

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16674

研究課題名（和文）マイクログリア由来BDNFが社会性に与える影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the effects of microglia-derived BDNF on social behavior

研究代表者

小森 崇史（Komori, Takashi）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70736917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マイクログリア（MG）は脳由来神経栄養因子（BDNF）を分泌し、脳機能に影響を与える。しかし、MG-BDNFが内側前頭前野（mPFC）や社会性発達に与える影響は不明であり、その解明を試みた。幼少期にマウスを隔離し社会経験を与えないと、MG-BDNFが増加した。よって、MG特異的BDNF過剰発現マウスを用いて解析したところ、社会性低下とmPFCで興奮性<抑制性の変化を認めた。本変化は幼少期に隔離を受けたマウスと一致しており、幼少期にMG-BDNFを抑制すると異常は生じず、一方、成体で抑制しても改善しなかった。以上から、MG-BDNFが幼少期の社会性形成やmPFC発達に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究から、マイクログリアが精神疾患に関与する可能性が示唆されている。精神疾患の多くは社会性の障害を示すため、社会性障害のメカニズム解明は喫緊の課題である。本研究では、幼少期の社会的経験不足が引き起こす社会性障害の分子基盤にMG-BDNFが関与していることを初めて報告した。本発見は社会性形成の理解に大きな進展をもたらすと考えられる。さらに、MG-BDNF過剰がmPFCの不可逆的な変化を引き起こすという事実は、治療介入時期の重要性を示唆し、将来的な治療法の開発に道を開く可能性がある。今後は、MG-BDNFを調節する治療的介入を通じて、社会性の改善を目指す研究を推進していきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Microglia (MG) secretes brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which affects brain function. However, the impact of MG-BDNF on the medial prefrontal cortex (mPFC) and social development remains unclear. In this study, we aimed to elucidate this relationship. We found that social isolation in early childhood, depriving mice of social experiences, increased MG-BDNF. Consequently, using MG-specific BDNF overexpressing mice, we observed decreased social behavior and a shift in the excitation/inhibition balance in the mPFC. These changes were consistent with those observed in mice subjected to early-life social isolation. Inhibiting MG-BDNF during early childhood prevented these abnormalities, whereas inhibition in adulthood did not result in improvement. These findings suggest that MG-BDNF is crucial for social development and mPFC maturation during early life.

研究分野：精神医学

キーワード：マイクログリア BDNF 社会性 PFC 臨界期

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳機能の中には、視覚など臨界期の経験によって発達する機能がある (TK Hensch, 2005)。臨界期における可塑性やその閉鎖には種々の因子が関与しているが、視覚野においては脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor ; BDNF) が過剰になると、抑制性神経回路が強化され、興奮性/抑制性バランス (E/I バランス) が抑制性有意 (E<I) となり臨界期が早期閉鎖することが知られている (Z. Josh Huang et al. 1999)。また、最近ではこの臨界期の可塑性にミクログリアが関与していることが示唆されている (Sipe GO et al. 2016)。

同様に、マウスの社会性においても臨界期の存在が確認されており、生後 21 日目から 35 日目 (P21-P35) まで幼若期社会的隔離 (juvenile social isolation; j-SI) を受けたマウスは、その後の社会性が障害される (Makinodan M et al. 2012)。j-SI によって幼少期の社会的経験を剥脱すると、社会行動を制御する領域の一つである内側前頭前皮質 (mPFC) の E/I バランスが E<I となり (Yamamuro K et al. 2020) ミクログリアの神経栄養因子の量に変化を生じる (Ikawa D et al. 2017)。ミクログリアは近年、社会性への関与 (Zhan Y et al. 2014) や、mPFC のシナプス刈り込み (Mallya AP et al. 2019)、mPFC の認知機能への時期特異的な関与が示唆されている (Schalbetter SM et al. 2022)。これらの知見から、我々は mPFC の成熟とそれに伴う社会性形成に、時期特異的・活動依存的にミクログリアが関与しているのではないかと考えた。

j-SI によって社会性の臨界期の経験を剥脱すると、(ミクログリアの) 神経栄養因子の量に変化を生じ、mPFC において E<I の変化を来すが、この変化は視覚野における臨界期閉鎖に関わる前述の機序と類似している。ミクログリアは BDNF を分泌することが知られており、これまで神経因性疼痛 (Tsuda M et al. 2013; Coull JA et al. 2005) や学習 (Parkhurst CN et al. 2013) への関与が知られている。しかし、ミクログリア BDNF が社会性の臨界期に与える影響は全く明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

ミクログリア BDNF が時期特異的に経験依存的な社会性形成と mPFC 機能形成に関与しているのではないかと仮説を立て検証を行った。本研究の結果は、経験依存的な社会性形成の神経基盤を明らかにするのみならず、幼少期の逆境体験によって苦しんでいる患者の治療開発にも役立つと考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) j-SI が社会性とミクログリア BDNF に与える影響

C57BL/6J の雄マウスを生後 21 日目 (P21) で離乳し、2 週間単独飼育を行ったのち、P35 から同条件下で飼育された他のマウスと同居 (3-5 匹) させた (j-SI マウス)。一方、コントロールグループは P21 で離乳を行い、3-5 匹で飼育した (GH マウス)。社会性評価には 3chamber 社会性テストを用いた。また、大脳皮質、mPFC から磁気分離 (Magnetic cell sorting ; MACS) を用いてミクログリアを分離し、RT-qPCR 法を用いて BDNF mRNA 量を測定した。

#### (2) ミクログリア BDNF 過剰発現マウスの作成と解析

ミクログリアに発現している *Iba1* のプロモーター下で tTA が誘導される遺伝子を導入したマウス (*Iba1*-tTA マウス) と、*Bdnf*-tet0 ノックインマウスを組み合わせることで、ミクログリア特異的 BDNF 過剰発現マウスを作成した (*Iba1*-tTA(+):*Bdnf*<sup>(tet0/+)</sup> マウス; *Iba1*-BDNF マウス)。このマウスは、tet-off system を発動することで、doxycycline (DOX) 非存在下でミクログリア BDNF を過剰発現しており、DOX を経口投与すると正常化する。コントロールマウスには、*Bdnf*<sup>(tet0/+)</sup> マウス (コントロールマウス) を用いた。終生 DOX を与えない群、P21 から DOX を与える群、P50 から DOX を与える群を用意し、それぞれ社会性テスト、mPFC 第 5 層の whole-cell patch-clamp recordings、RNAseq 解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) j-SI 体験はミクログリア BDNF を増加させた

先行研究と一致し、3chamber 社会性テストにおいて j-SI マウスは GH マウスと比較して社会性が低下していた。そして驚くべきことに、j-SI が終了する P35 の時点から成体期に渡るまで皮質全体および mPFC におけるミクログリア BDNF 発現が増加していた。一方で、皮質および mPFC のバルク組織では、BDNF 発現に差は認められなかった。これらの結果は、j-SI がミクログリア BDNF の過剰発現を誘発し、再社会化を行っても成体期までその影響は持続し、改善が見られないことを示唆した。

#### (2) ミクログリア BDNF の過剰発現は社会性低下と mPFC 錐体細胞の機能変化を生じた

続いて、ミクログリア BDNF を過剰発現させた遺伝子組換えマウスを用いて、社会性の低下が再現できるかを検証した。3chamber 社会性テストにおいて *Iba1*-*Bdnf* マウスの社会性を評価し

たところ、コントロールマウスと比較して社会性が低下していた。また、3chamber のような人為的環境を排除するため、自由環境下でマウスの動きを追跡して社会的アプローチの回数をカウント出来る装置を作成して (the augmented reality-based long-term animal behavior observing system ; AR-LABO) 社会性の検証を行ったが、やはり Iba1-Bdnf マウスの社会性は低下していた。

次に、Iba1-Bdnf マウスにおける mPFC 第 5 層錐体細胞において whole-cell patch-clamp 記録を行って、電気的活動を測定した。その結果、Iba1-Bdnf マウスの mPFC 第 5 層錐体細胞において、自発発火頻度が減少していた。また、spontaneous excitatory postsynaptic current (sEPSC) の頻度が低下し、spontaneous inhibitory postsynaptic current (sIPSC) の頻度が増加していた。miniature EPSC (mEPSC) および IPSC (mIPSC) においても同様の変化を認めた。これらは、j-SI マウスでみられる mPFC 第 5 層錐体細胞の変化とほぼ一致している。また、視床下部後部の錐体細胞ではこの変化は認められず、j-SI マウスと同様の結果である (Yamamuro K et al. 2020)。これらの結果は、幼少期からのミクログリア BDNF の持続的な増加が、mPFC 第 5 層錐体細胞の興奮性を低下させ、また、抑制性シナプス入力の数を増加させて抑制性神経回路の活性を高めていることを示唆した。まとめると、ミクログリア BDNF の過剰発現は、j-SI マウスで観察された社会性障害および mPFC 機能障害を誘発するのに十分であることが示された。

### (3) ミクログリア BDNF の過剰発現は mPFC の補体系遺伝子の発現を変化させた

ミクログリア BDNF の過剰発現が mPFC に与える影響をさらに検証するため、Iba1-Bdnf マウスの mPFC の RNAseq 解析を行った。その結果、Iba1-Bdnf マウスではコントロールマウスと比較して、*C1qa* と起点とする補体系の遺伝子発現が減少していた。また、*C3ar1* の遺伝子発現も低下していた。一方で、各種サイトカインや神経栄養因子には変化を認めなかった。これらの結果は、ミクログリア BDNF の過剰発現は、mPFC において補体系の混乱を生じさせ、結果として E/I バランスの異常を生み出すことが示唆された。

### (4) 若年期からミクログリア BDNF を正常化すると社会性障害や mPFC 機能異常を生じない

社会性の臨界期である P21-P35 にミクログリア BDNF が関与しているかどうかを検証するため、P21 から DOX を与えてミクログリア BDNF を正常化させたところ、社会性に障害は生じず、mPFC の機能異常も生じなかった。一方で、臨界期を過ぎた P50 からミクログリア BDNF を正常化しても電気生理学的な異常は回復せず、錐体細胞の発火頻度の減少や、sIPSC・mIPSC の頻度増加は残存したままであった。しかし、社会性については改善を認めたため、これらは EPSC の改善による結果であると解釈した。まとめるとミクログリア BDNF は、mPFC の抑制性神経発達には若年期に厳密な時期特異的役割を果たしている一方で、社会性については成人期になっても、EPSC の調整を介して社会性を回復させうることを示唆された。

### (5) まとめと限界点

本研究は、幼少期の孤立体験によって生じる社会性障害にミクログリア BDNF が時期特異的に関与している可能性を初めて明らかにした点で意義深いものである。精神疾患における社会性障害のメカニズムを解明することは、社会復帰支援や治療法の開発において重要な課題となっている中、本研究の成果は新たな視点を提供するものである。視覚野などで研究が進められていた「臨界期」について、社会性の形成においても BDNF、特にミクログリア由来の BDNF が重要な役割を果たしていることを発見した。また、ミクログリア BDNF 過剰が mPFC における E/I バランスの変化を引き起こし、臨界期を過ぎた後には BDNF の適正化をもってしても不可逆であることを示した。これにより、臨界期閉鎖と同様のプロセスが社会性の発達にも関与していることが示唆された。

本研究で使用した遺伝子組換えマウスおよび DOX 投与による時期特異性の検証は、今後の治療的介入に向けた基礎を築くものである。ミクログリア BDNF を制御できる因子や薬剤を探索し、社会性障害の改善につなげるためのさらなる研究が必要である。また、時期特異性があることから、臨床的にも介入の最適な時期を特定し、幼少期孤立体験を有する患者の治療効果を最大化するための研究が求められる。本研究の成果を基に、今後は幼少期にネグレクトなどの孤立・孤独体験を有する患者の治療法の開発とその効果的な時期の特定を目指し、臨床研究へと発展させていきたいと考えている。

なお、DOX 投与の期間が表現系に影響している可能性があることや、mPFC の E/I 変化と社会性の可逆性の時期特異性が完全には一致しなかったことなどは限界点であり、今後の検証を要するところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komori T, Okamura K, Ikehara M, Yamamuro K, Endo N, Okumura K, Yamauchi T, Ikawa D, Ouji-Sageshima N, Toritsuka M, Takada R, Kayashima Y, Ishida R, Mori Y, Kamikawa K, Noriyama Y, Nishi Y, Ito T, Saito Y, Nishi M, Kishimoto T, Tanaka KF, Hiroi N, Makinodan M.	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Brain-derived neurotrophic factor from microglia regulates neuronal development in the medial prefrontal cortex and its associated social behavior	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41380-024-02413-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Endo Nozomi, Makinodan Manabu, Mannari-Sasagawa Takayo, Horii-Hayashi Noriko, Somayama Nami, Komori Takashi, Kishimoto Toshifumi, Nishi Mayumi	4. 巻 11
2. 論文標題 The effects of maternal separation on behaviours under social-housing environments in adult male C57BL/6 mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 527-527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80206-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小森崇史、岡村和哉、池原実伸、山室和彦、奥村和生、萱島善徳、山内崇平、森祐貴、鳥塚通弘、高田涼平、石田理緒、齋藤康彦、牧之段学
2. 発表標題 ミクログリアが分泌するBDNFは内側前頭前野の発達と社会性行動を時期特異的に制御する
3. 学会等名 第45回日本生物学的精神医学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小森 崇史、岡村 和哉、池原 実伸、井川 大輔、山室 和彦、山内 崇平、鳥塚 通弘、高田 涼平、森 祐貴、萱島 善徳、石田 理緒、遠藤のぞみ、齋藤 康彦、西 真弓、牧之段 学
2. 発表標題 マイクログリア由来BDNFの過剰発現は発達期の社会脳形成を妨げる
3. 学会等名 Neuro2022（第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小森 崇史、岡村 和哉、池原 実伸、井川 大輔、山室 和彦、山内 崇平、鳥塚 通弘、高田 涼平、森 祐貴、萱島 善徳、石田 理緒、遠藤 のぞみ、齋藤 康彦、西 真弓、牧之段 学
2. 発表標題 マイクログリア由来BDNFの過剰発現は時期特異的に社会性および内側前頭前野の興奮性/抑制性バランスを障害する
3. 学会等名 BPCNP4学会合同年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------