

令和元年6月19日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16395

研究課題名(和文) 心的外傷後ストレス障害におけるマイクログリア由来BDNFの多角的解析

研究課題名(英文) Multiple analysis of microglia-derived BDNF in post-traumatic stress disorder

研究代表者

井川 大輔 (Ikawa, Daisuke)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00526717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：PTSDにマイクログリア(MG)由来BDNFが関与していると仮説を立て、先行論文で恐怖消去が障害されている幼若期隔離マウス、並びにMG特異的BDNF過剰発現マウスを用いて、恐怖消去試験を行ったが、いずれも対照マウスと比較して差はなかった。しかし、幼若期隔離マウスのMG由来BDNF mRNAは、対照マウスに比べ発現が高いことを見出した。PTSD患者で異常が報告されているプレパルス抑制試験を行ったところ、通常飼育マウスと比較して幼若期隔離マウスでは、69dBのプレパルス抑制が低下していた。また、隔離時期をずらした青年期隔離マウスは通常飼育マウスとBDNF発現やプレパルス抑制に差はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初予定していた、マイクログリア由来BDNFと恐怖消去記憶消去の関連について明らかにすることは出来なかった。一方で、幼少期隔離はマイクログリア由来BDNF mRNA発現を増加させ、同時にプレパルス抑制の障害を引き起こすことを明らかにした。本研究結果は、環境因子としての社会的隔離がマイクログリア機能ならびに感覚-運動ゲーティング機構へ影響を与えることを示した。また、この社会的隔離による影響には、クリティカルピリオドが存在する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that PTSD involves microglia (MG) -derived BDNF. Fear extinction test was performed using juvenile isolated mice whose fear extinction was impaired in the previous articles, and MG-specific BDNF overexpressing mice. Neither mouse had impaired fear extinction compared to control mice. On the other hand, it was found that MG-derived BDNF mRNA of juvenile isolated mice was higher in expression than normally reared mice. In the prepulse inhibition test where abnormalities were reported in PTSD patients, 69 dB of prepulse inhibition was reduced in juvenile isolated mice compared to that of normally reared mice. In addition, there was no statically significant difference between normally reared mice and adolescent isolated mice in BDNF expression of MG and prepulse inhibition.

研究分野：神経科学

キーワード：マイクログリア BDNF 心的外傷後ストレス障害 クリティカルピリオド

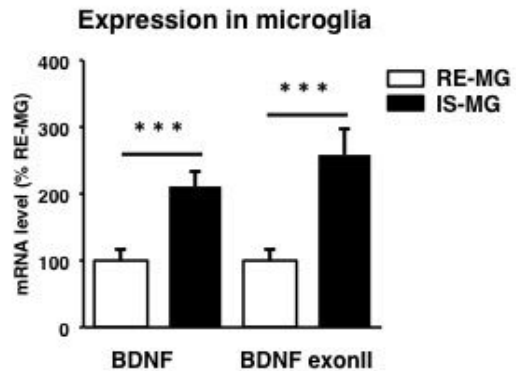
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心的外傷後ストレス障害 (Post-traumatic stress Disorder : PTSD) において、恐怖体験の記憶を消去する機能障害が病態の基盤と考えられている。記憶や学習において脳由来神経栄養因子 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は神経可塑性や記憶の固定化において重要なタンパクであり (Hall J. et al., 2000)、実際、恐怖条件付け試験において背側海馬にBDNFタンパク阻害剤を投与すると恐怖記憶形成が阻害される (Lee JL. et al., 2004)。

また、幼少期の虐待が成人期におけるPTSDの有病率を上昇させる (Widom CS. et al., 1999) ことから、虐待を模倣した動物モデルを用いてPTSDの解析が進められてきた。ネグレクトを模倣した幼若期隔離マウスは恐怖記憶の消去困難や不安様行動の増加がみられる (Pibiri F. et al., 2008; Liu JH. et al., 2015)。我々は離乳後から二週間マウスを単数で飼育する (Isolation : IS) 群と同胞と共に飼育した (Regular environment : RE) 群を作成し、大脳皮質から単離したマイクログリアの解析を行い、RE群と比較してIS群でBDNFとBDNF exon mRNAの発現量が増加していることを明らかにした (Figure 1, 未発表データ)。

Figure 1



今まで、PTSDの病態を担う部位として海馬や扁桃体、前頭前野などがあげられ、これらの部位を中心に解析が進められてきた。しかし、PTSDモデル動物でみられる海馬や扁桃体、前頭前野でのBDNFの変化は二次的なものである可能性があり、マイクログリア由来のBDNFがPTSDの病態生理を考える上で主要なターゲットになり得ると考えた。

2. 研究の目的

PTSDモデルと考えられる幼若期隔離マウスのマイクログリアではBDNFタンパクやmRNA発現が増加していること、同マウスは恐怖記憶の消去困難や不安様行動の増加がみられていること、マイクログリアの除去並びにマイクログリア特異的にBDNF発現を阻害することですくみ反応時間が低下することなどから (Parkhurst CN. et al., 2013)、PTSDにおけるマイクログリアの関与が強く示唆される。本申請では、マイクログリア特異的にBDNF発現を増加させることでPTSD様行動が誘導されると仮説をたて、PTSDの症状形成にマイクログリア由来BDNFが必須であるのが明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と飼育条件

マイクログリア特異的 BDNF 過剰発現マウス：中枢神経系の細胞において iba1 はマイクログリア特異的に発現する。この iba1 配列にテトラサイクリン抗生物質 tetracycline transactivator (tTA) を組み込んだ遺伝子改変マウスと大腸菌テトラサイクリン耐性オペロンで働く Tet0 オペレーター配列 (Tet0 配列) に BDNF プロモーターを組み込んだ遺伝子改変マウスを交配させることで、iba1 陽性マイクログリアのみで BDNF の過剰発現を引き起こすことができる。

幼若期隔離マウス：3ヶ月齢の C57BL/6J 雄と雌マウスを交配させ、児を生後 21 日目に離乳する。生後 21 日目から 34 日目まで同胞と引き離し単数飼育を行い、生後 35 日目に同胞と同居させる群を幼少期隔離 (Early Isolation : EIS) 群とし、生後 21 日目から同胞と同居させて飼育した群を通常飼育 (Regular Environment : RE) 群とした。また生後 35 日目まで同胞と同居し、35 日から 49 日目まで単数飼育を行い、その後同胞と同居させる群を青年期隔離群 (Late Isolation : LIS) とした。

(2) 恐怖消去試験

生後 56 日目以降のマウスを用いた。

Day1 (恐怖条件付け): アクリル製の小箱にマウスを入れ、3 回の電気ショックを与える (0.5mA・2 秒/回)。

Day2-5 (恐怖消去): 同じアクリルボックスに 5 分間入れ、すくみ反応時間を測定する。

(3) プレパルス抑制試験

生後 56 日目以降のマウスを用いた。

小動物驚愕反応装置 (S-R LAB startle chamber) 内のアクリル製の筒にマウスを入れ、120dBの音刺激前に、69、73、81dBのプレパルスを提示し、驚愕反応を測定した。

(3) ミクログリア単離

麻酔下で経心臓的に Phosphate Buffer Saline (PBS) を灌流し、脳から血液を除去する。脱血した脳を取り出し皮質を酵素的に切断し単細胞懸濁液を作成する。磁気細胞分離 (magnetic-activated cell sorting : Milteny Biotec) システムを用いてミクログリアの単離を行った。単離には CD11b+ マイクロビーズを用いた。

4. 研究成果

ミクログリア特異的BDNF過剰発現マウス (BI+ : n=13) と対照マウス (BI- : n=10) との比較において、すくみ反応の低下に明らかな差を認めなかった (Figure 2)。

幼少期隔離マウス (EIS : n=13) と通常飼育マウス (RE : 16) との比較において、すくみ反応の低下に明らかな差を認めなかった (Figure 3)。

今回、幼少期隔離マウスを用いた恐怖消去試験では、先行論文と同様の結果が得られず、ミクログリア特異的BDNF過剰発現マウスでも恐怖消去の障害がみられなかった。

PTSD患者ではプレパルス抑制の障害が報告されており、感覚ゲーティング機構の異常が基盤にあると推測される。幼少期隔離マウス並びに隔離時期をずらした青年期隔離マウスを用いてプレパルス抑制試験を行った (Figure 4)。通常飼育群 (RE : n=22) と青年期隔離群 (LIS : n=23) と比較し、幼少期隔離群 (EIS : n=24) はプレパルス抑制の低下がみられた。

このこれらのマウスのミクログリアを単離し、BDNF mRNAを測定した (Figure 5)。通常飼育群 (RE : n=12) と青年期隔離群 (LIS : n=12) と比較し、幼少期隔離群 (EIS : n=12) はミクログリアのBDNF mRNA発現量が有意に高値であった。

当初予定していた、ミクログリア由来 BDNF と恐怖消去記憶消去の関連について明らかにすることは出来なかった。一方で、幼少期隔離はミクログリア由来 BDNF mRNA発現を増加させ、同時にプレパルス抑制の障害を引き起こすことを明らかにした。本研究結果は、環境因子としての社会的隔離がミクログリア機能ならびに感覚-運動ゲーティング機構へ影響を与えることを示した。また、この社会的隔離による影響には、クリティカルピリオドが存在する可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小森 崇史、井川 大輔、牧之段 学、奥村 和生、山下 泰徳、紀本 創兵、鳥塚 通弘、山内 崇平、岸本 年史、ミクログリア由来脳由来神経栄養因子 (BDNF) と心的外傷後ストレス障害 (PTSD)、第113回日本精神神経学会学術総会、2017年6月22日-24日、名古屋国際会議場

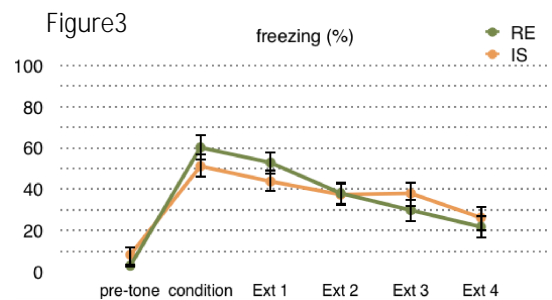
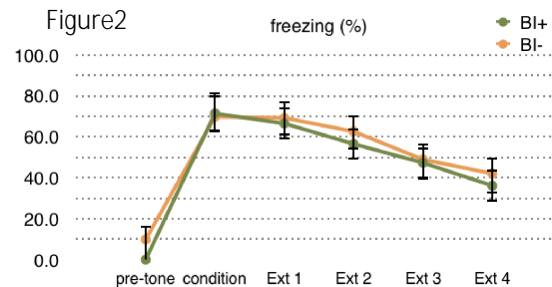


Figure 4 PPI 69dB

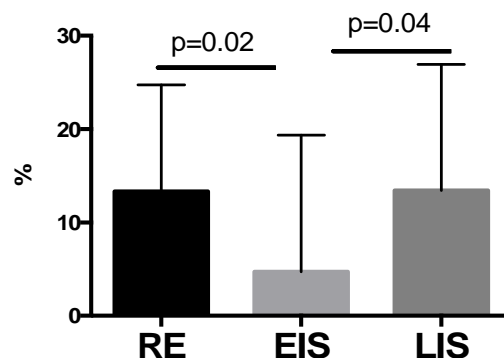
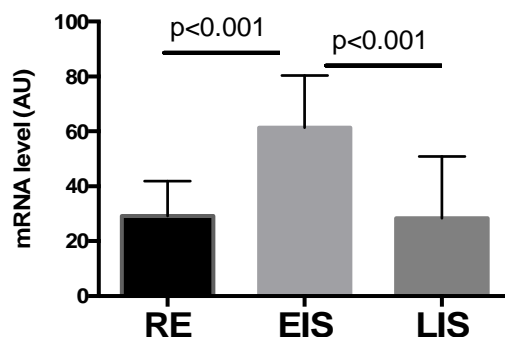


Figure 5 MG BDNF mRNA



〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。