

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791225

研究課題名(和文) PTSDモデル動物におけるNF- κ Bを標的としたバイオマーカー探索研究

研究課題名(英文) Biomarker research about PTSD featuring for inflammation.

研究代表者

吉井 崇喜 (Yoshii, Takanobu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50468261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：PTSDのモデルストレスを負荷したラットの脳MRI形態解析を行い、萎縮部位でのバイオマーカー探索を目指した。モデルストレスにはsingle-prolonged stress(拘束2時間・強制水泳20分・エーテル麻酔を連続負荷)を用いた。画像データをVBM解析した結果、両視床・感覚野に有意な萎縮を認め(PTSDモデル:n=18, Sham:n=17; set level $p<0.001$, cluster-FWE corrected $P<0.05$)、同部位において活性化ミクログリアのマーカーであるIba-1の免疫反応増大を認めた。これによりミクログリアの活性化が萎縮に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We sought bio-marker in PTSD via small animal brain MRI. Single-prolonged stress (SPS: 2hour-restraint, 20min-forced swimming, and ether anesthesia) was applied for PTSD model stress and ex-vivo brain MRI acquisition was conducted. Using voxel-based morphometry, significant 3 atrophic clusters were detected in the sensory area, and thalamus (SPS: n=18, Sham: n=17, cluster-FWE corrected $P=0.001$). We also conducted immunohistochemistry for Iba-1 as a marker of activated microglia in these areas, and significant increase in Iba-1 immunoreactivity was confirmed. These results suggest that microglial activation may lead to brain atrophy via neuroinflammation mechanisms in the paradigm of PTSD model stress.

研究分野：精神医学

キーワード：PTSD ストレス 小動物MRI

1. 研究開始当初の背景

PTSDはストレスによって発症するとされる精神疾患として代表的なものであるが、臨床においてストレスと疾患の因果関係を立証することは難しい。診断は問診と操作的診断基準、いくつかの臨床心理検査によるため生物学的な根拠に乏しい。

PTSDを対象とした臨床研究はすでに行われており、voxel-based morphometry (VBM) による解析で萎縮が指摘されている部位があるが、これらは病態を完全には説明できていない。

一方で、PTSDのモデル動物については幾つか提案されており、Liberzonらによって開発された single prolonged stress はその一つである。上記を用いた動物実験による病態生理学研究は行われているが、ヒトにおける病態生理的明や治療につながるような知見は十分ではない。ヒトを対象とした研究と同様の手法を用いることは動物実験と臨床研究を橋渡しするトランスレーショナルな観点において有意義と考えられる。

また、ストレスと炎症の関係は深く、脳内の炎症にミクログリアが関与していること、ストレスにより脳内のミクログリアが活性化しうることは確立している、ミクログリアの活性化と脳の萎縮が関係しているという報告も多い。我々はミクログリアの活性化マーカーが PTSD のバイオマーカーたりうる可能性があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

PTSDモデルストレスを付加した動物においては、年齢・性別・ストレス環境などを均一にすることが可能であり、ストレス以外の要素をなるべく排除しつつ、ストレスと脳の形態変化の因果関係を明確化することができる。上記の方法論のもとで、小動物MRIを施行し、そのデータに対する網羅的形態解析を行うことで、ストレスと因果関係のある傷害部位部位を探索することを第1の目的とした。

また、上記の目的を達成したのちに、萎縮部位でミクログリアの活性化について検証し、ミクログリアの活性化マーカーを主たる標的としてバイオマーカー探索を試みることを第2の目標とした。

3. 研究の方法

7週齢の雄性SDラットにPTSDのモデルストレスとして single prolonged stress を負荷し、負荷7日後に灌流固定を行い頭蓋骨ごと脳を取り出し、MRI画像を撮影した。対照についてはエーテル麻酔のみ負荷し、同様に7日後に画像を取得した。得られた画像について Statistical parametric mapping 8を用いて標準化を行い、VBMによる形態解析を行った。

上記により、萎縮が指摘された部位に対して活性化ミクログリアのマーカーである

Iba-1 に対する抗体を用いて蛍光免疫組織化学を施行し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510Meta) を用いて撮像を行った。画像解析ソフトウェアについては Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いた。

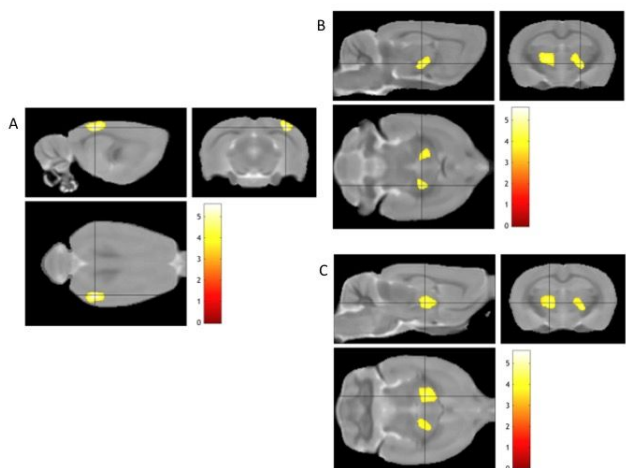
4. 研究成果

画像データを VBM 解析した結果、両側視床・右感覚野に有意な萎縮が判明した (PTSDモデル: n=18, Sham: n=17; set level $p < 0.001$, cluster-FWE corrected $P < 0.05$)。同部位について抗 Iba-1 抗体を用いて蛍光免疫組織化学を行ったところ、視床においては Iba-1 陽性細胞の有意な肥大を確認でき、同陽性細胞の数が増大する傾向にあった。また、感覚野においては、Iba-1 陽性細胞の肥大と細胞数の増大共に有意であった。

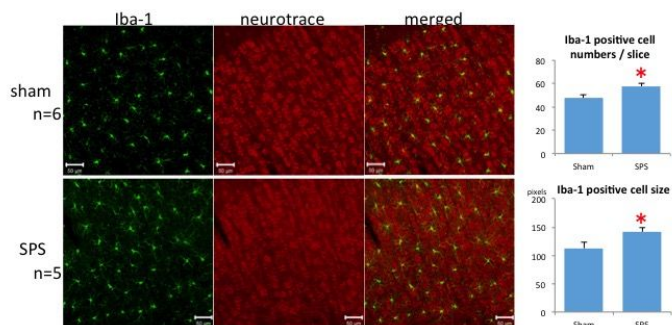
動物実験においては性別・生育環境・ストレス内容・期間・遺伝素因などほぼ均一と推定され、本研究で得られた萎縮部位とストレスとの関係は極めて強固であると考えられる。また、同部位においてミクログリアの活性化マーカーの増強が確認されており、病態生理として、慢性炎症の影響としての萎縮の可能性があると考えられた。

バイオマーカーの探索については研究期間終了のため断念した。

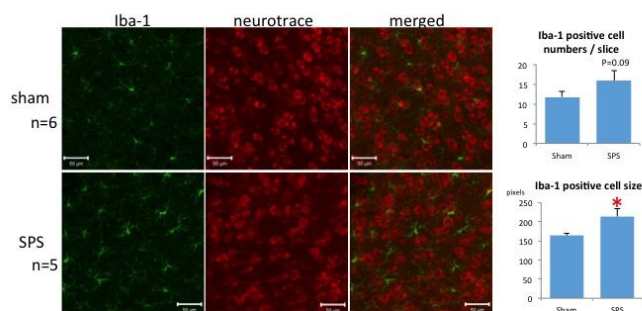
< 図 1 > Voxel based morphometry 結果：視床・感覚野での萎縮が指摘されている。PTSDモデル: n=18, Sham: n=17; set level $p < 0.001$, cluster-FWE corrected $P < 0.05$)



<図2> 感覚野における Iba-1 免疫染色：Iba-1 陽性細胞数・細胞体の大きさが有意に大きくなっている。



<図3> 視床における Iba-1 免疫染色：Iba-1 陽性細胞は有意に肥大している。



5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

吉井崇喜 大石直也 生駒和也 西村伊三男 酒井雄希 松田賢一 河田光博
Ex-vivo MRI による PTSD モデルストレス負荷後の脳灰白質形態解析
第 120 回日本解剖学会
2015.3.21-3.23 神戸国際会議場 (兵庫県、神戸市)

吉井崇喜 大石直也 生駒和也 城戸優充 西村伊三男 酒井雄希 松田賢一 河田光博
PTSD モデルストレスを蒸したラットにおける Voxel-based Morphometry による脳灰白質体積解析
第 37 回日本神経科学大会
2014.9.11-9.13 パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

大石直也 吉井崇喜 福山秀直
ラット脳の Voxel-based Morphometry における Non-Local Means ノイズ除去フィルタの効果
第 37 回日本神経科学大会
2014.9.11-9.13 パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉井 崇喜 (Yoshii Takanobu)
京都府立医科大学 大学院医学研究科
精神機能病態学 講師

研究者番号 : 50468261