

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06091・19K21213

研究課題名（和文）社会的敗北ストレスモデルを用いたミクログリア仮説に基づくうつ病の解明

研究課題名（英文）The relationship between microglia and depression in a mouse model of social defeat stress

研究代表者

藤川 理沙子（Fujikawa, Risako）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：50823209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、脳で炎症応答を担うとされるミクログリアとうつ病の関係の解明を目指し、以下の成果を得た。ヒトのストレスに近似しているとされている社会的敗北ストレスモデルマウスを確立し、不安様行動とうつ様行動を確認した。社会的ストレスにより、海馬CA1領域のミクログリアの空間分布密度が増加し、突起の短縮や分岐の減少などの形態学的変化が生じた。抗炎症作用が報告されている植物由来エストロゲン類縁体ゲニステインを投与したところ、うつ様行動やミクログリアの変化の一部に改善がみられた。ミクログリアは社会的ストレスによるうつ病治療において重要な標的となる可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病の生涯罹患率は3～15%との報告もあり、頻度の高い精神疾患である。うつ病患者の治療において、セロトニンやノルアドレナリンの再取り込み阻害薬等が第一選択薬として用いられている。それらには一定の治療効果が認められているが、治療が奏功せず、難治化する患者が一定の割合で存在することも報告されており、新たな病態の理解と治療戦略の創出が重要な課題になっている。本研究は、社会的ストレスによる行動変化とともにミクログリアの詳細な形態変化を明らかにし、うつ病の発症や回復におけるミクログリアの重要性について理解を深めるものである。

研究成果の概要（英文）：Recent studies raised the possibility that neuroinflammation relates to the pathophysiology of depression following social stress. In this study, we aimed to elucidate the relationship between depression and microglia, resident immune cells in the brain, using a social defeat (SD) stress model mouse. Depression-like behavior and anxiety-like behavior were increased by exposure to SD stress for 10 days. SD stress increased the numerical densities of microglia in the hippocampus. The numbers of nodes, ends, and total lengths of microglial process were decreased by SD stress. In addition, we analyzed the potential effect of soy isoflavone genistein, which has anti-inflammatory effect. Genistein administration partially decreased depression-like behaviors and neuroinflammation caused by SD stress.

研究分野：神経科学

キーワード：うつ病 ミクログリア 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では過労死の増加など、社会的ストレスによるうつ病が社会的問題となっており、学術的支援が必要とされている。うつ病の仮説として、患者の脳でセロトニンの機能が低下しているとされるセロトニン仮説が有力であるが、セロトニンを標的とした抗うつ剤を十分な期間服用しても改善が見られない症例も報告されており、病態の理解が望まれている。その他の発症仮説のひとつに、ミクログリア仮説がある。神経炎症に関わるグリア細胞のうち、特に炎症応答への寄与が大きいミクログリアは、シナプスにコンタクトし神経回路の可塑性や行動を調節している。炎症応答が過剰になった際は神経障害作用を持ち、神経新生を減少させることもある。マウスを用いたうつ病モデルは急性の拘束ストレスを含め複数存在するが、大型で攻撃性の高いマウスに暴露し慢性的にストレスを与える「社会的敗北ストレスモデルマウス」が、ヒトのストレスに近似しているとされ近年注目されるようになってきている。このマウスモデルにおいても、うつ病への関与が大きいとされる海馬で、歯状回におけるミクログリアの細胞体が肥大化することが報告されており、社会的ストレスによるうつ病にもミクログリアが関与している可能性がある。しかし、シナプスとの接触や詳細な形態学的解析はなされておらず、うつ病の発症と回復におけるミクログリアの変化や神経回路への影響も十分に明らかになっていない。社会的ストレスによるうつ病の病態理解と、脳炎症を標的とした治療薬の開発のためには、行動変化に伴うミクログリアの形態変化と影響する神経系について、より詳細な解析が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、社会的ストレスによるミクログリアの変化と神経系への影響を明らかにすることを目的とし、社会的敗北ストレスモデルマウスを用いて行動解析とミクログリアの画像解析を行った。さらに抗炎症作用が報告されている植物由来エストロゲン類縁体ゲニステインを投与し、うつ様行動とミクログリア変化に対する効果を調べた。うつ病とミクログリアに代表される神経炎症との関係は近年の脳科学のトピックスの一つであり、多くの研究がある。一方で本研究の特徴は、これまで検討がほとんどなされていない社会的敗北ストレスモデルマウスの行動学的解析とミクログリアの形態学的解析を独自にリンクさせた点にある。社会的ストレスによる行動変化に伴うミクログリアの変化を明らかにすることで、うつ病の発症や回復に対する理解や新たな治療薬の開発に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作出

社会的敗北ストレス暴露を開始する1週間前から大豆フリー餌を与え、C57BL/6J マウスの単独隔離飼育を開始した。大型のICRマウスのケージにC57BL/6Jマウスを入れ、ICRマウスの攻撃による身体的ストレスをC57BL/6Jマウスに10分間与えた。続いて、透明アクリル板の仕切りを入れたケージの両側にICRマウスとC57BL/6Jマウスをそれぞれ入れ、接触できない状態にして過ごす精神的ストレスを24時間与えた。これを10日間繰り返し、ストレス群とした。コントロール(非ストレス暴露)群は、仕切り板を隔ててC57BL/6Jマウスを同じケージの仕切りの両側に一頭ずつ飼育した。10日間のストレス暴露が終了した翌日に、高架式十字迷路試験で不安様行動を、うつ様行動を社交性試験で評価した。また、10日間のストレス暴露翌日より14日間のゲニステイン(30 mg/kg; 東京化成工業)、もしくは生理食塩水の腹腔内投与を行ったマウスについては、高架式十字迷路試験(23日目)と社交性試験(24日目)に加え、強制水泳試験(25日目)を行い、26日目に灌流固定を行った。全ての動物実験は九州大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

(2) 免疫染色

マウスは、深麻酔下に濃度0.05%グルタルアルデヒド含有4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(PB, 30 ml)による灌流固定を行い、ピラトームを用いて50 μ m厚の冠状断脳切片を作製した。実体顕微鏡下に海馬を摘出した。

以下の一次抗体に適切な蛍光色素標識二次抗体を組み合わせ免疫染色を行った。

ウサギポリクローナル抗 Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) 抗体 (1:10000, 和光純薬)

ウサギポリクローナル抗 S100 抗体 (1:10,000, RDI)

モルモットポリクローナル抗 doublecortin (DCX) 抗体 (1:2,000, Millipore)

ヤギポリクローナル抗 sex determining region Y-box 2 (Sox2) 抗体 (1:2,000, Santa Cruz Biotechnology)

(3) オプティカルダイセクター解析

中倍の対物レンズ($\times 20$, NA 0.75)を装着したセクショニング顕微鏡(Apotome.2, Carl Zeiss)を用いて、海馬の領域毎に撮影した。画像解析にはImageJ1.44(NIH)を使用し、厳密なサンプリングを可能にするオプティカルダイセクター法に基づき、ミクログリア(Iba1陽性)、新生ニューロン(DCX陽性)、神経幹細胞(Sox2陽性)、アストロサイト(S100陽性)の空間分布密度の定量を行った。

(4) ミクログリアの三次元再構築

高倍の対物レンズ($\times 63$, NA 1.4)を装着したセクショニング顕微鏡(Apotome.2)を用いて、海馬CA1領域の放線層を撮影した。ミクログリアの突起と細胞体の三次元再構築には

Neurolucida (MBF Bioscience) を使用した。

4. 研究成果

(1) 社会的敗北ストレス様によるうつ様行動とゲニステインの効果

最初に、社会的敗北ストレスによる行動学的変化を検討した。10 日間のストレス暴露が終わった翌日、高架式十字迷路試験を行った。コントロール群と比較して、ストレス群の C57BL/6J マウスでは、closed arm における滞在時間の延長と、open arm における滞在時間の短縮が見られ、不安様行動が示唆された。社交性試験では、ICR マウスに対するソーシャルインタラクションスコアに差はなかったが、忌避行動がストレス群で増加し、うつ様行動が誘導されること示唆された。次に、社会的敗北ストレス負荷終了翌日よりゲニステインを 2 週間投与したマウスの行動学的解析を行った。高架式十字迷路試験と社交性試験については、ゲニステイン投与による明らかな変化は認められなかった。一方で、強制水泳試験では、ゲニステイン投与によって無動時間の短縮と移動距離の延長が認められた。これらの結果は、ゲニステインは社会的ストレスによるうつ様症状の一部に改善効果がある可能性を示唆している。

(2) 社会的敗北ストレスによる海馬ミクログリアの増加とゲニステインの効果

10 日間の社会敗北ストレス暴露後、14 日間のゲニステイン投与を行い、海馬のミクログリア (Iba1 陽性免疫細胞) の空間分布密度の変化を検討した。上昇層では、ミクログリアの空間分布密度は社会的敗北ストレスによる増加は認められず、ゲニステインの影響も認められなかった。一方で、錐体細胞層では、社会的敗北ストレス暴露で Iba1 陽性ミクログリアの密度が増加し、ゲニステイン投与によって抑制されていた。放線層では、社会的敗北ストレス暴露によって Iba1 陽性ミクログリアの密度が増加したが、ゲニステインの効果は明らかではなかった。これらの結果は、社会的敗北ストレスは海馬に神経炎症を惹起し、ゲニステインは炎症反応の一部を抑制する可能性があることを示唆している。

(3) 社会的敗北ストレスによる海馬ミクログリアの形態変化とゲニステインの効果

10 日間の社会敗北ストレス暴露後、14 日間のゲニステイン投与を行い、海馬のミクログリア (Iba1 陽性免疫細胞) の形態学的変化を検討した。多くのミクログリアで、社会的敗北ストレス暴露による突起の短縮と分岐の減少が認められたが、これらの形態学的変化はゲニステイン投与によって抑制されていた。コンピュータによる三次元再構築を行い、突起の形態を定量的に解析した。その結果、社会的敗北ストレス暴露によって、ミクログリアの突起の分岐と終末数の減少と、突起長の短縮が生じること、ゲニステインはそれらの変化を抑制することが明らかになった。これらの結果は、社会的敗北ストレスは海馬のミクログリアを活性化するが、ゲニステインはそれを抑制する可能性を示唆するものである。

(4) 社会的敗北ストレスによる成体海馬神経新生の低下とゲニステインの効果

近年、うつ病に伴う神経炎症が成体海馬神経新生を抑制する可能性に注目が集まっている。このため我々は、社会的敗北ストレス暴露とゲニステイン投与による新生ニューロンや神経幹細胞の空間分布密度の変化を解析した。新生ニューロン (DCX 陽性) の密度は社会的敗北ストレス暴露によって低下し、ゲニステイン投与によって増加していた。神経幹細胞 (Sox2 陽性/S100 陰性) の密度は社会敗北ストレス暴露やゲニステイン投与による影響を受けなかった。アストロサイト (S100 陽性) の密度についても社会敗北ストレス暴露とゲニステイン投与による影響は認められなかった。これらの結果は、社会的敗北ストレスの暴露は海馬の神経幹細胞やアストロサイトに対する作用は認められないが、新生ニューロンを減少させる可能性があること、さらにゲニステインの投与は神経新生を促進し、新生ニューロンを増加させる可能性があることを示唆している。

本研究は、社会的敗北ストレスにより海馬におけるミクログリアの空間分布密度が増加し、突起長短縮等の形態的变化が現れること、神経新生が低下することを明らかにした。さらに、抗炎症作用のあるゲニステインの投与により、うつ様行動とミクログリア変化の一部が改善された。以上の結果から、ミクログリアは社会的ストレスによるうつ病治療において重要な標的となる可能性が考えられる。現在、ドパミン神経等やシナプスマーカーに対するミクログリアの接触様式を解析しており、神経回路への影響を解明することを目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤川理沙子
2. 発表標題 うつ病のミクログリア形態解析
3. 学会等名 第19回ブレインサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川理沙子
2. 発表標題 これからの海馬と精神疾患研究
3. 学会等名 第11回茨城大学農医連携セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川理沙子、山田純、神野尚三
2. 発表標題 統合失調症モデルマウス海馬におけるCat-315陽性ペリニューロナルネットとシナプス再編成
3. 学会等名 第74回日本解剖学会九州支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川理沙子、山田純、神野尚三
2. 発表標題 ケタミン投与マウスの海馬ミクログリアの解析から統合失調症の病態を理解する
3. 学会等名 第20回ブレインサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川理沙子、山田純、神野尚三
2. 発表標題 Subclass-dependent changes of parvalbumin-expressing neurons and perineuronal nets in the hippocampus of a mouse ketamine model for schizophrenia
3. 学会等名 第42回神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川理沙子、山田純、神野尚三
2. 発表標題 統合失調症モデルマウスの海馬におけるパルプアルブミン陽性ニューロンとペリニューロナルネットの変化
3. 学会等名 第75回日本解剖学会九州支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川理沙子、神野尚三
2. 発表標題 社会的敗北ストレスに起因する海馬の神経炎症に対するゲニステインの効果
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----