

海馬 BMP 4 を標的としたストレス誘発性 不安障害メカニズムの解明

(課題番号：187206)

・ 研究期間：平成30年 7 月31日～平成31年 3 月31日

・ 研究代表者名：森征慶

1. 緒言

全般性不安障害などの不安障害は、最も罹患率の高い精神疾患である (Erickson et al., 2009; Kessler et al., 2005)。また、不安障害はうつ病の強い危険因子にもなるため (Grant et al., 2005, 2006)、不安症状の適切なコントロールを行う意義は高い。臨床における不安障害の薬物治療には、第一選択薬である選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (selective serotonin reuptake inhibitors: SSRIs) などの抗うつ薬が用いられている。しかしながら、抗うつ薬の不安障害に対する有効性は不十分である (Kapczinski et al., 2003; Stein et al., 2006)。そのため、より有効性の高い不安治療薬の開発のために、不安障害のメカニズム解明が望まれている。

臨床における不安障害の発症の主要因は“ストレス”である (Heim and Nemeroff, 1999)。ヒトが日常的な社会生活で受けるストレスに近い心理社会的ストレスを実験動物に負荷する実験系である Resident/Intruder (居住者/侵入者：R/I) 系がある。この系は人間社会の「いじめ」「パワハラ」をモデル化したものであるため、R/I系を用いた心理社会的ストレス負荷により作製したうつ・不安モデル動物の妥当性は高いと考えられている (Pollak et al., 2010)。この系を用いた我々の予備的研究において、10日間連日のストレス負荷により、不安モデル動物の作製が可能であることを確認している。また、この不安モデル動物の脳内海馬では、背側海馬特異的に神経新生数が減少していた。海馬神経新生とは、多能性をもつ神経幹細胞が成熟ニューロンに成長するまでの一連のプロセスを指す現象である (Ehninger and Kempermann, 2008)。そして海馬神経新生は、抗うつ薬の薬効発現およびストレス反応の制御に関与するため、不安障害を含む精神疾患の病態メカニズムに重要な因子である (Hill et al., 2015; Santarelli et al., 2003; Snyder et al.,

2011)。そのため、海馬神経新生の減少に寄与する生体内因子が、不安障害の病態メカニズムに重要と考えられる。

私たちは背側海馬神経新生の減少に寄与する生体内因子として、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein: BMP) 4 に注目した。BMP 4 は形質転換増殖因子 β スーパーファミリーに属する骨形成活性を示す骨形成因子であり (Bragdon et al., 2011)、そのシグナル伝達は細胞内タンパクである Smad を介して行われる (Heldin et al., 1997)。また、BMP 4 は軸索および樹状突起の伸長、細胞の系譜決定など様々な中枢作用を有することが報告されている (Augsburger et al., 1999; Graham et al., 1994; Hocking et al., 2008; Lee-Hoeflich et al., 2004)。海馬 BMP 4 と海馬神経新生の関係を調べた研究によると、非ストレス条件下において、BMP シグナリングの活性亢進は、海馬神経新生を抑制することが示されている (Bond et al., 2014)。また、非ストレス条件下のマウスに対する SSRI 投与は、海馬 BMP シグナリングの活性を減弱させること、逆にそのシグナル伝達を遺伝的に増幅させると SSRI の抗うつ・抗不安作用がブロックされることが示されている (Brooker et al., 2017)。これらのことから、ストレスを発症要因とする不安障害の病態メカニズムには、海馬 BMP シグナリングの活性亢進が関与していると考えられるが、ストレス条件下での海馬 BMP シグナリングの活性変化について言及した研究論文は皆無である。そこで本研究は、R/I系を用いた心理社会的ストレスを10日間連日負荷が、海馬 BMP シグナリングの活性に与える影響について検証した。

2. 方法

2-1. 実験動物と飼育条件

実験動物は、雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (日本クレア) と、雄性および雌性 Long-Evans (LE) ラット (動物繁殖研究所) を用いた。Resident/Intruder (居住者/侵入者) paradigm (R/I 系) に用いる Resident colony は、雄性 LE ラット (搬入時リタイア週齢)、雌性 LE ラット (搬入時 6 週齢) を一匹ずつ専用の大型プラスチックケージ (幅 50cm × 奥行 40cm × 高さ 20cm) で 3 週間共同飼育することにより作製した。また、Intruder ラットには中型プラスチックケージ (幅 23cm × 奥行 14cm × 高さ 12cm) で単独飼育を行った SD ラット (搬入時 6 週齢) を用いた。飼育条件は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、絶対湿度 $60 \pm 2\%$ 、および 12 時間周期の明暗サイクル (7:00–19:00: 明期、19:00–7:00: 暗期) の環境で飼育した。ラットに与える飼料は CE-2 (日本クレア) を用い、餌・水は共に自由に摂取できるようにした。動物実験の取り扱いについては、福岡大学実験委員会 (Experimental Animal Care and Use Committee) による動物実験倫理規定に準じた。

2-2. R/I 系を用いた心理社会的ストレス負荷プロトコール

R/I 系を用いた心理社会的ストレス負荷実験は全て明期に、飼育室とは別の赤色灯下の実験室で行った。実験室に Resident colony および Intruder ラットを運び、adaptation を 60 分間行った。ストレス負荷開始 10 分前に Resident colony から雌性ラットを取り出した。adaptation 後、Resident colony に Intruder ラットを 1 匹入れて 30 分間観察した。Intruder ラットは Resident ラットから様々な攻撃行動を受けるが、その中でもストレス負荷開始 10 分以内に submissive posture (降伏体勢) が見られた Intruder ラットを、社会的敗北ストレスが負荷された個体とみなした。明確な submissive posture が見られた後、Resident ラットとそれ以上の身体的接触、および Intruder ラットの受傷を避けるため、直ちに wire mesh cage (幅 15cm × 奥行 20cm × 高さ 15cm) に入れて Resident colony の中央に静置した。wire mesh cage 内に入れることにより、Intruder ラットと Resident ラットの間の身体的接触を除き、激しい身体的受傷を防ぐことができる。同時に視覚的、嗅覚的、聴覚的な sensory contact を継続できることを利用して、Intruder ラットに脅威ストレス負荷を行った。ストレス負荷開始から 30 分経過した後、Intruder ラットを wire mesh cage から取り出し、ホームケージに戻した。Intruder ラットが 10 分以内に submissive posture を示さなかった場合、開始から 10 分後の時点で wire mesh cage に入れて Resident colony の中央に静置した。

また、非特異的なストレスの影響を除外するため、Novel Cage 処置を行う群を作製した。具体的には、赤色灯下の実験室で 60 分間の adaptation を行った後、Intruder ラットを清潔な床敷きを敷いた Resident colony 作製の大型プラスチックケージ (幅 50cm × 奥行 40cm × 高さ 20cm) 内に入れて 10 分間観察し、その後 wire mesh cage に入れて大型プラスチックケージの中央に 20 分静置した後、ホームケージに戻した。

2-3. 実験スケジュールと群分け

Fig. 1 に本研究における実験スケジュールを示す。搬入時 6 週齢の雄性 SD ラットを単独飼育し、実験環境への adaptation を 1 週間行った後、R/I 系を用いた心理社会的ストレス負荷、Novel cage 処置のいずれかのストレス負荷を 1 日 1 回 10 日間連日行った。R/I 系を用いた心理社会的ストレス負荷を行ったラットを Defeated 群、Novel Cage 処置を行ったラットを Control 群とした。最終ストレス負荷終了の翌日に断頭し、海馬を摘出した。

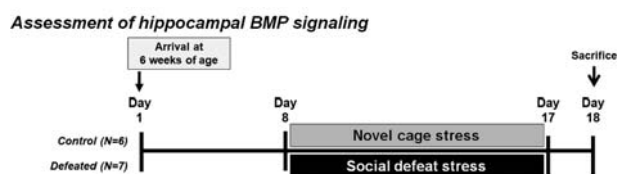


Fig. 1 本研究における実験スケジュール

2-4. 脳分画

麻酔薬としてペントバルビタール Na (200mg/kg 体重) を腹腔内投与し、深麻酔状態にした。麻酔投与から約 2 分後に断頭を行い、直ちに全脳を摘出した。氷上にて全脳から海馬を分画し、Yamada ら (2013) の方法論を参考にして、海馬を背側海馬と腹側海馬に分離した。具体的には、まず分画した海馬全体を背側-腹側軸に沿って 3 等分し、背側方向からそれぞれ背側海馬、中間海馬、および腹側海馬とした。背側海馬と腹側海馬の境界については明確に定義されていないため、中間海馬は本実験から除外した。各サンプルはウエスタンブロット法に用いるまで -80°C で凍結保存した。

2-5. ウエスタンブロット法

各脳サンプルに対して組織重量に応じた量の 1 mM PMSF (CST) を添加した RIPA Buffer (CST) を加えた後、ソニケーションによる homogenize を行ったものを組織溶解液とした。組織溶解液を遠心分離後、上清を分取し、Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) を用いて総タンパク濃度を測定した。算出された総タンパク濃度をもとに、各サンプルの総タンパク濃度が同一となるように RIPA buffer を加えた後、2-mercaptoethanol (Bio-Rad) を添加した 2 × Laemmli sample

buffer (Bio-Rad) を加え、100℃で5分間加熱した。

サンプルのタンパク質分離は、4-20%Mini-PROTEAN®TGX™ Precast Gel (Bio-Rad) を用いた SDS-PAGE により行った。その後、分離したタンパク質をウェット式ブロッティング装置 (Mini Trans-Blot® Transfer Cell; Bio-Rad) を用いて、polyvinyl difluoride (PVDF) メンブレン (Bio-Rad) に転写した。転写したメンブレンを5% non-fat dry milk/TBST を用いてブロッキング処理を室温で1時間行った後、一次抗体溶液中 (BMP4, 1:1000, Abcam; pSmad1/5/9, 1:1000, CST; Smad1/5/9, 1:1000, Abcam; GAPDH, 1:5000, SantaCruz) で振盪させながら4℃で一晩インキュベートした。翌日、二次抗体溶液中 (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 1:2000, CST) で振盪させながら室温で1時間インキュベートした。その後、化学発光検出試薬と1分間反応させ、MultiImager II MultiBOX (BioTools) を用いて抗原の検出を行った。検出されたバンドはフリーソフトウェアのImageJを用いて定量し、ローディングコントロールであるGAPDH、またはSmad1/5/9の値で補正した。

2-6. 統計学的解析

Control群とDefeated群において、背側および腹側海馬におけるタンパク発現量については対応のないt検定を用いて統計処理を行った。全てのデータは平均値±S.E.で表示し、危険率が0.05未満の場合を統計学的に有意とした。

3. 結果

海馬 bone morphogenetic protein (BMP) 4 タンパク発現量

最終ストレス負荷終了後の海馬におけるBMP4タンパク発現量の結果をFig. 2に示す。Control群とDefeated群の2群間で比較を行ったところ、背側海馬におけるBMP4タンパク発現量は、Control群に比べDefeated群で有意に高かった ($P<0.05$)。一方、腹側海馬におけるBMP4タンパク発現量については、2群間で有意差は認められなかった。

海馬 pSmad1/5/9タンパク発現量

最終ストレス負荷終了後の海馬におけるpSmad1/5/9タンパク発現量の結果をFig. 3に示す。Control群とDefeated群の2群間で比較を行ったところ、背側海馬におけるpSmad1/5/9タンパク発現量は、Control群に比べDefeated群で増加傾向にあった ($P=0.0611$)。一方、腹側海馬におけるpSmad1/5/9のタンパク発現量は、2群間で有意差は認められなかった。

4. 考察

本研究では、R/I系を用いた心理社会的ストレスの連日負荷 (10回/10日間) が、背側および腹側海馬におけるBMPシグナリングの活性変化に与える影響について検証した。その結果、背側海馬特異的なBMP4シグナリングの活性亢進が明らかとなった。

心理社会的ストレスが海馬神経新生を減少させる分子生理学的メカニズムとして、私たちはBMP4とそのシ

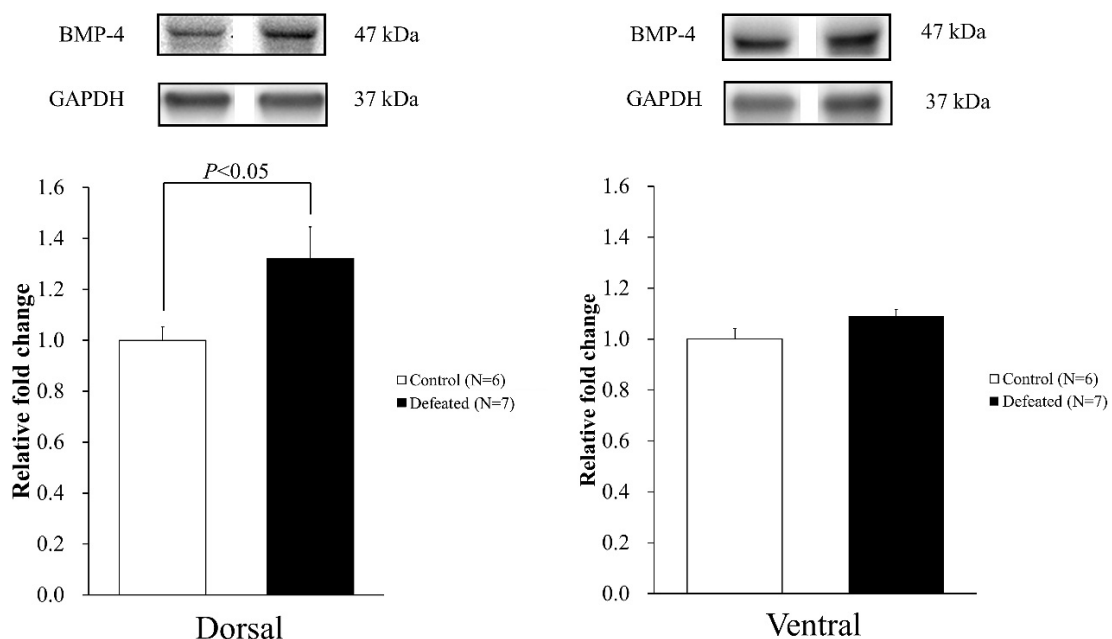


Fig. 2 R/I系を用いた心理社会的ストレスの10日間連日負荷が海馬BMP4タンパク発現量に与える影響

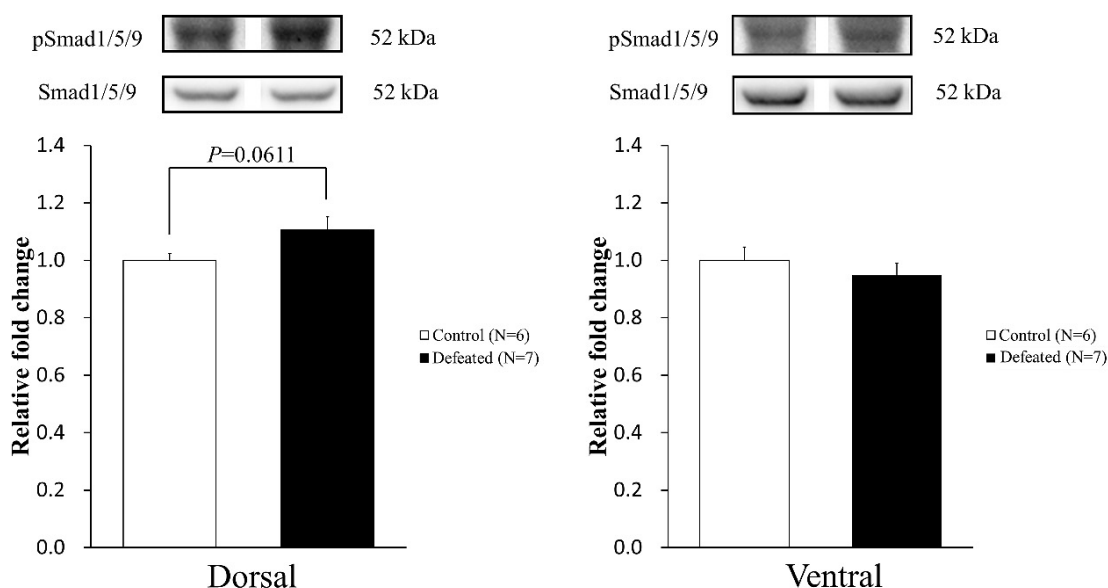


Fig. 3 R/I系を用いた心理社会的ストレスの10日間連日負荷が海馬における pSmad1/5/9タンパク発現量に与える影響

グナルカスケードに注目した。その結果、R/I系を用いた心理社会的ストレスの連日負荷（10回/10日間）により背側海馬特異的な BMP 4 タンパク発現量、および Smad1/5/9 のリン酸化レベルの増加が見られた。BMP 4 による細胞内シグナル伝達は、Smad を介して行われることが報告されている（Heldin et al., 1997）。そのため、本研究結果は心理社会的ストレス負荷により、背側海馬における BMP シグナリングの活性亢進が引き起こされたことを示唆している。私たちの予備的研究では、本研究と同じストレス負荷プロトコールにより不安様行動の増加、および背側海馬特異的な神経新生数の減少を確認している。背側海馬と不安様行動の関係を行動薬理学的検討により調べた過去の報告によると、セロトニン 1A 受容体フルアゴニストである 8-OH-DPAT を背側海馬に投与したラットでは、高架式 T 迷路試験における不安様行動が増加することが示されている（Dos Santos et al., 2008）。同様に、GABA-A 受容体アゴニストである muscimol の投与により背側海馬機能を薬理的に抑制したラットでは、高架式十字迷路試験における不安様行動の増加が報告されている（Zhang et al., 2014）。また、Revest ら（2009）の報告によると、遺伝学的手法により海馬神経新生を減少させたマウスでは、不安様行動が増加することが示されている。これらの結果は、背側海馬の神経機能低下が不安症状の出現に寄与することを示唆している。そして、海馬神経機能の制御因子として海馬 BMP シグナリングの関与が示されている。BMP 4 アンタゴニストである Noggin を過剰発現させたマウスは、海馬機能が亢進することが報告されている（Gobeske et al., 2009; Meyers et al., 2016）。また、遺伝学的手法を用いて BMP シグナリングを活性化させたマウスでは、海馬歯状回における新生細胞の成長速度が減少すること、逆に BMP シグナリングを抑制すると海馬神

経新生数が増加することが報告されている（Bond et al., 2014）。そのため、これらの過去の報告と本研究結果を踏まえて解釈すると、心理社会的ストレスは背側海馬において、BMP シグナリングの活性亢進による海馬神経新生の減少を介して、不安様行動の増加に寄与する可能性を示している。ストレスが海馬 BMP シグナリングを活性化するメカニズムについては未解明であるが、抗うつ薬である SSRI の fluoxetine を投与したマウスでは、海馬 BMP シグナリングの活性が減弱することが示されている（Brooker et al., 2017）。そのため、心理社会的ストレス負荷による背側海馬セロトニン濃度の減少が、BMP シグナリングの活性亢進に関与している可能性が考えられる。

本研究は心理社会的ストレス負荷が背側海馬特異的な BMP シグナリングの活性亢進を引き起こすことを世界で初めて明らかにした。今後は海馬 BMP シグナルカスケード、海馬神経新生、および不安様行動の直接的な関係性について明らかにしていきたい。ストレス負荷により作製した不安モデル動物に対して、BMP 4 アンタゴニストである Noggin を脳内に投与することで、予備的研究および本研究で見られた海馬神経新生の減少、および BMP シグナリングの活性亢進が改善するかを今後確認する必要がある。加えて、Noggin を過剰発現した動物を用いて、心理社会的ストレスの連日負荷（10回/10日間）に対して抵抗性を示すかどうかについても確認する必要があるだろう。

結論として、心理社会的ストレスは背側海馬において、BMP シグナリングの活性亢進に伴う神経新生の減少を引き起こすことで、不安障害の発症に寄与することが示唆された。そのため本研究結果は、海馬 BMP シグナリングが不安障害の新たな治療ターゲットになり得る可能性を示している。

参考文献

- Augsburger A, Schuchardt A, Hoskins S, Dodd J, Butler S. BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron*, 24: 127-141, 1999.
- Bond AM, Peng CY, Meyers EA, McGuire T, Ewaleifoh O, Kessler JA. BMP signaling regulates the tempo of adult hippocampal progenitor maturation at multiple stages of the lineage. *Stem Cells*, 32: 2201-2214, 2014.
- Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*, 23: 609-620, 2011.
- Brooker SM, Gobeske KT, Chen J, Peng CY, Kessler JA. Hippocampal bone morphogenetic protein signaling mediates behavioral effects of antidepressant treatment. *Mol Psychiatry*, 22: 910-919, 2017.
- Dos Santos L, de Andrade TG, Zangrossi Junior H. 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 18: 286-294, 2008.
- Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.*, 331: 243-250, 2008.
- Erickson SR, Guthrie S, Vanetten-Lee M, Himle J, Hoffman J, Santos SF, Janeck AS, Zivin K, Abelson JL. Severity of anxiety and work-related outcomes of patients with anxiety disorders. *Depress Anxiety*, 26: 1165-1171, 2009.
- Gobeske KT, Das S, Bonaguidi MA, Weiss C, Radulovic J, Disterhoft JF, Kessler JA. BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PLoS One*, 4: e7506, 2009.
- Graham A, Francis-West P, Brickell P, Lumsden A. The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature*, 372: 684-686, 1994.
- Grant BF, Hasin DS, Blanco C, Stinson FS, Chou SP, Goldstein RB, Dawson DA, Smith S, Saha TD, Huang B. The epidemiology of social anxiety disorder in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Clin Psychiatry*, 66: 1351-1361, 2005.
- Grant BF, Hasin DS, Stinson FS, Dawson DA, Goldstein RB, Smith S, Huang B, Saha TD. The epidemiology of DSM-IV panic disorder and agoraphobia in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Clin Psychiatry*, 67:363-374, 2006.
- Heim C, Nemeroff CB. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry*, 46: 1509-1522, 1999.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390: 465-471, 1997.
- Hill AS, Sahay A, Hen R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 40: 2368-2378, 2015.
- Hocking JC, Hehr CL, Chang RY, Johnston J, McFarlane S. TGFbeta ligands promote the initiation of retinal ganglion cell dendrites in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci.*, 37: 247-260, 2008.
- Kapczinski F, Lima MS, Souza JS, Schmitt R. Antidepressants for generalized anxiety disorder. *Cochrane Database Syst Rev.*, CD003592, 2003.
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62: 617-627, 2005.
- Lee-Hoeflich ST, Causing CG, Podkowa M, Zhao X, Wrana JL, Attisano L. Activation of LIMK 1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J.*, 23: 4792-4801, 2004.
- Meyers EA, Gobeske KT, Bond AM, Jarrett JC, Peng CY, Kessler JA. Increased bone morphogenetic protein signaling contributes to age-related declines in neurogenesis and cognition. *Neurobiol Aging*, 38: 164-175, 2016.
- Pollak DD, Rey CE, Monje FJ. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. *Ann Med.*, 42: 252-264, 2010.
- Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, Abrous DN. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry*, 14: 959-967, 2009.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301: 805-809, 2003.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 476: 458-461, 2011.

- Stein DJ, Ipser JC, Seedat S. Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database Syst Rev.*, CD002795, 2006.
- Yamada M, Makino Y, Hashimoto T, Sugiyama A, Oka J, Inagaki M, Yamada M, Saitoh A. Induction of galanin after chronic sertraline treatment in mouse ventral dentate gyrus. *Brain Res.*, 1516: 76-82, 2013.
- Zhang WN, Bast T, Xu Y, Feldon J. Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res.*, 262: 47-56, 2014.