

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860928

研究課題名(和文) PTSDにおける脳由来神経栄養因子の治療効果およびエピジェネティクス解析

研究課題名(英文) The therapeutic potential of BDNF and epigenetic changes in the animal model of PTSD.

研究代表者

淵上 学 (Fuchikami, Manabu)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40403571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)： PTSDモデル動物を用い、恐怖記憶の消去障害の形成に關与する脳由来神経栄養因子(BDNF)の役割を検討した。PTSDモデルラットは恐怖記憶の消去障害を呈し、恐怖条件付け後の消去訓練直前におけるBDNF発現が、PFC、海馬ともに減少していた。次にIL mPFC、腹側海馬へのBDNF投与によってのみ、恐怖条件付け24、48時間後の時点で有意なすくみ行動の短縮を認めた。

BDNF投与はPTSDの新たな治療手段となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we examined the effect of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the impaired fear extinction of the animal model of PTSD. The rat model of PTSD exhibited the impaired fear extinction and the decrease of the expression of BDNF protein just before extinction training in both prefrontal cortex (PFC) and hippocampus. In addition, the micro-infusion of BDNF into infralimbic PFC and into ventral hippocampus reduced the freezing of PTSD model rat 24hr and 48hr after fear conditioning.

Our results indicates the potential of BDNF as a new therapeutic agent for the treatment of PTSD.

研究分野：分子精神医学

キーワード：心的外傷後ストレス障害 脳由来神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

近年、不安障害の一つである外傷後ストレス障害 (posttraumatic stress disorder: PTSD) の病態形成において、恐怖記憶の消去障害が密接に関与することが提唱されている (Kaplan and Moore, 2011; Myers and Davis, 2007)。しかしながら PTSD 治療の第一選択薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) は、本障害の主要症状である恐怖記憶の消去障害には有効ではなく、消去を促進させる薬物が新たな PTSD 治療薬として注目されている。脳局所の破壊実験や神経活動に影響を及ぼす薬物の局所投与実験などから、消去の過程には内側前頭前野皮質 (IL mPFC) の神経可塑性が必要であることが報告されている (Quirk and Mueller, 2008) が、その詳細な分子メカニズムは未解明である。神経細胞の分化、生存に関与している事が報告されている BDNF は、海馬での含有量が高く、グルタミン酸神経伝達の促進や、海馬の長期増強 (long-term potentiation: LTP) に影響することなどから、以前より学習・記憶に深く関与していることが示唆されていた (Bramham and Messaoudi, 2005)。最近、海馬、IL mPFC への BDNF および BDNF 活性中和抗体投与による研究より、恐怖記憶の消去には、海馬での BDNF 産生と IL mPFC での機能発現が必要であることが報告された (Peters et al., 2010)。

また、当該申請者の所属する研究室では、これまで、表面妥当性、構成概念妥当性、予測妥当性を満たす PTSD モデルとして single prolonged stress (SPS) パラダイムを開発し、SPS ラットが顕著な恐怖記憶の消去障害を呈することを報告してきた (Yamamoto et al., 2009)。

これらの背景から、PTSD における恐怖記憶の消去の障害においても、海馬 IL mPFC における BDNF の発現障害が関与していることが予想され、本研究においては、課題 1) として、SPS ラットに対して、恐怖記憶の固定化及び消去の過程において、BDNF を海馬や mPFC の subregion に投与することで、恐怖記憶の消去障害の形成に関与する BDNF の役割を明らかにする。

また、PTSD は重篤なストレス事象への暴露後 1 か月以降に診断される疾患であり、環境因が発症に緊密に関連している。このような発症過程をもつ疾患は、遺伝的要因のみではなく、遺伝子環境相互作用によって発症する可能性が提唱されている (Maddox et al., 2013)。そこで、本研究では、課題 2) として、SPS ラットを用い、恐怖条件付け 消去の各時点で、PFC や海馬における BDNF の mRNA、protein に加え、ヒストン修飾や DNA メチル化を計測し、対照群と差を認められた部位・時点にヒストン・アセチル基転移酵素 (HAT) あるいはヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (HDAC inhibitor) を注入し、消去障害に対する効果を評価する。

本研究の特色は、PTSD モデルの主要症状 (恐怖記憶の消去障害) における BDNF の局所での機能と関与する神経回路を明らかにする点にある。正常ラットを用いた、BDNF の局所投与による消去の改善は既に報告されているが、疾患モデルを用いた治療応用につながる研究はない。当研究は、恐怖記憶の消去障害の改善を機序とする、新規の PTSD 治療薬の開発につながる画期的な研究である。同様に、消去障害における BDNF のエピジェネティックな機構による遺伝子発現の変化に関しても、いくつか報告はあるが、疾患モデルを用いた研究はない。加えて、エピジェネティックな作用機序を有する薬物投与による PTSD 治療の試みは他になく、現存する薬物の臨床応用につながる、非常に独創的かつ有意義な研究である。

2. 研究の目的

外傷後ストレス障害 (PTSD) の難治化には、強固な恐怖記憶の固定化による恐怖記憶の消去 (安全な記憶に置き換わる: extinction) 障害の密接な関与が報告されている。PTSD の恐怖記憶の消去障害は既存の向精神薬に抵抗性であり、消去を促進させる新たな PTSD 治療薬が希求されている。最近、通常ラットにおける脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) の脳局所への投与が、消去を促進する事が報告された。本研究では PTSD モデルラットに対し、脳局所への BDNF 投与を多様な時点で行い、PTSD 治療における BDNF の応用法を検討する。加えて、各時点と多様な脳部位における BDNF の mRNA、タンパク量を計測し、PTSD の病態形成における BDNF の発現変化を解析する。また、発現変化の見られた部位、時点でのエピジェネティックな変化も解析し、ヒストン・アセチル化や DNA メチル化に作用する薬物の投与による恐怖記憶の消去の亢進も試みる。本研究の目的は、上記実験結果から、新たな PTSD 治療薬の開発の基盤を構築することである。

3. 研究の方法

課題 1) 定位脳手術にて、カニューレ挿入を行い、SPS 負荷にて、PTSD モデル状態を作成する。SPS 負荷後、恐怖条件付け extinction training - extinction test の各処置前後で、脳内の局所への BDNF 投与を行い、恐怖記憶の消去の程度を評価する。

課題 2) SPS 負荷後、恐怖条件付け extinction training - extinction test の各処置前後で、BDNF の mRNA 発現、タンパク発現、プロモーター領域のヒストン・アセチル化と DNA メチル化を計測し、通常飼育群と SPS 群の間で比較する。2 群間で有意差が見られた時点、部位に対し、SPS で変化しているエピジェネティックな変化を打ち消す薬物を投与し、恐怖記憶の消去の障害を評価する。課題 1: SPS ラットの extinction の障害に対する、脳局所への BDNF 投与による治療効果の解析

8週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに対し、研究方法欄に示す手法で、PFC、海馬にカニユレ留置を行う。一週間の回復期間の後、これまでの本申請者らの方法に準拠して、研究方法欄に記すように PTSD モデルラットである SPS ラットを作成する。SPS 負荷後1週間のラットに恐怖条件付けを行い、1日後に extinction training を、2日後に extinction test を行う。恐怖条件付け後、extinction training 前後、extinction test 前後の各時点で、PFC、海馬に BDNF を投与し、恐怖記憶の消去の程度を評価する。対照群は、control-PBS 投与、control-BDNF 投与、SPS-PBS 投与、SPS-BDNF 投与の4群間で行う。脳局所に投与した BDNF の拡散は、その受容体である TrkB のリン酸化抗体を用いた免疫組織染色により評価する。注：control とはストレス(-)の未処置ラット。

課題2：エピジェネティクスから考える、SPS ラットにおける、BDNF 発現調節変化の解析及び extinction 障害の新規治療法の開発
9週齢のSDラットを用いてSPSラットを作成する。課題1と同様に、恐怖条件付け extinction training - extinction test を行うが、恐怖条件付け後、extinction training 前後、extinction test 前後の各時点で、断頭後に海馬、PFC を摘出する。詳細は研究方法欄に示すが、mRNA の計測は、組織から RNA の抽出、cDNA の合成、real-time PCR 法によって行い、タンパク発現はウエスタンブロット法で定量する。申請者が属する研究室には BDNF に深く精通した研究者が所属しており、常に的確なアドバイスを求めることができる環境にあるため、共同で研究を行うことで不測の事態にも十分に対応できる。BDNF のプロモーター領域のヒストン修飾は、クロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation: ChIP) を行った後に、real-time PCR 法にて定量し、DNA メチル化の測定は、SEQUENOM 社の MassARRAY System を用いて行う。エピジェネティクス解析は比較的新しい技術であるが、申請者は、BDNF のヒストン修飾解析および DNA メチル化解析に習熟し、既に論文発表も行っており (Fuchikami et al., 2009, 2011)、スムーズに研究を開始できる。

研究計画・方法(つづき) (研究方法)

1) SPS 負荷：拘束ストレス 2 時間・強制水泳 20 分・エーテル深麻酔、の連続暴露後 7 日間の無接触期間を経て形成される。

2) 定位脳手術：Stoelting 社の脳定位固定装置を用いて行う。用いるカニユレ及びインジェクターは plastic one 社の小動物専用器具を用いる。局所投与の位置は、The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos and Watson, 1998) を参照し、ブレグマからの距離にて決定する。

3) 恐怖条件付け extinction training -

extinction test：初日にラットを Chamber (CB) に 3 分間入れた後に Footshock (FS, 0.8mA, 4 秒間) を与え、24 時間後に同じ CB に FS なしで 20 分間暴露し (extinction training)、48 時間後にすくみ行動の長さを評価する (extinction test)。

4) 免疫組織染色：BDNF の脳内局所への投与の 1 時間後に、10%ホルマリンを用いて、経心臓的灌流固定を行う。取り出した脳から切片を作成し、抗リン酸化 TrkB 抗体を用いて染色する。

5) mRNA 抽出：RNAqueous Phenol-free Total RNA Isolation Kit (Ambion) を用いて行う。

6) Reverse transcription (RT): QuantiTect Rev. Transcription Kit (QIAGEN) を用いて行う。

7) Real-time PCR 法：7700 Sequence Detection System (ABI/PRISM) を用いて行なう。Real-time PCR 用の primer, Taqman probe は、Gene Expression Assay (Applied Biosystem) より選択する。

8) タンパク定量：抗 mature domain BDNF 抗体を用いた免疫沈降を行った後、ウエスタンブロット法で定量する。

9) クロマチン免疫沈降法：Epi Quick Kit (Epigentek) を用いて行う。

10) DNA メチル化解析：MassARRAY System (Sequenom) を用いて行う。まず、MassARRAY System 内の sodium bisulfite 処理キットを用い、非メチル化シトシンのウラシルへの置換を行う。ラット BDNF 遺伝子のプロモーター領域のシーケンスを UCSC genome browser と Genbank から得た後に、プロモーター領域に存在する各 CpG サイトをカバーする複数の PCR 用プライマーを、MassARRAY System 上の EpiDesigner を用いて設計し、Methylation specific PCR を行い、in vitro transcription を施行する。U 特異的切断後、MassARRAY MALDI-TOF MS を用いて DNA メチル化を質量分析法にて定量した後、EpiTyper を用いて DNA メチル化のデータを取得する。

4. 研究成果

本研究では、顕著な Ext 障害を呈する PTSD モデルである single prolonged stress (SPS) パラダイムを用い、BDNF を海馬や mPFC の subregion に投与することで、Ext 障害の形成に関与する BDNF の役割を検討した。カニユレ留置のための定位脳手術の一週後に SPS 処置を行い、さらに一週後に文脈的恐怖条件付け試験を行い、Ext 障害を評価した。局所投与の標的領域は、IL mPFC、Prelimbic (PL) mPFC、腹側海馬とし、恐怖記憶の Ext に関しては、恐怖条件付け 24, 48 時間後で評価した。

先行文献と同様に、PTSD モデルである SPS ラットは、恐怖記憶の消去障害を呈した。また、SPS ラットでは、恐怖条件付け後の消去訓練直前における BDNF 発現が、PFC、海馬ともに減少していた。次に IL mPFC、腹側海馬

への BDNF 投与によって、SPS 群と比較し恐怖条件付け 24, 48 時間後の時点で有意なすくみ行動の短縮を認めた。一方で、PL mPFC への BDNF 投与は、SPS 群との間に有意なすくみ行動の変化をもたらさなかった。

SPS ラットでは、消去訓練直前での BDNF 低下を認めており、PTSD の病態において、恐怖記憶の固定化促進と消去障害が共に存在する可能性が示唆された。

また、BDNF 投与は PTSD の新たな治療手段となり得る可能性があり、また、これまで通常ラットにおいて BDNF 投与後消去訓練なしでも恐怖記憶の消去が促進した結果があることから、安全な環境での訓練と無関係に改善効果を示す可能性も示唆された。

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 1 件)

1. 片岡努、淵上学、岡田怜、野島真土、長嶋信行、森信繁

「PTSD モデルラットにおける恐怖記憶の消去障害に対する 脳由来神経栄養因子 Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) 脳局所投与の効果の検討」第 45 回日本神経精神薬理学会 第 37 回日本生物学的精神医学会 合同年会、発表年月日 2015 年 9 月 25 日、発表場所タワーホール船堀(東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

淵上 学 (FUCHIKAMI MANABU)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：40403571