

自殺者およびカニクイザルを用いた大うつ病の病態解明

等 誠司

滋賀医科大学 生理学講座 統合臓器生理学

【研究の背景】

大うつ病患者では、脳画像研究や死後脳研究によって、複数の脳部位の萎縮や脳血流・代謝異常が報告されている。また、画像研究で異常が見られた脳部位の病理学的解析から、前頭前野や前部帯状回では神経細胞体サイズの縮小やグリア細胞密度の減少などが報告されるとともに、前頭前野の遺伝子発現解析では、オリゴデンドロサイト・ミエリン関連遺伝子の発現異常が多く報告されている。しかしながら、大うつ病の病態の主因となる脳部位や細胞腫、障害の分子メカニズムは解明されていない。我々は、大うつ病患者死後脳の前頭極灰白質における成熟オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞の減少を見出した(Hayashi et al., 2011)。これは、神経幹細胞から産出されるオリゴデンドロサイト前駆細胞や、分化・成熟してミエリンを形成するオリゴデンドロサイト系譜細胞の異常が、大うつ病の病態に密接に関連している可能性が高いと考えている。

【目 的】

本研究では、大うつ病の病態解明を目指し、①自殺者死後脳におけるエピゲノム変化の解析、②大うつ病モデルカニクイザルの確立と死後脳解析を行う。特に、大うつ病患者死後脳解析で見られたオリゴデンドロサイト系譜細胞の変化に注目して解析を行うことで、大うつ病の病態メカニズムに迫ることを目的とする。

【方 法】

自殺者死後脳解析

ヒト死後脳は、滋賀医科大学法医学部門との共同研究で、倫理委員会承認の下、自殺または突然死によって法医解剖に付された検体の前頭極の提供を受けた。前頭極灰白質から細胞核を抽出し、神経細胞マーカー (NeuN)、オリゴデンドロサイト系譜細胞マーカー (Olig2) で染色し、フローサイトメーターでそれぞれに陽性の細胞核を分取した。さらに、Olig2強陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞と弱陽性の成熟オリゴデンドロサイトに分けて分取した。分取した細胞核から DNA を抽出し、自殺者の脳内で生じているエピゲノム変化を特定するために、次世代シーケンサーによる網羅的メチル化解析を行った。解析方法としては、DNA 上のメチル化をうけるシトシンが多く存在する CpG リッチな領域を、少ないリード数で解析することができる RRBS (Reduced representation of bisulfite sequence) 法を用いた。サンプルは、自殺者死後脳 (51歳、男) と健常者 (52歳、男) それぞれの前頭極灰白質から抽出した神経細胞、成熟オリゴデンド

ロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞の DNA (6サンプル)を用いた。

インターフェロンα慢性投与うつ病モデルカニクイザルの作製と評価

インターフェロンα慢性投与によるうつ病モデル動物の作製は、マウスを用いてすでに実証済みである(Zheng et al., 2014)。性周期の影響を排除するため、オスのカニクイザルを用いて、インターフェロンα投与群、生理食塩水投与群を各3頭ずつ作製した。ヒト型PEG-インターフェロンαを、実際の治療に用いられる投薬量と期間に準じ、週1回(3.5μg/kg皮下注射)×12週間投与するとともに、投薬中のカニクイザルの行動をビデオ撮影し、食餌量、行動量、グルーミングの回数・時間、などの変化を計測した。薬剤投与終了後、脳を採取して上記同様に神経細胞、オリゴデンドロサイト系譜細胞に分けて、細胞核を分取し、DNAを抽出後、オリゴデンドロサイト関連因子であるSox10プロモーター領域のメチル化の解析を行った。

【結 果】

自殺者死後脳解析

まず最初に、RRBS 法による網羅的 DNA メチル化解析結果から、神経細胞・成熟オリゴデンドロサイト・オリゴデンドロサイト前駆細胞の DNA メチル化の比較を行い、細胞種特異的なメチル化状態のプロファイリングを行った。相関分析では、神経細胞・成熟オリゴデンドロサイト・オリゴデンドロサイト前駆細胞は、異なる個人でも相関係数が高く、メチル化の状態が酷似することがわかった(図 1)。また、同一個体での成熟オリゴデンドロサイトとオリゴデンドロサイト前駆細胞のメチル化状態は類似しているが、特にオリゴデンドロサイト前駆細胞では、個体間でメチル化状態が異なる因子が神経細胞や成熟オリゴデンドロサイトに比べ多いことを見出した。遺伝子オントロジー解析では、オリゴデンドロサイト系譜細胞(オリゴデンドロサイトとオリゴデンドロサイト前駆細胞)に比べて神経細胞で低メチル化な領域は、シナプス関連の因子や認知、学習に関連する因子が多く含まれることが分かった。一方、神経細胞に比べてオリゴデンドロサイト系譜細胞で低メチル化な領域は、ミエリン関連因子やグリア細胞の分化に関連する因子が多く含まれていた。これらのデータは、神経細胞、オリゴデンドロサイト系譜細胞が、正確に分離されており、それぞれの細胞種特異的な DNA メチル化の情報を、おそらく死後脳特異的な交絡因子(死後経過時間など)の影響を受けずに得られている可能性を強く示唆する。現段階では自殺者と健常者のメチル化の比較は検体数が少なく、今後検体数を増やして行う予定である。

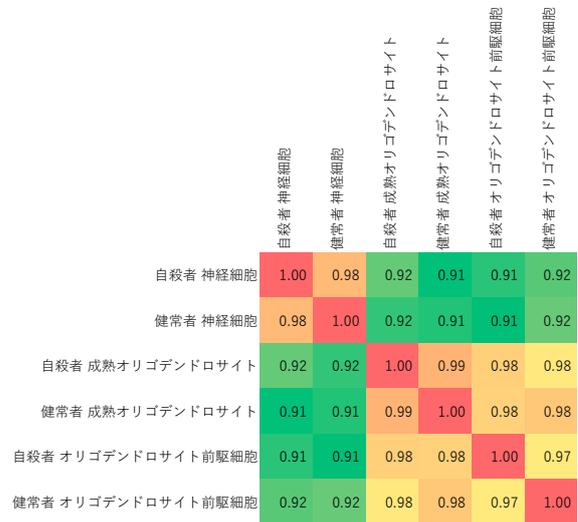


図 1 ヒト死後脳から得られた細胞種特異的 DNA メチル化の相関分析

インターフェロンα慢性投与うつ病モデルカニクイザルの作製と評価

インターフェロンαはヒトの投薬量に準じ、3.5μg/kg/週で皮下から投与を行い、12週間問題なく投薬を行うことが可能であった。同時にビデオ撮影を行っており、行動変化の解析を行ったところ、食餌にかける時間や、グルーミングの

時間の増加などを見出した。カニクイザルに対する行動評価は確立されていないが、うつ病の病態と関連する変化であると考えている。また、投与後の前頭前野から、神経細胞とオリゴデンドロサイトをフローサイトメーターで分取して DNA を抽出した後、細胞種特異的な DNA メチル化の解析を行った。その結果、インターフェロン α 慢性投与個体で、オリゴデンドロサイト系譜細胞に特異的にオリゴデンドロサイト関連因子である Sox10 のプロモーター領域が低メチル化傾向であることが分かった(図2)。

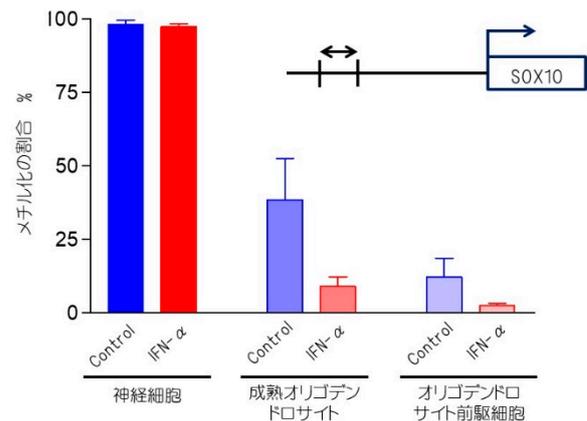


図2 インターフェロン α (IFN- α) 慢性投与による細胞種特異的 Sox10 プロモーターのメチル化の変化

【考察】

ヒト死後脳から、神経細胞やオリゴデンドロサイト系譜細胞の DNA メチル化情報を網羅的に得ることができ、それぞれの細胞種に特異的な遺伝子は低メチル状態であることが判明した。また、インターフェロン α 慢性投与によるカニクイザルうつ病モデルでは、うつ状態を示唆する行動変化が見られた。インターフェロン α 慢性投与カニクイザルの脳で認められた Sox10 プロモーター領域のメチル化変化は、うつ病の病態との関連が示唆される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ヒト死後脳を用いた網羅的 DNA メチル化解析は、ヒト脳で生じている精神疾患関連エピゲノム変化を捉えるのに重要であり、臨床的意義がある。また、非ヒト霊長類を用いたうつ病モデル動物の作製・解析は、マウスなどのげっ歯類では得られない、うつ病患者脳で生じている異常をより忠実に反映することが期待される (Hayashi et al., 2018)。将来的に、ヒト死後脳とカニクイザルうつ病モデルで見られた変化を相互に参照および検証することにより、うつ病の病態解明や新規治療薬の開発などにつながることが期待される。

【参考・引用文献】

- Hayashi Y, Kikuchi NN, Yu X, Ishimoto K, Hisanaga S-I, Tatebayashi Y. A novel, rapid, quantitative cell-counting method reveals oligodendroglial reduction in the frontopolar cortex in major depressive disorder. **Molecular Psychiatry** 16: 1156-1158, 2011.
- *Zheng L-S, *Hitoshi S, *Kaneko N, Takao K, Miyakawa T, Tanaka Y, Xia H, Kalinke U, Kudo K, Kanba S, Ikenaka K, Sawamoto K. Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. **Stem Cell Reports** 3: 74-83, 2014. (*, equal contribution)
- *Hayashi Y, *Jinnou H, Sawamoto K, Hitoshi S. Adult neurogenesis and its role in brain injury and psychiatric diseases. **Journal of Neurochemistry** in press (*, equal contribution)