

令和元年6月18日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03123

研究課題名(和文) 情動を制御するBDNFの直接効果の解明

研究課題名(英文) Regulatory role of BDNF on emotional and cognitive function

研究代表者

田中 謙二 (Kenji, Tanaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：30329700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現が増えること・減ることが気分を変化させ、精神疾患発症に関与すると考えられていた。本研究では、この仮説を実験動物個体で証明することに取り組んだ。BDNFの発現を時期特異的、脳領域特異的に増やす・減らす介入を行った。ストレス負荷が無いと考えられる通常飼育では、いかなる介入も情動・認知に影響を与えなかった。涙の基礎分泌を自律神経応答の指標として、ストレス負荷からの回復過程を調べたところ、BDNFの発現低下は、ストレスからの回復を遅くさせた。このことから、BDNFは健康な状態よりもむしろストレスが負荷された状態において、機能を発揮する分子であると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病のバイオマーカーとして血液中のBDNF量が注目されている。これまでは、うつ病の診断基準を満たすかどうかで疾患群と健常群を分けて解析されてきた。今回の研究から、BDNFはうつ病の直接的な原因というよりも、ストレス応答にかかわる分子であることが示唆された。それにより、ヒトにおいて高ストレス状態・低ストレス状態の分類や、ストレスレジリエント・ストレス脆弱の分類を設けて、BDNF量を解析することを提案できる。うつ病のかかりやすさや初期症状をストレス応答で切り分ける研究へと展開することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：It is well accepted that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is involved in the synaptic plasticity. Human studies demonstrated that serum BDNF amount can be used as a biomarker of neuropsychiatric conditions. However, how BDNF directly regulates brain higher functions is still unknown. Here we developed BDNF gene modifying mice in which BDNF gene expression was capable of time- and region-dependent manipulation. In the stress-free condition, up- or down-regulation of BDNF gene expression did not cause any anxiety-like and depression-like behaviors. In the stressful condition, down-regulation of BDNF gene expression impaired the autonomic function characterized with basal tear secretion. In particular, down-regulation of BDNF expression delayed a recovery from the stress. We conclude that levels of BDNF expression affect the stress resilience in stressful condition but not in stress free condition.

研究分野：神経化学

キーワード：BDNF うつ病 多機能遺伝子改変 肥満

1. 研究開始当初の背景

脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) は、神経発生に必須の分子として同定されたが、今では神経可塑性の big player として広く認められている。特に、スパイン可塑性、シナプス伝達の可塑性については実験動物の発達期、成体期ともに一貫してポジティブな関与が報告されており、細胞レベルのミクロな場面での重要性は疑う余地がない。個体レベルの研究成果に目を向ければ、豊かな環境での飼育、運動負荷、抗うつ薬投与によって脳内 BDNF が増加することは実験動物で繰り返し報告されている。更に進んで、血中 BDNF レベルがうつ病期に下がり、回復後に戻ることが報告され、病態と神経可塑性変容の理解をつなぐバイオマーカーとしての期待が高まっている (Brunori et al., IJNP 2008; Molendijk et al., Mol Psychiatry 2014)。

しかし BDNF が低下すればうつになり、増加すればレジリエント (うつに抵抗性がある) になるという単純化は間違っている。これまでのモデル動物研究をまとめると、うつモデルにおいては前頭葉や海馬で BDNF シグナルが低下し、側坐核で BDNF シグナルが増加することが確からしいとされており (Russo et al., Nat Rev Neurosci 2013)、脳の「どの領域」の BDNF に注目するかで実験結果が異なってくる。

BDNF が情動をどのように制御するのか。言い換えると、BDNF の多寡によって行動がどのように変化するのか。行動に及ぼす BDNF の直接的な働きは何か。この疑問に答えられない限り、BDNF は「重要な分子」という曖昧な称号を与えられたまま真の理解が止まってしまう。BDNF の情動への直接的な作用を、脳領域ごとの作用に切り分けて解明するためには、BDNF 発現レベルを実験動物個体で自在に操作する系が必須となる。

申請者はテトラサイクリン遺伝子発現誘導システムを応用した多機能遺伝子改変システム (FAST システム) を独自に樹立し、一つの遺伝子を時期特異的に、細胞種特異的に増加・減少することに成功している。この FAST システムを BDNF 遺伝子に搭載したマウスを用いて、脳領域ごとの BDNF の役割を調べる、時期特異的な BDNF の役割を調べることが期待できる。

2. 研究の目的

精神疾患の病態生理解明を目指し、BDNF が情動・行動に及ぼす直接的な影響を明らかにすることを目的とする。多くの観察研究の結果から、うつ病の病態には、前頭葉や海馬での BDNF シグナルの低下と側坐核での BDNF シグナルの増加が関与していると言われている。BDNF シグナルを領域特異的に増加させる実験系が存在しないことから、側坐核の BDNF シグナル亢進が情動の制御にどのように関わっているか不明のままである。本研究では、BDNF 遺伝子の多機能遺伝子改変マウスを利用して、側坐核特異的に、かつ時期特異的に BDNF 量が増加するマウスを作成する。このマウスを用いることによって、側坐核での BDNF 増加が情動・認知にどのような影響を与えるのか、その直接的な効果を明らかにする。

3. 研究の方法

正常の BDNF 発現から BDNF 発現が低下した状態に変わったときに、情動・認知がどのように変化するのか、行動バッテリー、オペラント課題を用いて明らかにする。多機能遺伝子改変マウスを用いて、BDNF mRNA isoform クラスターの発現を時期特異的に操作する。側坐核の BDNF 発現が増加した状態は、ドパミン神経の BDNF mRNA 発現を恣意的に増やし、軸索末端から BDNF を発現させることによって実現する。情動・認知がストレス負荷によってどのように変化するのかも調べる。以上の研究によって BDNF の増加が認知・情動をどのように制御するのか、ストレス応答をどのように制御するのか明らかにする。

4. 研究成果

(1) BDNF mRNA isoform クラスターのノックダウンマウス樹立

BDNF 遺伝子は 9 つの転写開始部位を持ち、9 つの mRNA isoform を持つ。全脳 BDNF ノックダウンマウスとして 2 種類のマウスを樹立したところ、exon 4 に STOP cassette をノックインしたマウス (BDNF STOP knockin) は、exon 1,2,3 由来の mRNA の発現が消失し、exon 4 を中心に tet system で遺伝子発現を操作したマウス (Actin-tTS::BDNF tet0 knockin) は exon 4,5,6,7 由来の mRNA の発現が消失していることがわかった。いずれのマウスも、total の BDNF mRNA の発現が約半分になっているが、前者は神経細胞由来の BDNF mRNA が抑制され、後者は、神経およびグリア細胞由来の BDNF mRNA が抑制されていた。前者は体重が少なく、後者は体重が増える傾向にあった。

(2) 側坐核 BDNF 過剰発現マウスの行動解析

BDNF tet0 knockin と dopamine transporter-tTA マウスを交配して得られるダブルトランスジェニックマウスでは、ドパミン神経で BDNF mRNA の発現が増えており、その軸索終末である側坐核で BDNF 蛋白質の増加が得られている。ドキシサイクリン存在下でオペラント行動を覚えさせ、学習成立後に BDNF 増加を誘導させた。オペラント行動の一つである 3-choice serial reaction time task を行い、意欲、注意、衝動性、固執性、運動、食欲を経時的に評価したところ、いずれの項目にも BDNF 発現誘導と非誘導で有意な変化が見られなかった。またオープンフィールドテスト、高架式十字迷路でも、発現誘導と非誘導の within 解析で有意な差を見いだすことができなかった。以上の結果から、側坐核 BDNF 過剰発現によって、情動・認知行動が変化することは無いと結論づけた。

(3) BDNF mRNA Isoform 1,2,3 ノックダウンマウスの行動解析

isoform 1,2,3 のノックダウンマウスのオープンフィールドテスト、高架式十字迷路テストでは有意な差は見られなかった。これらの結果は、isoform 1 単独ノックアウト、isoform 2 単独ノックアウトの最近の研究 (Neuropsychopharmacology 2016) と一致していた。さらに、既報と同じく、isoform 1,2,3 ノックダウンマウスでは、オス同士の攻撃性が亢進することを見いだした。攻撃性の亢進は意思決定の何らかの異常が背景にあると考えられたので、意思決定を含めたマウスの高次機能を広くスクリーニングできる 3-choice serial reaction time task を行った。しかしこのタスクでは BDNF isoform 1-3 ノックダウンマウスの高次脳機能の突出した異常を検出することは出来なかった。

(4) BDNF mRNA isoform 4,5,6,7 ノックダウンマウスの行動解析

isoform 4-7 のノックダウンマウスのオープンフィールドテスト、高架式十字迷路テストでは有意な差は見られなかった。一方で興味深い成果として、isoform 4-7 ノックダウンマウスは、食量増加・体重増加が見られた。ストレスコーピングとしての過食との関連が考えられた。次に、isoform 4-7 を前脳だけでノックダウンするマウスを作出した (CamK2-tTS::BDNF tet0 knockin)。このマウスでは、全身 4-7 ノックダウンとは異なり、過食・体重増加は見られなかった。このためエサ報酬を強化子とするオペラント実験が可能になった。しかし、前脳 isoform 4-7 ノックダウンにおいても、高次機能の突出した以上を検出することはできなかった。

(5) ストレス応答

BDNF シグナルの低下がストレス応答をどのように変化させるのか調べる目的で、涙の分泌量を調べた。涙の分泌量はストレス負荷時に低下し、ストレス解除後に分泌量が正常化する。豊かな環境で飼育すると、涙の基礎分泌量に変化は無いが、ストレス負荷時に見られるはずの涙分泌量低下が起こらなくなる。つまりレジリエントになる。ストレス応答、ストレス抵抗性、ストレスからの回復に BDNF がどのように関与しているか各ノックダウンマウスを用いて調べた。isoform 1-3 ノックダウンでは、ストレス負荷前から涙の分泌が低かった。isoform 4-7 ノックダウンマウスでは基礎分泌量は正常であった。isoform 4-7 ノックダウンマウスは、豊かな環境であってもストレス負荷時に涙の分泌量が低下した。このことから、涙の分泌を表現型とした場合のストレス抵抗性、ストレス負荷後の回復には、BDNF isoform 4-7 が関与することが示された。

以上の結果から、BDNF 発現の多寡は、ストレス負荷のない状態において、情動・認知に大きな影響を与えないことが明らかになった。一方で、ストレス負荷によるストレス応答、ストレス抵抗性に BDNF 発現がかかわることが自律神経応答(涙の基礎分泌)の観点から明らかになった。自律神経応答と情動・認知変化には深いかわりがあることから、BDNF の多寡の影響を、ストレス負荷ありなしで評価する展望が見えてきた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 52 件、すべて査読あり)

1. Sano K, Kawashima M, Imada T, Suzuki T, Nakamura S, Mimura M, **Tanaka KF**, Tsubota K. Enriched environment alleviates stress-induced dry-eye through the BDNF axis. *Sci Rep*. 9(1):3422.2019 doi: 10.1038/s41598-019-39467-w.
2. Turcotte-Cardin V, Vahid-Ansari F, Luckhart C, Daigle M, Geddes SD, **Tanaka KF**, Hen R, James J, Merali Z, Béique JC, Albert PR. Loss of Adult 5-HT1A Autoreceptors Results

- in a Paradoxical Anxiogenic Response to Antidepressant Treatment. **J Neurosci.** 39(8):1334-1346. 2019 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0352-18.2018.
3. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, **Tanaka KF**, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. **Cell Rep.** 24(8):2196-2210. 2018 doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.056.
 4. Kondo T, Saito R, Otaka M, Yoshino-Saito K, Yamanaka A, Yamamori T, Watakabe A, Mizukami H, Schnitzer MJ, **Tanaka KF**, Ushiba J, Okano H. Calcium Transient Dynamics of Neural Ensembles in the Primary Motor Cortex of Naturally Behaving Monkeys. **Cell Rep.** 24(8):2191-2195.2018 doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.057.
 5. Mori M, Tsutsui-Kimura I, Mimura M, **Tanaka KF**. 5-HT₃ antagonists decrease discounting rate without affecting sensitivity to reward magnitude in the delay discounting task in mice. **Psychopharmacology** (Berl). 235(9):2619-2629. 2018 doi: 10.1007/s00213-018-4954-0.
 6. Kinoshita M, Hirayama Y, Fujishita K, Shibata K, Shinozaki Y, Shigetomi E, Takeda A, Le HPN, Hayashi H, Hiasa M, Moriyama Y, Ikenaka K, **Tanaka KF**, Koizumi S. Anti-Depressant Fluoxetine Reveals its Therapeutic Effect Via Astrocytes. **EBioMedicine.** 32:72-83. 2018 doi: 10.1016/j.ebiom.2018.05.036.
 7. Miyazaki K, Miyazaki KW, Yamanaka A, Tokuda T, **Tanaka KF**, Doya K. Reward probability and timing uncertainty alter the effect of dorsal raphe serotonin neurons on patience. **Nat Commun.** 9(1):2048-2058. 2018 doi: 10.1038/s41467-018-04496-y.
 8. Takata N, Sugiura Y, Yoshida K, Koizumi M, Nishida H, Honda K, Yano R, Komaki Y, Matsui K, Suematsu M, Mimura M, Okano H, **Tanaka KF**. Optogenetic astrocyte activation evokes BOLD fMRI response with oxygen consumption without neuronal activity modulation **Glia** 66(9):2013-2023, 2018 doi: 10.1002/glia.23454.
 9. Murakami TC, Mano T, Saikawa S, Horiguchi SA, Shigeta D, Baba K, Sekiya H, Shimizu Y, **Tanaka KF**, Kiyonari H, Iino M, Mochizuki H, Tainaka K, Ueda HR. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. **Nat Neurosci.** 21(4):625-637, 2018 doi: 10.1038/s41593-018-0109-1.
 10. Chen S, Weitemier AZ, Zeng Z, He L, Wang X, Tao Y, Huang AJY, Hashimoto-dani Y, Kano M, Iwasaki H, Parajuli LK, Okabe S, Tsutsui-Kimura I, **Tanaka KF**, Liu X, McHugh TJ. Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics **Science** 359(6376):679-684. 2018 doi: 10.1126/science.aag1144.
 11. Vahid-Ansari F, Daigle M, Manzini MC, **Tanaka KF**, Hen R, Geddes SD, Béïque JC, James J, Merali Z, Albert PR. Abrogated Freud-1/Cc2d1a Repression of 5-HT_{1A} Autoreceptors Induces Fluoxetine-Resistant Anxiety/Depression-Like Behavior. **J Neurosci.** 37(49):11967-11978. 2017 doi: 10.1523/JNEUROSCI.1668-17.2017.
 12. Watabe T, Xu M, Watanabe M, Nabekura J, Higuchi T, Hori K, Sato MP, Nin F, Hibino H, Ogawa K, Masuda M, **Tanaka KF**. Time-controllable Nkcc1 knockdown replicates reversible hearing loss in postnatal mice. **Sci Rep.** 7(1):13605. 2017 doi: 10.1038/s41598-017-13997-7.
 13. Tsutsui-Kimura I, Natsubori A, Mori M, Kobayashi K, Drew MR, de Kerchove d'Exaerde A, Mimura M, **Tanaka KF**. Distinct roles of ventromedial versus ventrolateral striatal medium spiny neurons in reward-oriented behavior **Current Biology**, 27(19):3042-3048, 2017 doi: 10.1016/j.cub.2017.08.061
 14. Imada T, Nakamura S, Hisamura R, Izuta Y, Jin K, Ito M, Kitamura N, **Tanaka KF**, Mimura M, Shibuya I, Tsubota K. Serotonin hormonally regulates lacrimal gland secretory function via the serotonin type 3a receptor. **Sci Rep.** 7(1):6965, 2017 doi: 10.1038/s41598-017-06022-4.

15. Zike ID, Chohan MO, Kopelman JM, Krasnow EN, Flicker D, Nautiyal KM, Bubser M, Kellendonk C, Jones CK, Stanwood G, **Tanaka KF**, Moore H, Ahmari SE, Veenstra-VanderWeele J. OCD candidate gene SLC1A1/EAAT3 impacts basal ganglia-mediated activity and stereotypic behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(22):5719-5724, 2017 doi: 10.1073/pnas.1701736114.
16. Tsutsui-Kimura I, Bouchekioua Y, Mimura M, **Tanaka KF**. A new paradigm for evaluating avoidance/escape motivation. *Int J Neuropsychopharmacol*, 20(7):593-601, 2017 doi: 10.1093/ijnp/pyx031.
17. Natsubori A, Tsutsui-Kimura I, Nishida H, Bouchekioua Y, Sekiya H, Uchigashima M, Watanabe M, de Kerchove d'Exaerde A, Mimura M, Takata N, **Tanaka KF**. Ventrolateral Striatal Medium Spiny Neurons Positively Regulate Food-Incentive, Goal-Directed Behavior Independently of D1 and D2 Selectivity. *J Neurosci*. 37(10):2723-2733, 2017 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017.
18. Tsutsui-Kimura I, Takiue H, Yoshida K, Xu M, Yano R, Ohta H, Nishida H, Bouchekioua Y, Okano H, Uchigashima M, Watanabe M, Takata N, Drew MR, Sano H, Mimura M, **Tanaka KF**. Dysfunction of ventrolateral striatal dopamine receptor type 2-expressing medium spiny neurons impairs instrumental motivation. *Nat Commun* 8: 14304-14311, 2017 doi: 10.1038/ncomms14304.
19. Sugio H, Tohyama K, Oku S, Fujiyoshi K, Yoshimura T, Hikishima K, Yano R, Fukuda T, Nakamura M, Okano H, Watanabe M, Fukata M, Ikenaka K, **Tanaka KF**. Astrocyte-mediated infantile-onset leukoencephalopathy mouse model. *Glia* 65 (1): 150-168, 2017 doi: 10.1002/glia.23084.
20. Samuels BA, Anacker C, Hu A, Levinstein MR, Pickenhagen A, Tsetsenis T, Madroñal N, Donaldson ZR, Drew LJ, Dranovsky A, Gross CT, **Tanaka KF**, Hen R. 5-HT1A Receptors on Mature Dentate Gyrus Granule Cells are Critical for the Antidepressant Response *Nat Neurosci* 18: 1606-1616, 2015 doi: 10.1038/nn.4116.
21. Nautiyal KM, **Tanaka KF**, Barr MM, Tritschler L, Le Dantec Y, David DJ, Gardier AM, Blanco C, Hen R, Ahmari SE. Distinct Circuits Underlie the Effects of 5-HT1B Receptors on Aggression and Impulsivity. *Neuron*. 86:813-826, 2015 doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.041.

〔学会発表〕（計 27 件）

1. 田中謙二、神経科学・神経化学におけるレジリエンス研究、第 32 回日本ストレス学会学術総会、2016

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：衝動抑制薬のスクリーニング方法、及び衝動抑制薬

発明者：田中謙二、森真梨菜

権利者：慶應義塾

種類：特願

番号：2018-106619

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

名称：テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムにおける発現量を増幅させる遺伝子座とノックインによる増幅の効果

発明者：田中謙二、山中章弘

権利者：生理学研究所

種類：特許
番号：5871304
取得年：2016
国内外の別： 国内・国外

〔その他〕
ホームページ等

ホームページ：<http://psy-keiomed-ect.com/index.html>
プレスリリース：<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/2/2/28-19536/>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 暢

ローマ字氏名：SUZUKI, Toru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。