

## 公募研究 うつ病モデルラットの扁桃体における分子変化の研究

研究代表者：泉 剛（薬学部 薬理学講座 臨床薬理毒理学）

研究分担者：鹿内 浩樹（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】

厚生労働省の調査によれば、近年、うつ病などの気分障害の患者が増加しており、2017年には128万人に達し、1996年と比較すると3倍に増えている。一方、日本の自殺死亡率は先進7カ国中で最も高い。年間2万人を超える人が自殺しており、特に新型コロナウイルス感染拡大に伴って増加している。うつ病は休業の主要な原因であるだけでなく、自殺の最大のリスク要因である。このように、うつ病は国民の健康に重大な影響を及ぼす疾患であり、病態解明と治療の進歩へ向けた研究が必要である。

我々は、うつ病の動物モデルとして、反復拘束ストレス負荷（RS7）ラットを用いて研究してきた。RS7ラットは、強制水泳における無動時間延長（うつ様行動）を示し、これが抗うつ薬である5-HT再取り込み阻害薬（SSRI）の慢性投与で回復することから、うつ病モデルとして妥当である。また、うつ病の病態のひとつとして、視床下部-下垂体-副腎（HPA）系の機能亢進が挙げられるが、RS7ラットは血中の副腎皮質ホルモンの高値を示し、うつ病の病態を反映したモデルであると言える。一方、FKBP5は視床下部-下垂体-副腎（HPA）系の調節因子であり、多型研究でうつ病との関連が報告されている。我々は、RS7によりラットの扁桃体でFKBP5が増加し、これが、SSRIであるエスシタロプラムの慢性投与で回復することを見出した。これより、うつ様行動と扁桃体FKBP5の関連が示唆された。また、近年、解離性麻酔薬であるケタミンの抗うつ作用が注目されている。ケタミンの作用に重要であるPI3K/Akt/mTOR系について、ウェスタンブロッティング（WB）で検討したところ、RS7ラットの扁桃体でAktの活性化（リン酸化亢進）が認められた。

### 【目的】

Akt はPI3K/Akt/mTOR系の最終的な出力を担うhub分子であるが、RS7ラットの扁桃体におけるAktの下流の変化が不明である。また、FKBP5とAktの中間に位置するmTORが不変であるため、FKBP5からAktの変化に至る機序を説明できない。これは、未知の分子変化が介在していることによると考えられる。これを明らかにするために、我々は今回の研究で、マイクロアレイを用いて、RS7ラットの扁桃体におけるmRNAの網羅的解析（トランスクリプトーム解析）を行うこととした。

### 【方法】

7週齢の雄性Wistar/STラットに、専用のプラスチックバッグを使用して、1日3時間の拘束ストレスを7日間負荷する（RS7）。2週間ラットを静置し、強制水泳試験でうつ様行動が出現することが確認されている10週齢時にラットをサクリフェイスし、両側の内側前頭野および扁桃体をサンプリングする。抽出キット（Qiagen）を用いて脳組織よりRNAを抽出する。ラットmRNA用のマイクロアレイ（ThermoFisher）にRNAサンプルを反応させ、先端研究推進センターに設置されている解析装置（GeneChip™ Scanner 3000 7G System）を用いて結果の測定を行う。データ解析は、バイオインフォマティクスの解析ソフトであるTranscriptome Analysis Console (TAC) によって行う。本ソフトは生命科学情報データベースであるKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) と連動しており、KEGGマップを作成することにより、対象遺伝子の上流および下流の変化を推定できる。

以上により、RS7により変化するRNAを検出できたら、新たなサンプルを用いて、それ

らのRNAに対応するウェスタンブロッティング（mRNAに対応するタンパク）および定量PCRを行い、網羅的解析と同様な所見が得られるかどうか確認する。現時点で、ウェスタンブロッティングと定量PCR実験は進行中であるため、今回はマイクロアレイの結果について報告する。

### 【結果】

内側前頭野：無処置のコントロール群（n=5）とRS7群（n=5）について検討を行った。Fold change 1.5以上の変化を示した遺伝子は256個で、162個がコントロールに対して増加しており、94個が減少していた。そのうち、fold change 2以上の変化を示した遺伝子は12個で、8個が増加しており、4個が減少していた。

扁桃体：サンプル数は上記と同様である。Fold change 1.5以上の変化を示した遺伝子は26個で、13個がコントロールに対して増加しており、13個が減少していた。そのうち、fold change 2以上の変化を示した遺伝子は4個で、3個が増加しており、1個が減少していた。

### 【考察】

扁桃体でRS7による変化を示した遺伝子のうち、最も大きな変化を示したのは遺伝子Xである。遺伝子Xのfold changeの値は15.84で、他のdetectされた遺伝子のfold changeがほとんど2以下であったのに比べて、大きな変化であった。遺伝子XはmPFCでもfold change 1.55の変化を示していた。

我々は、うつ病の動物モデルとして、本研究で用いたRS7の他に、幼若期ストレスモデル（3WFS）でも検討を行っている。3WFSは生後3週齢の離乳直後に5日間の電撃ストレスを負荷するが、成熟後（10週齢）に強制水泳でうつ様行動を示し、海馬においてうつ病関連遺伝子の異常を示す。3WFSの海馬においてもマイクロアレイでmRNAの網羅的解析を行ったところ、遺伝子Xは生後3週齢における電撃ストレス負荷24時間後にfold change -42.53の非常に大きな変化を示した。ところが、成熟後（10週齢）における同様な検討では変化が認められなかった。これは、遺伝子Xがストレス直後に変化して、それが成熟後のうつ様行動につながるような永続的な脳機能の変化をもたらしたものと解釈することが可能である。

しかし、今回のRS7での検討では、遺伝子Xの変化はストレス負荷群における増加であり、3WFSではストレス負荷群における減少である。現時点では、両モデルにおける遺伝子Xの変化が偶然の一致なのか、共通してうつ様行動につながっているのかは分からない。

遺伝子Xのタンパク産物は血清タンパクの一種であり、ホルモンの輸送担体として作用する他、脂質代謝、インスリン分泌などに関与している。脳内では脈絡叢で産生され、神経保護作用を有することが報告されている。病態的には、遺伝子Xの変異によって家族性の全身性代謝疾患を引き起こすことが知られている。またアルツハイマー病との関連や、うつ病との関連も少数ではあるが報告されている。今後、RS7の扁桃体における遺伝子Xの機能と病態的意義をウェスタンブロッティングや免疫染色によって追及したい。また、現時点で遺伝子Xのノックアウトマウスは存在するが、floxédマウスは存在しない。うつ病の責任脳部位を追求するためには、脳局所におけるコンディショナルノックアウトを行う必要があるため、今後、外注や共同研究で遺伝子Xのfloxédマウスを作製する方策を検討したい。