がストレスに対して何らかの反応を示し、神経幹細胞から神経前駆細胞への分化・成長が阻害されたことを示唆する所見である。この現象がうつ病の発症に関与している、というのが「うつ病の神経新生仮説」である。

### 【目的】

以上の所見から、我々が明らかにした海馬内 GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin シグナルの異常は、“神経幹細胞内で特異的に”生じている可能性を考えた。この仮説を検証するために、まず本研究課題では 3wFS の海馬における神経幹細胞の発現変化を観察、検証した。

【研究方法】

生後 3 週齢の雄性 Wistar/ST ラットに嫌悪ストレスを 5 日間反復負荷することによりうつ病モデル動物 (3wFS) を作製した。この動物が 10 週齢時に 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行い、脳サンプルを作製した。免疫染色用には海馬を含む厚さ 30 μm の凍結冠状断切片を用いた。

海馬における神経新生の過程は、主に歯状回 (dentate gyrus, DG) において行われる。神経幹細胞からスタートし、前駆細胞、新生細胞を経て、神経細胞へと成熟していく (Fig.1)。我々は先行研究として、神経新生細胞のマーカーである doublecortin を用いた形態解析を行ったが、対照群と 3wFS 群の間で発現様式に有意な差は認められなかった。そのため、新生細胞よりも未成熟な段階である幹細胞に焦点を当て、神経幹細胞マーカーである Notch1 と Musashi1 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色による形態解析を行った。

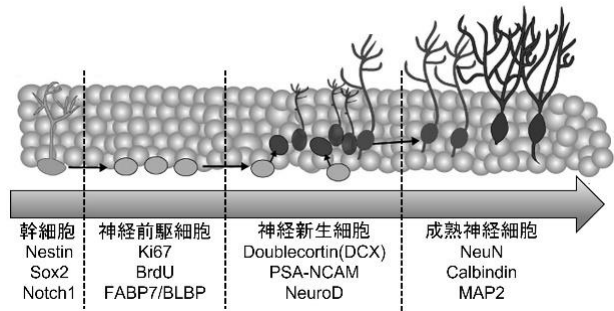


Fig.1 海馬歯状回 (DG) における神経新生の過程と代表的な神経新生マーカー。

【結果】

Fig.2 に、海馬全体の脳地図 (Fig.2 左) と、Notch1 と Musashi1 抗体を用いた単染色の顕微鏡画像 (Fig.2 右) を示す。Control 群に比較して 3wFS 群では、Notch1 陽性細胞発現数が増加している傾向が認められた。同様に Musashi1 陽性細胞についても同様の結果となった。

これは幼若期にストレス曝露されると、成長後の海馬において神経幹細胞が増加する可能性を示唆しており、一見すると「うつ病の神経新生仮説」に反する結果に見える。なお、Notch1 と Musashi1 の二重染色については、抗体の動物種が同一のものしか用意できなかったため実施出来なかった。

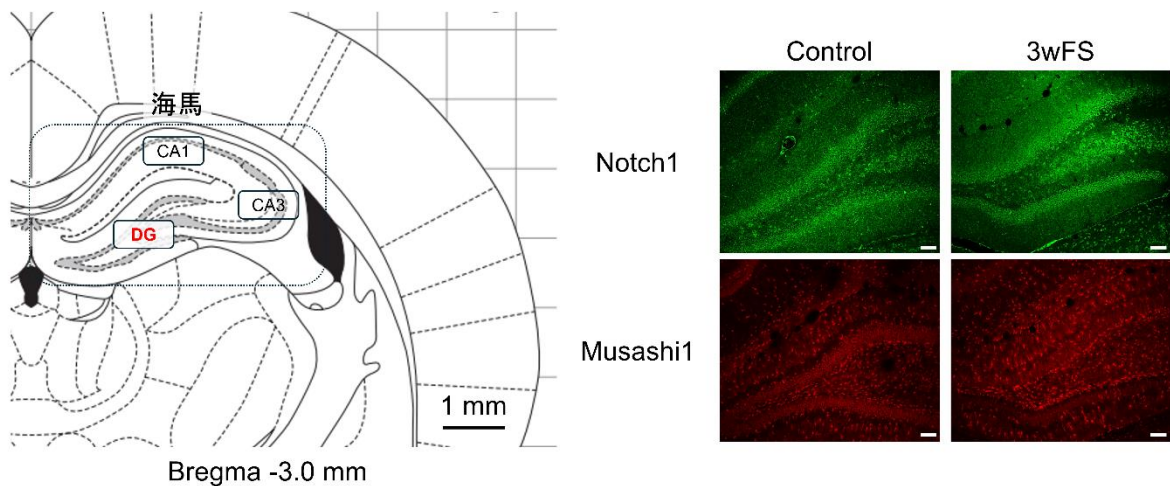


Fig.2 海馬の全体図 (左) と、海馬 DG における Notch1 および Musashi1 陽性細胞の染色像 (右)。画像内 bar, 100 μm。

脳内に存在するグリア細胞の中で、ミクログリアは神経幹細胞由来の細胞ではなく、ミクログリア内には Musashi1 が発現していないことが確認されている。そこで本実験で用いている抗 Musashi1 抗体の信頼性を確認するため、ミクログリアの細胞マーカーである Iba1 と Musashi1 の蛍光 2 重染色を行った。海馬 DG における Musashi1 陽性細胞 (Fig.3a、白矢頭) は、Iba1 が発現しておらず、ミクログリアではないことが確認された。このことから、本実験に用いた Musashi1 抗体は、神経幹細胞マーカーとして一定の信頼性が担保された。

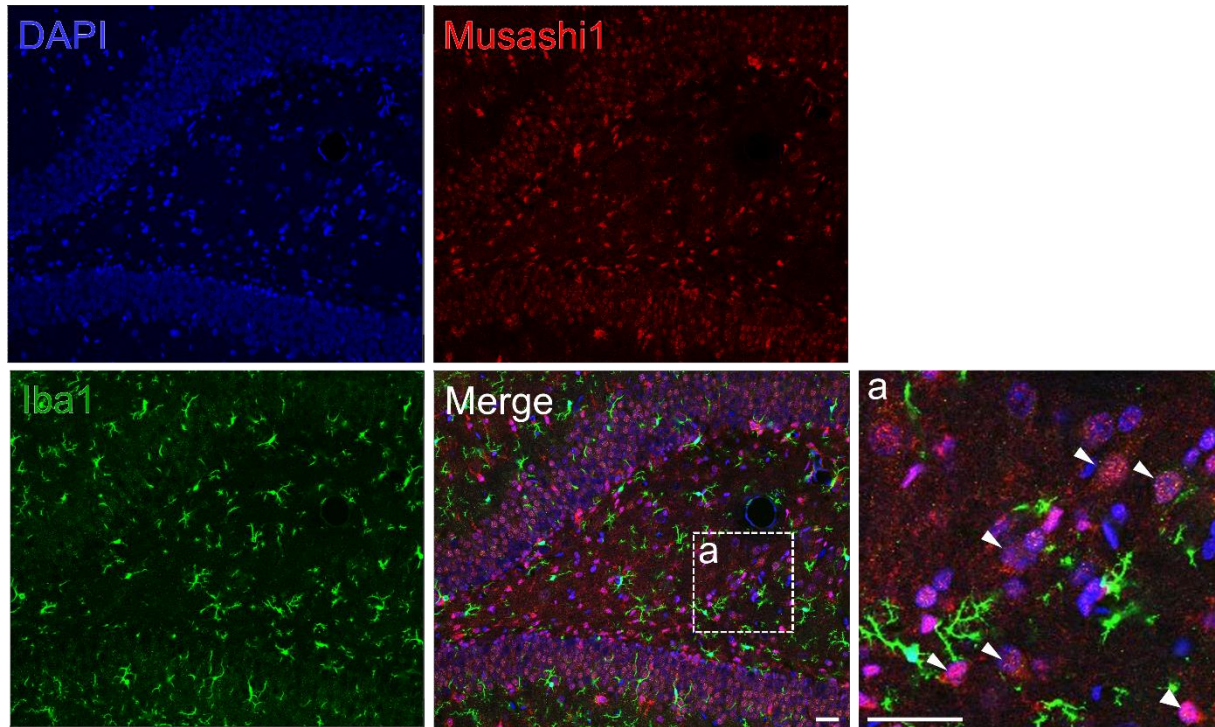


Fig.3 海馬 DG における Musashi1 と Iba1 の発現解析。a は点線内範囲の拡大図。画像内 bar, 20 μm。

#### 【考察】

本研究課題では、幼若期に受けたストレスが成長後の海馬にどのように影響するのか、神経幹細胞に焦点を当てて追究した。その結果、海馬 DG において Notch1 や Musashi1 陽性細胞が増加している可能性を見出した。すなわち、神経幹細胞が増加していることを示唆した。ストレスを受けるとこれらの細胞が減少し、うつ病を発症する「うつ病の神経新生仮説」が提唱されているが、これは成長後にストレスを受けて起きる現象に対して建てられた仮説である。幼若期にストレスに曝露されると、神経新生が幹細胞の段階でストップしてしまい、そこから成熟神経新生細胞にならない、という可能性も考えられる。幹細胞、前駆細胞、新生細胞、成熟細胞、すべての段階での形態解析を行うことで、脳発達と神経新生の関係を解明する必要がある。さらに今後、増加した神経幹細胞を特異的に回収し (FACS)、NGS 解析を行うことで、うつ病に関連した未知の遺伝子異常を発見するというシーズ探索研究を実施していきたい。