

## 89. 精神疾患の中間表現型探索および発症・治療機構の解明

橋本 均

Key words : 全脳イメージング, 精神疾患, 中間表現型, 神経活動マッピング, miRNA

大阪大学 大学院薬学研究科  
神経薬理学分野／附属創薬センター  
iPS 脳神経毒性プロジェクト

### 緒 言

統合失調症やうつ病などの精神疾患の原因として、遺伝素因と環境要因がエピジェネティックな機構を含む複雑な相互作用を介して発症するなど多数の仮説が提案されているが、その分子機構は全く不明であり、治療抵抗性症例も多く、アンメットニーズが最も大きい領域である。しかしながら最近 20 年間、モノアミン系以外を標的とした新規創薬は不成功の現状にある。その理由として、疾患の生物学的理解と診断分類の相違により、単一分子標的薬の有効性の範囲予測が不十分であることなどが考えられる。従って今後は、精神疾患の分子病態解析を進め、新たな治療標的の同定や、有効なバイオマーカーの開発、患者の層別化などに基づく臨床開発を実現することが必要であると思われる。

このような背景において、我々は、単一細胞レベルの全脳画像を、高速に取得する 3 次元イメージングシステムを開発しており、精神疾患モデル動物と正常動物の全脳細胞構築および神経活動の違いを定量的に検出すること、また、非コード RNA (とくに miRNA) の発現局在とその変化を捉えて、行動・神経機能障害の機序を解析する研究に取り組んでいる。本研究においては、精神疾患モデルの機能的変化を全脳から網羅的に検出するため、神経活動マップの作製と定量的な解析法の確立を行った。また、炎症性うつモデルの脳内 miRNA の局在変化を、*in situ* hybridization 法を用いて、半網羅的に解析することで、ヒトでは研究が困難な精神疾患の分子機構の解明を目指した。

### 方法、結果および考察

#### 1. 神経活動マップの作製と定量的な解析法の確立

我々が最近開発した、単一細胞レベルの空間解像度で全脳を撮影する高速かつ高精細な 3 次元全脳イメージング法 (FAST, block-face serial microscopy tomography) と、活性化した神経を標識する Arc-dVenus マウス (岐阜大学教授 山口 瞬博士より御供与) を組み合わせ、定常状態のマウス脳を用いて、全脳神経活動マッピングを実施した。さらに、既に開発した全細胞の空間配置情報を抽出する解析アルゴリズムと、関心領域 (ROI) ベースの解析手法を組み合わせ、全脳の神経活動の定量的な解析を行った。

通常飼育した 8 週齢の Arc-dVenus マウスを灌流固定し、高い空間分解能と感度を有する FAST を用いて、全脳イメージングを行った。その結果、神経細胞の細胞体だけでなく、軸索などの線維構造にも、Venus の蛍光シグナルが検出され、これまでにない全脳神経活動マッピングの作製に成功した (図 1A)。

定量的な解析を行うため、得られた 3 次元全脳画像を、解剖学的構造物を基準として、複数の脳領域に分割する ROI 法により、各領域の体積および Venus 陽性細胞数を算出した。特に、従来の手動による ROI の指定は、時間と労力を要し、データのバラつきに大きく影響することから、まず、簡便かつ明確な形態学的な境界を用いた半自動による ROI 設定を試みた。9 個体の脳を用いて各 ROI の体積を比較し、誤差を算出したところ、標準偏差が平均値の 4.8%であった。この偏差には、個体差が含まれていることから、高精度に ROI の設定ができていたことが示された (図 1B)。さらに、各 ROI の Venus 陽性細胞数を定量したところ、海馬では、約 8,000 個、皮質では、約 13,500 個の神経細胞が活性化していることを見出した。これらの成果により、既に確立した、個体間の全細胞の空間配置から構造変化を捉える voxel ベースの morphometry と合わせ、脳内の器質的および機能的変化を、全脳において定量的に検出することが可能になった。

今後、我々が作製した下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) の欠損マウスなど、精神疾患モデルとして妥当性が高いマウスモデル<sup>1,3)</sup>を用いて、上述の解析系ならびに我々が最近開発した神経細胞およびアストロサイトを同時に蛍光標識する技術<sup>4)</sup>、さらに行動薬理学的研究を併用して、精神疾患の機序の解明や抗精神病薬による作用機序や新規候補薬の有効性予測に関する研究にも展開したい。

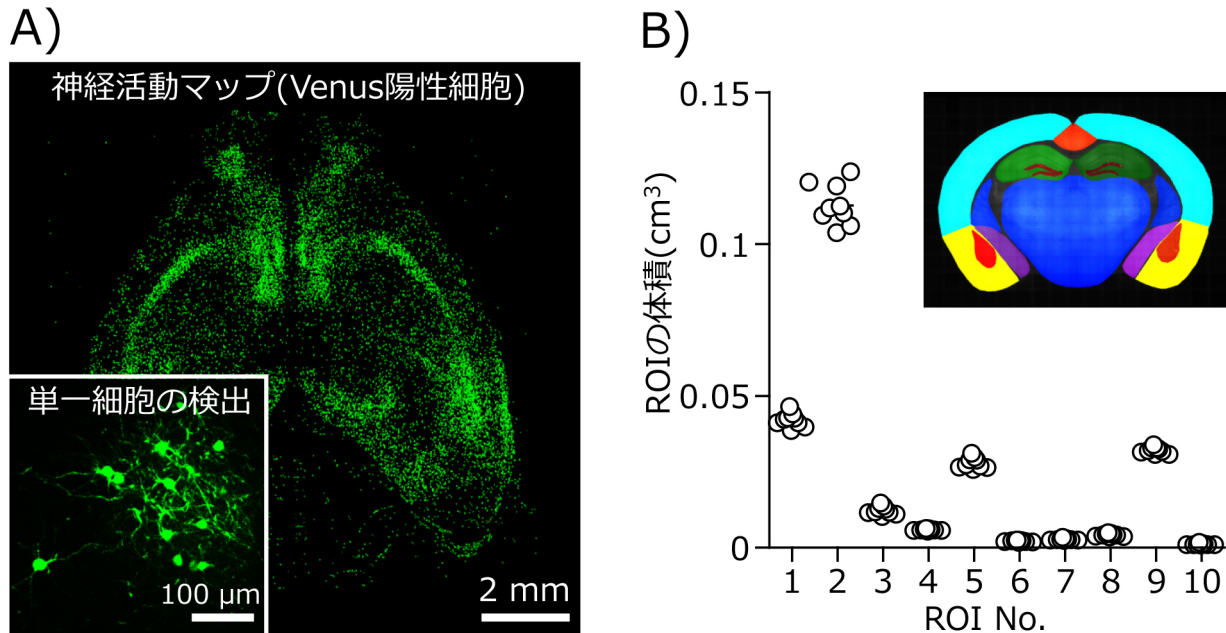


図1. 全脳神経活動マッピングとその定量解析法。

A) Arc-dVenus マウスを用いて作製した全脳神経活動マッピング。その解像度は、軸索などの線維構造まで維持されている (左下図)。B) 定量的な解析のため、関心領域 (ROI) を半自動で設定し (挿入写真)、各 ROI 体積を示した (n = 9)。概ねバラつきが小さく、全体で 4.8% の偏差であった。

## 2. *In situ* hybridization 法による脳内 miRNA の局在解析

近年、エピジェネティックな機構の一つである miRNA の発現異常が、様々な精神疾患の病態に関与する可能性が報告されているが、その生体における意義の解明に必須となる脳内における miRNA の発現パターン、発現細胞種の同定、さらにはその病態時の変化についてはほとんど明らかになっていない。そこで、単一細胞レベルで miRNA 発現を検出可能な *in situ* hybridization 法を用い、炎症が誘発する社会性行動障害に関わる神経核 (分界条床核、扁桃体中心核、視床下部室傍核) において、発現変動する miRNA の同定を試みた。

成体雄性 BALB/c マウスにリポ多糖 (LPS, 5 μg) を腹腔内投与し、2 時間後の脳を単離し、凍結切片を作製した<sup>5,6)</sup>。LNA プローブを用いた *in situ* hybridization により、各神経核における神経機能を調節する複数の miRNA の局在解析を行った。

扁桃体中心核や視床下部室傍核では、解析した miRNA の発現に変化がみられなかったが、分界条床核において発現増加する miRNA を見出した。同 miRNA の陽性細胞数が、分界条床核において約 2 倍程度に増加していた (図 2)。また、*in silico* の解析により、同 miRNA が神経突起の先端に集積し、神経伝達を調節する *synaptotagmine V* 遺伝子の 3'UTR に結合する可能性が示唆された。今後、同 miRNA による病態の分子機構を解明し、治療標的分子の同定や疾患分子機序の解明に貢献する研究を推進したい。

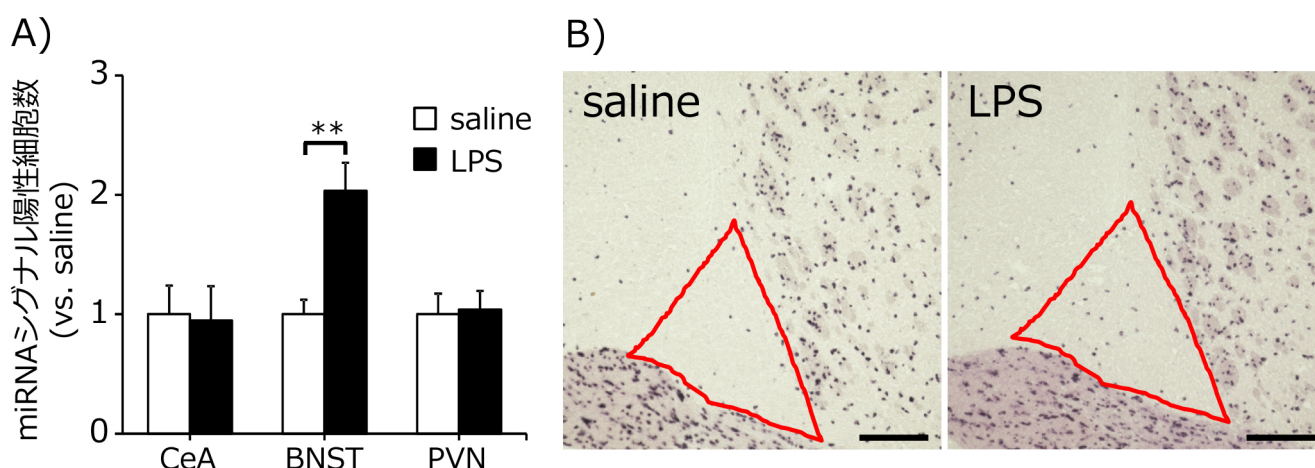


図2. *In situ* hybridization 法を用いた脳内 miRNA の局在解析。

A) LPS 誘発社会性行動障害に関わる神経核における miRNA 発現を解析した。CeA, 扁桃体中心核; BNST, 分界条床核; PVN, 視床下部室傍核。エラーバー, SE (n = 5)。\*\* $p < 0.05$ , Tukey Kramer test。B) BNST における同 miRNA の局在を示した代表的な写真。赤点線で囲った範囲を BNST とした。Scale bar, 200  $\mu$ m。

Arc-dVenus マウスを御供与いただきました。岐阜大学教授 山口 瞬博士に深謝いたします。また、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Shibasaki, Y., Hayata-Takano, A., Hazama, K., Nakazawa, T., Shintani, N., Kasai, A., Nagayasu, K., Hashimoto, R., Tanida, M., Katayama, T., Matsuzaki, S., Yamada, K., Taniike, M., Onaka, Y., Ago, Y., Waschek, J. A., Koves, K., Reglodi, D., Tamas, A., Matsuda, T., Baba, A. & Hashimoto, H. : Atomoxetine reverses locomotor hyperactivity, impaired novel object recognition, and prepulse inhibition impairment in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Neuroscience*, **297** : 95-104, 2015.
- 2) Shintani, N., Onaka, Y., Hashimoto, R., Takamura, H., Nagata, T., Umeda-Yano, S., Mouri, A., Mamiya, T., Haba, R., Matsuzaki, S., Katayama, T., Yamamori, H., Nakazawa, T., Nagayasu, K., Ago, Y., Yagasaki, Y., Nabeshima, T., Takeda, M. & Hashimoto, H. : Behavioral characterization of mice overexpressing human dysbindin-1. *Mol. Brain*, **7** : 74, 2014.
- 3) Hasebe, S., Hiramatsu, N., Ago, Y., Mori, K., Watabe, Y., Hashimoto, H., Takuma, K. & Matsuda, T. : Role of the 5-HT1A autoreceptor in the enhancement of fluvoxamine-induced increases in prefrontal dopamine release by adrenalectomy/castration in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **127** : 232-235, 2015.
- 4) Schulze, W., Hayata-Takano, A., Kamo, T., Nakazawa, T., Nagayasu, K., Kasai, A., Seiriki, K., Shintani, N., Ago, Y., Farfan, C., Hashimoto, R., Baba, A. & Hashimoto, H. : Simultaneous neuron- and astrocyte-specific fluorescent marking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **459** : 81-86, 2015.
- 5) Haba, R., Shintani, N., Onaka, Y., Kanoh, T., Wang, H., Takenaga, R., Hayata, A., Hirai, H., Nagata, K. Y., Nakamura, M., Kasai, A., Hashimoto, R., Nagayasu, K., Nakazawa, T., Hashimoto, H. & Baba, A. : Central CRTH2, a second prostaglandin D2 receptor, mediates emotional impairment in the lipopolysaccharide and tumor-induced sickness behavior model. *J. Neurosci.*, **34** : 2514-2523, 2014.
- 6) Onaka, Y., Shintani, N., Nakazawa, T., Haba, R., Ago, Y., Wang, H., Kanoh, T., Hayata-Takano, A., Hirai, H., Nagata, K., Nakamura, M., Hashimoto, R., Matsuda, T., Waschek, J. A., Kasai, A., Nagayasu, K., Baba, A. & Hashimoto, H. : CRTH2, a prostaglandin D2 receptor, mediates depression-related behavior in mice. *Behav. Brain Res.*, **284** : 131-137, 2015.