

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500446

研究課題名(和文)ピロカルピン処理マウスにおける脳由来神経栄養因子と不安様行動の解析

研究課題名(英文)Characterization of BDNF expression and anxiety-related behavior in pilocarpine model mice.

研究代表者

板倉 誠 (Itakura, Makoto)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：30398581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：現代社会では、ストレスがしばしば不安障害を引き起こす。不安障害の脳内メカニズムを解明するには動物モデルが有効である。そこで不安様行動を示すピロカルピン処理マウスの解析を行った。多くのタンパク質のうち、脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現量のみが不安様行動と正の相関性を示した。またin situ ハイブリダイゼーションを行い、ピロカルピン処理マウス海馬CA3領域および歯状回でBDNFが増加することを明らかにした。我々の結果はBDNFがマウスの不安様行動に関与していることを示唆している。またプロBDNFおよび成熟BDNFのELISAによる高感度な定量法の確立も行った。

研究成果の概要(英文)：In modern society, excessive stress has often been known to cause anxiety disorders. For the understanding of neurobiological mechanisms of anxiety and anxiety disorders, animal models will be useful. In this study, we investigated behavioral, biochemical and histological alterations of the pilocarpine model mice exhibiting anxiety-like behavior.

Among various neural proteins tested, only the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was changed in parallel with expression of the anxiety-related behavior. In situ hybridization analysis demonstrated that the pilocarpine model mice increase expression of BDNF mRNA in CA3 pyramidal cells and dentate gyrus granule cells of the hippocampus. Our results suggest that BDNF signaling may concern the induction of the anxiety-related-behavior in the pilocarpine model mice. In addition, the establishment of a high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of proBDNF and mature BDNF was also performed.

研究分野：神経化学

キーワード：脳神経栄養因子 不安障害 ピロカルピン 海馬 ELISA

1. 研究開始当初の背景

(1) 情動の1つである不安の制御には、大脳辺縁系の扁桃体-視床下部-中脳中心灰白質の神経回路が中心的な役割を果たしている。しかしながら、扁桃体は大脳皮質や海馬とも神経回路を形成しており、情動行動には脳の広範な領域が関与していると考えられる。

したがって、実際には非常に多様な神経回路によって不安は決定されており、不安障害のような過度の不安感を引き起こす脳内の分子メカニズムの詳細は、いまだ明らかにされていない。ストレスの多い現代社会では、不安障害は生涯罹患率が高い疾患となっており、その病態解明および治療法の開発が求められている。

(2) ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニスト、ピロカルピンを C57BL6/N 系統マウスに腹腔内投与すると、ほぼ 1 時間後に一過的なてんかん重積が起こる。このマウスがてんかん重積のダメージから回復する 3~4 日後に不安感を調べる明暗選択テストを行うと、マウスは明所部にほとんど出て来なくなることを我々は明らかにしてきた (Fig. 1)。

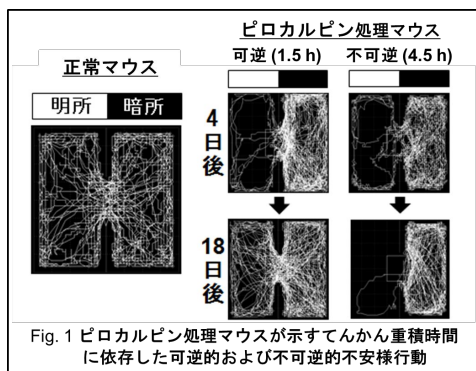


Fig. 1 ピロカルピン処理マウスが示すてんかん重積時間に依存した可逆的および不可逆的の不安様行動

(3) また抗けいれん薬フェノバルビタールを用いて、てんかん重積時間を 1 時間半、または 4 時間半に規定した C57BL6/N マウスを作製すると、てんかん重積 4 時間半のマウスは過度の不安感が 1 年以上も継続した。この結果は、マウス脳が不安様行動をとるように不可逆的な変化を起こしたことを示している。一方、てんかん重積 1 時間半のマウスではピロカルピン処理の 10~20 日後には不安様行動が見られなくなる。すなわち可逆的な脳内変化によっても、不安様行動が引き起こされることを明らかにしていた (Fig. 1)。そこで、この不可逆的・可逆的に不安様行動を示すピロカルピン処理 C57BL6/N マウスを用いて、不安および不安障害の分子メカニズムの解明を目的とする。

(4) ピロカルピン処理 C57BL6/N マウスの不安様行動と海馬における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現量には正の相関があることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

情動異常の1つである不安障害の病因解明や治療法の開発は急務である。これまでに

我々は、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニスト、ピロカルピンを投与した C57BL6/N 系統マウスに誘発されるてんかん重積の時間をコントロールすることで、過度の不安様行動を可逆的あるいは不可逆的に示すモデルマウス(ピロカルピン処理マウス)を作製することに成功している。またピロカルピン処理マウスの強い不安様行動と精神疾患に関係の深い脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現量に正の相関があることを見出している。そこで本課題では、ピロカルピン処理マウスにおいて BDNF の発現上昇が、不安様行動をどのように引き起こすのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳由来神経栄養因子 (BDNF) の抗体作製と ELISA による高感度定量法の確立

BDNF の前駆体であるプロ (pro)BDNF と成熟 (mature) BDNF は、それぞれ異なる受容体 (低親和性 p75 受容体, TrkB 受容体) に結合し、別々な生理作用を引き起こす。そのため BDNF 研究においては proBDNF と mature BDNF を明確に区別して実験をしなければならぬ。

これまで proBDNF および mature BDNF に特異的な高親和性の抗体、そして、2 つを区別して高感度に定量する実験系が市販されていないことが BDNF 研究を推進する上で大きなネックとなっていた。そこで我々は proBDNF および mature BDNF に特異的なウサギポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体を作製した。さらに得られた抗体を用いて、proBDNF および mature BDNF のサンドイッチ ELISA による高感度定量法の確立を行った。

(2) ピロカルピン処理マウスにおける BDNF の組織化学的検討

作製した proBDNF および mature BDNF に特異的な抗体を用いて、ピロカルピン処理 C57BL6/N マウス脳免疫組織化学を行った。また、マウス BDNF cDNA をクローニングし、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて BDNF mRNA の組織化学的解析も行った。

(3) BDNF ノックアウトヘテロマウスと低親和性 p75 受容体ノックアウトマウスに対するピロカルピン投与実験

入手した BDNF ノックアウトヘテロマウスと p75 受容体ノックアウトマウスは C57BL6/J 系統であった。そこで最初に野生型 C57BL6/J 系統マウスにピロカルピン処理を行った。しかしながら、非常に興味深いことに C57BL6/N マウスと同量のピロカルピンでは、C57BL6/J マウスにてんかん重積はほとんどひき起こせなかった。そこでピロカルピンを増量すると、C57BL6/J マウスは、てんかんを伴う突然死を引き起こしてしまった。そのため、BDNF ノックアウトヘテロマウスと p75 受容体ノックアウトマウスにつ

いて、C57BL6/J から C57BL6/N マウスへの戻し交配 (バッククロス) が必要となった。BDNF ノックアウトマウスは研究期間内に戻し交配が終了したので、ピロカルピン投与実験を行った。p75 受容体ノックアウトマウスについては戻し交配の途中である。

(4) マイクロダイアリシス法によるピロカルピン処理マウスの *in vivo* BDNF 量の解析

強い不安様行動を示すピロカルピン処理 C57BL6/N マウスの脳内における proBDNF および mature BDNF の分泌量が、ストレスなどの刺激によって変動するかを明らかにするために、マイクロダイアリシス法によって脳から回収したサンプルの BDNF を高感度 ELISA 法によって定量した。

(5) ProBDNF と mature BDNF の分泌制御機構の検討

神経細胞モデル PC12 細胞およびグリア細胞モデル C6 細胞に BDNF の強制発現を行った。強制発現した proBDNF および mature BDNF の細胞免疫染色実験と分泌測定実験を行った。

4. 研究成果

(1) 脳由来神経栄養因子 (BDNF) の抗体作製と BDNF の高感度 ELISA の開発

BDNF の前駆体 (pro) 領域の配列と mature BDNF の N 末端部位の配列のペプチドを化学合成し、キャリアタンパク質にコンジュゲーション後、マウスおよびウサギに免疫した。得られた抗 proBDNF 抗体、抗 mature BDNF 抗体を用いて、培養細胞に発現した BDNF に対するウエスタンブロッティングを行った (Fig. 2)。その結果、matureBDNF、proBDNF、両方を認識する panBDNF の 3 種類の抗体を得ることができた。

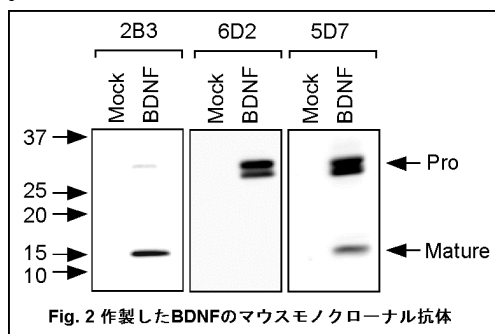


Fig. 2 作製したBDNFのマウスモノクローナル抗体

そこで、得られたこれらの抗 BDNF 抗体を用いて、サンドイッチ ELISA 実験法を行った。マウスおよびヒト組換え mature BDNF および proBDNF タンパク質を用いて検出感度の最適化を行ったところ、マウス、ヒトともに mature BDNF では 5 pg/ml, proBDNF では 10 pg/ml という低濃度サンプルであっても十分に検出可能な ELISA 実験系を確立することができた (Fig. 3)。近年、血液中の BDNF 存在量とうつ病などの精神神経疾患とに相関関係があることが明らかになりつつある。血液中の BDNF 量は ng/ml

のオーダーであり、本研究で確立した BDNF ELISA 定量系は十分に臨床検査に利用可能なレベルである。

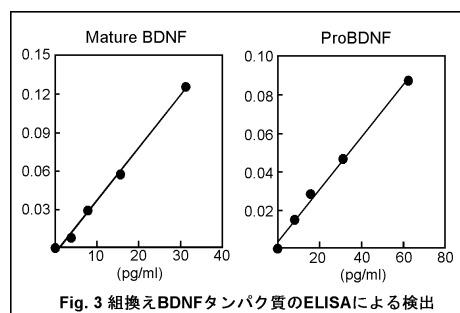


Fig. 3 組換えBDNFタンパク質のELISAによる検出

(2) ピロカルピン処理マウスにおける BDNF の組織化学的検討

C57BL6/N マウスおよびピロカルピン処理マウスの脳をパラホルムアミドで灌流固定した後、凍結およびパラフィン切片を作製し、proBDNF および mature BDNF の免疫染色を行った。ピロカルピン処理マウスの方が、染色性が高くなる傾向が見られたが、条件により染色パターンが大きく異なっており、今後条件の再検討が必要である。

つぎにコントロールマウスおよびピロカルピン処理マウス脳の BDNF *in situ* ハイブリダイゼーション実験を行った。しかしながらコントロールマウスにおいては、有意な BDNF mRNA のシグナルを得ることができなかった。それに対して、ピロカルピン処理マウスの海馬 CA3 錐体細胞および歯状回顆粒細胞で有意なシグナルを検出できた。グリア細胞に BDNF mRNA が存在しているかどうかははっきりしなかった。現在、コントロールマウスの BDNF mRNA も検出できるように実験系の最適化を行っている。

(3) BDNF ノックアウトヘテロマウスに対するピロカルピン投与実験

C57BL6/N マウスに戻し交配した BDNF ノックアウトヘテロマウスにてんかん重積 4.5 時間のピロカルピン処理を行った後、明暗選択テストを行った。戻し交配をすることで、効率よくてんかん重積を引き起こすことが可能であった。BDNF 遺伝子が片方の染色体にしかないことから、BDNF タンパク質の発現量が減り不安様行動が緩和されることが期待された。

しかしながら、BDNF ノックアウトヘテロマウスは、コントロールマウスとほぼ同程度

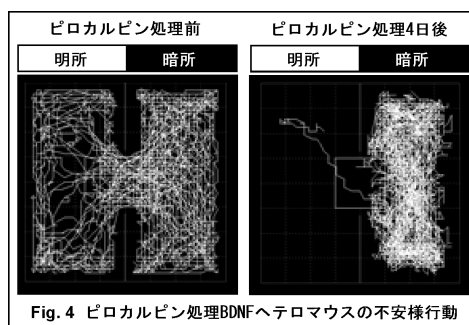


Fig. 4 ピロカルピン処理BDNFヘテロマウスの不安様行動

の不安様行動を示した。この結果から、BDNF の増加量が 2~3 倍でも不安様行動を示すことがわかった(Fig. 4)。またこの不安様行動は少なくとも 1 ヶ月間は持続した。今後はもっと長期間観察した場合、不安様行動が回復するかを検討していく予定である。

(4) マイクロダイアリシス法によるピロカルピン処理マウスの *in vivo* BDNF 量の測定

麻酔下でピロカルピン処理マウスの海馬にペプチド用のマイクロダイアリシスプローブを挿入する。手術の影響からの回復を待つため 2 日以上経ってから、フリームービング下で 30 分または 1 時間ごとに海馬灌流液の BDNF 量を高感度 ELISA 法によって測定した。灌流溶液を高カリウム溶液にすると、サンプル中の BDNF が増えることを確認できた。しかしながら、回収効率が悪いためか、検出限界付近なため定量が難しく、今度実験系の最適化が必要である。

(5) ProBDNF と mature BDNF の分泌制御機構の検討

PC12 細胞および C6 細胞に BDNF を強制発現し、ウエスタブロットングにより発現パターンを調べると、PC12 細胞では proBDNF, matureBDNF の両方が存在するのに対し、C6 細胞ではほとんど proBDNF のみであった。2 つの BDNF の分泌制御機構の比較を目的としたため、PC12 細胞を用いて BDNF の分泌量の測定を行った。Ca²⁺イオノフォアであるイオノマイシン処理を行うと mature BDNF はほとんど分泌されないのに対し、proBDNF はイオノマイシン刺激依存的な分泌が観察された(Fig. 5)。

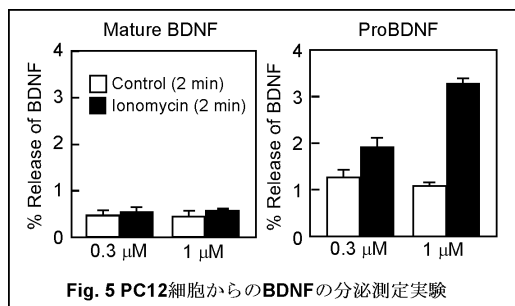


Fig. 5 PC12細胞からのBDNFの分泌測定実験

また高カリウム刺激を行うと mature BDNF においても刺激依存的な分泌が観察されるが、proBDNF よりもカリウムを高濃度にする必要があった。これらの結果は、mature BDNF と proBDNF が異なる分泌小胞に蓄積していることおよびその分泌制御メカニズムが異なることを示している。今後、これらの分泌制御メカニズムを明らかにしていくことで、うつ病をはじめとするさまざまな精神神経疾患の治療法の開発に寄与できると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Makoto Itakura, Taro Ohkido, Masami

Takahashi, Persistent activation of calpain is correlated with hippocampal neuronal death in pilocarpine-treated C57BL/6N mice. The Kitasato Medical Journal, 査読有, Vol. 44, No.2, 158-166, 2014

<http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KMJ44-2/KMJ44-2.html>

[学会発表](計 5 件)

板倉 誠、永田 悦子、菅谷 津貴子、高橋 正身、AMPA 型グルタミン酸受容体結合タンパク質 TARP, γ -8 はカルボキシ末端側の細胞内領域で、インポーチン 81 と結合する。第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日-18 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

飯田 諭宜、小島 孝仁、永山 博通、山森 早織、板倉 誠、笹岡 俊邦、宮岡 等、高橋 正身、ドーパミン D2 レセプターはマウスの不安様行動に関与している。第 57 回日本神経化学大会、2014 年 9 月 29 日-10 月 1 日、奈良県文化会館・奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

板倉 誠、不安様行動を示すピロカルピン処理マウスの解析、第 26 回日本総合病院精神医学会総会、招待講演、2013 年 11 月 29-30 日、京都テルサ(京都府京都市)

大城戸 太郎、板倉 誠、山森 早織、渡辺 滋、宮岡 等、高橋 正身、Calcium-binding protein calretinin is highly expressed in CA3 neurons of epileptized brain in pilocarpine model. 第 55 回日本神経化学大会、2012 年 9 月 30 日-10 月 2 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

板倉 誠、大城戸 太郎、菅谷 津貴子、山森 早織、深谷 昌弘、阪上 洋行、高橋 正身、Subunit-specific degradation of N-methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. 第 35 回神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板倉 誠 (Itakura Makoto)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：30398581

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

深谷 昌弘 (Fukaya Masahiro)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：10360900

居原 秀 (Ihara Hideshi)
大阪府立大学・理学研究科・准教授
研究者番号：60254447

(4) 研究協力者

高橋 正身 (Takahashi Masami)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：10318826

山森 早織 (Yamamori Saori)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：30464803

菅谷 津貴子 (Sugaya Tsukiko)
北里大学・医学部・技術員

永田 悦子 (Nagata Etsuko)
北里大学・医学部・技術員