

氏名	はらだ ひろよし 原田 洸秀		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	甲第 1939 号		
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 17 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	雄性 Wistar ラットの利き手（肢嗜好性）が心理社会的ストレスによって出現するうつ病関連症状および海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性に与える影響の解明		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	遠城寺 宗近
	(副 査) 福岡大学	教授	桂林 秀太郎
	福岡大学	准教授	佐野 和憲

内 容 の 要 旨

【緒言】うつ病は心理社会的ストレスに起因する精神疾患であり、身体的および精神的健康を脅かし、世界中で社会的損失を引き起こしている。うつ病の呈する症状や治療反応性は患者によって異なっており、このことが臨床においてうつ病の診断や治療を困難にしている。このうつ病の個体差の存在は、患者によってうつ病の病態メカニズムが異なることを示唆しているが、個体差が生じる要因およびそのメカニズムについては不明である。感情は左脳と右脳の神経活動バランスによって制御されており、ポジティブ感情は左脳優位、ネガティブ感情では右脳優位な活動を示す。利き手によって左脳・右脳の神経活動レベルが異なることが示されている。さらに、利き手はストレス反応性にも関連しており、左利きのヒトやラットは右利きに比べてうつ症状（うつ様行動）をより多く示すことが報告されている。ここで、腹側海馬は感情やストレス反応を制御している脳領域であり、うつ病関連症状の発現に関わっている。腹側海馬の機能制御因子として脳由来神経栄養因子 (BDNF) が注目されており、BDNF はその受容体である tropomyosin receptor kinase B (TrkB) や転写因子である cAMP response element-binding protein (CREB) のリン酸化を介して神経の成長や可塑性の増強および BDNF 転写の調節を行っている。しかしながら、利き手と腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナルの関係については不明である。そこで本研究では、うつ病の病態メカニズムが異なる要因として利き手に注目し、利き手が左脳および右脳の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性に与える影響について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

1. 雄性 Wistar ラットの利き手が非ストレス条件下の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性に与える影響

搬入時 8 週齢の雄性 Wistar ラットを本実験で用いた。各ラットの利き手は肢嗜好性試験 (PPT) を用いて評価した。その後、左脳と右脳からそれぞれ腹側海馬を分画し、BDNF-TrkB-CREB シグナル関連タンパクおよび *Bdnf* mRNA の発現量を、ウェスタンブロット法および RT-PCR 法でそれぞれ測定した。

腹側海馬における BDNF タンパク発現量については、大脳半球による主効果でのみ有意差が認められ ($F_{(1, 16)} = 6.360$, $P < 0.05$)、利き手による主効果および利き手×大脳半球による交互作用では有意差は認められなかった (Fig. 1A)。リン酸化 TrkB (p-TrkB) タンパクおよび *Bdnf* mRNA 発現量については、利き手による主効果でのみ有意差が認められ、右利き群に比べて左利き群で有意に低かった ($F_{(1, 16)} = 17.98$, $P < 0.01$, Fig. 1B; $F_{(1, 22)} = 6.375$, $P < 0.05$, Fig. 1D)。リン酸化 CREB (p-CREB) タンパク発現量については、利き手 ($F_{(1, 16)} = 31.65$, $P < 0.001$) および大脳半球 ($F_{(1, 16)} = 6.545$, $P < 0.05$) による主効果、および利き手×大脳半球による交互作用 ($F_{(1, 16)} = 9.625$, $P < 0.01$) のすべてにおいて有意差が認められた (Fig. 1C)。どの群間に差があるのかを確認するために多重比較を行ったところ、左脳の腹側海馬における p-CREB タンパク発現量は、右利き群に比べて左利き群で有意に低かった ($P < 0.001$)。

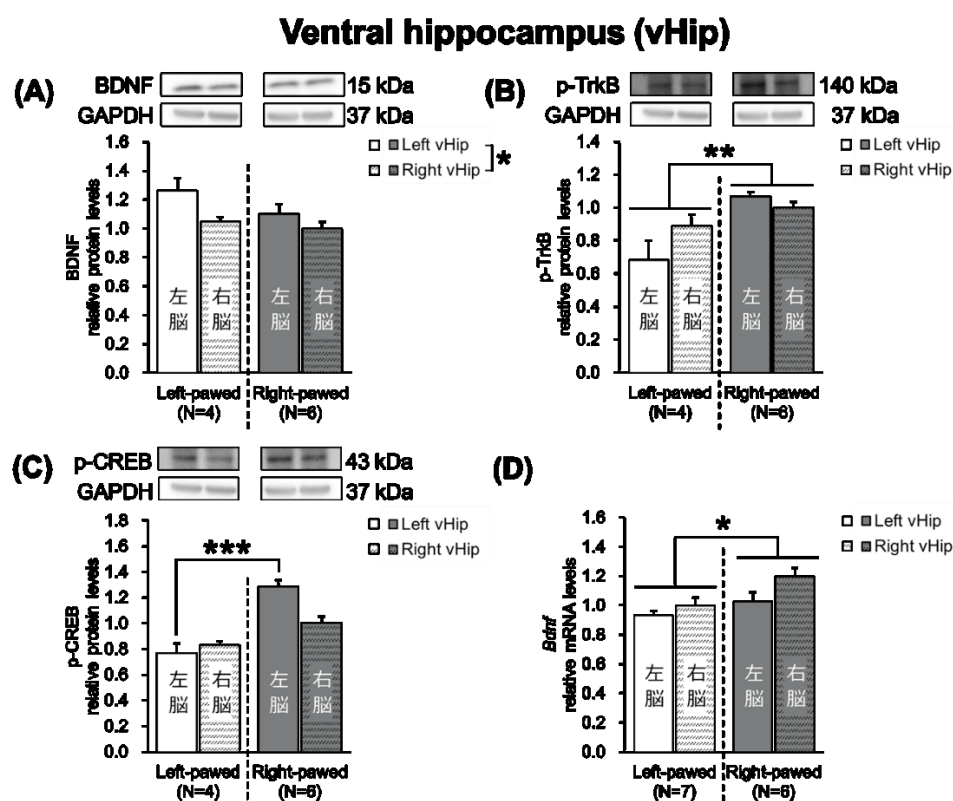


Fig. 1 利き手が左脳と右脳の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナルに与える影響

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

2. 雄性 Wistar ラットの利き手が心理社会的ストレスによる腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性変化に与える影響

前項と同様に雄性 Wistar ラットの利き手を PPT で評価した後、Resident/Intruder 系を用いた心理社会的ストレス負荷を 1 日 1 回、10 日間行うことでうつ病モデルラットを作製した (Stress 群)。また、非特異的なストレスの影響を除外するために Control 群には Novel cage 処置を Stress 群と同じ負荷プロトコールで行った。その後、左脳と右脳からそれぞれ腹側海馬を分画し、BDNF-TrkB-CREB シグナル関連タンパクおよび *Bdnf* mRNA の発現量を、ウエスタンブロット法および RT-PCR 法でそれぞれ測定した。

腹側海馬における BDNF タンパク発現量、p-TrkB リン酸化比率および *Bdnf* mRNA 発現量については、いずれも利き手×ストレスによる交互作用でのみ有意差が認められた ($F_{(1, 36)} = 15.43, P < 0.001$, Fig. 2A; $F_{(1, 36)} = 6.978, P < 0.05$, Fig. 2B; $F_{(1, 42)} = 8.606, P < 0.01$, Fig. 2D)。どの群間に差があるのかを確認するために多重比較を行ったところ、BDNF タンパク発現量、p-TrkB リン酸化比率および *Bdnf* mRNA 発現量は、いずれも右利き群でのみ Control 群に比べて Stress 群で有意に低かった ($P < 0.001$; $P < 0.05$; $P < 0.05$)。一方で、p-CREB リン酸化比率については、いずれの主効果および交互作用においても有意差は認められなかった (Fig. 2C)。

Ventral hippocampus (vHip)

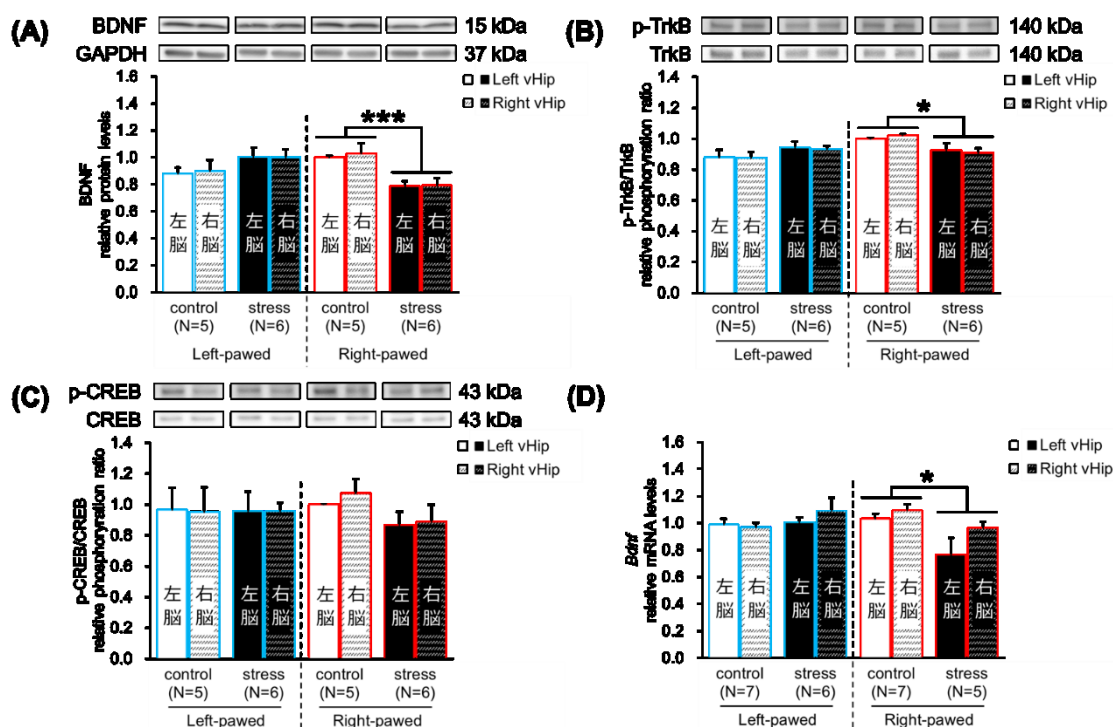


Fig. 2 心理社会的ストレスが左利きおよび右利きラットの左脳および右脳の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナルに与える影響 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

【結論】

はじめに、非ストレス条件下で利き手が左脳と右脳の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性に与える影響について検討した。その結果、右利きラットに比べて左利きラットでは、左脳の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が低いことが示された。うつ病モデル動物では海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が低下していることが報告されている。また、感情は左脳と右脳の神経活動バランスによって制御されており、右脳優位な活動はネガティブ感情に関わる。これらのことから、利き手による感情制御メカニズムの違いには、左脳の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性の違いが関わっていることが示唆された。次に、利き手が心理社会的ストレスによる左脳と右脳の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性変化に与える影響について検討した。その結果、右利きラットでは心理社会的ストレスによって左脳と右脳の別に関わらず腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が減少したのに対し、左利きラットでは心理社会的ストレスによる変化は認められなかった。このことは、利き手によって心理社会的ストレスによる腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性の変化が異なることを示唆している。したがって、本研究結果は利き手によって異なるうつ病の病態メカニズムが形成される可能性を示している。

審査の結果の要旨

うつ病患者数は世界中で増加しており、多様な身体・精神症状を呈する精神疾患である。しかしながら、その詳細なメカニズムは完全には解明されていない。この課題に関して、本論文は Resident/Intruder 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病モデルラットの腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナルに着目して、うつ病関連症状および脳内変化が利き手で異なるかどうかを検証したものである。その結果、利き手は腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性を生得的に変化させるだけでなく、心理社会的ストレスに対する反応性も変化させることを明らかにした。本研究の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、主な質疑応答は以下のとおりである。

1. 斬新さ

利き手によってうつ病病態メカニズムと関連の強い腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が、非ストレスおよびストレス条件の両方で異なることを世界で初めて明らかにした。この結果から、うつ病の症状や治療反応性の個体差に利き手による腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性変化の違いが関与する可能性が示された。

2. 重要性

うつ病症状の個体差や不均一性は、うつ病の診断・治療を困難にしているが、その要因とメカニズムに関しては不明であった。利き手によって腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が異なることを明らかにした本論文は、現在の臨床問題点を解決する基盤研究となり得るものであるため、その意義・重要性は高い。

3. 実験方法の正確性

臨床でヒトが受けるストレスである心理社会的ストレスを Resident/Intruder 系で再現してうつ病モデルラットを作製しているため、モデル動物としての妥当性は高い。そして、このモデル動物を用いて、多くの研究で信頼されている行動試験を用いてうつ・不安・恐怖症状を評価した。腹側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル活性は、ウエスタンブロット法および RT-PCR 法で解析した。

4. 表現の明確さ、及び結論

表現方法は簡潔明瞭で、解析は対照群との比較を行い、また結論も明確であった。

5. 主な質疑応答

Q1. 左利きを右利きに矯正した場合、うつ病発症リスクはどうなるのか？

A1. 左利きのヒトを右利きに矯正した場合の大脳活動パターンは、元々右利きのヒトと同一にはならないことが示されている。そのため、利き手を矯正してもうつ病発症リスクに大きな変化はないと考える。

Q2. 左脳と右脳で発現量が異なる物質はあるのか？

A2. モノアミン（ドパミンやセロトニンなど）が左脳と右脳で発現量が異なることが報告されている。

Q3. ラットでは両利きの割合はどのくらいか？

A3. 10%程度存在することが報告されている。

Q4. 左脳または右脳に BDNF 投与すると、うつ・不安様行動の変化は同様か？

A4. 本研究で検討していない、また、質問内容を検討した過去研究がないため、回答することが難しい。しかし、BDNF を脳室内投与した動物では、うつ・不安様行動が減少することが報告されている。本研究では、利き手によって左脳と右脳の BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が異なり、この違いがうつ・不安様行動のレベルを変化させる可能性を見出している。そのため、ご指摘の内容を今後検討していきたい。

Q5. 左利き対照群の摂食量は、右利き対照群に比べて低下しているようにみえるが？

A5. 臨床研究では、ストレスに脆弱なヒトは摂食量が増えやすいことが報告されている。また、左利きは右利きに比べてストレス反応性が高いことも報告されている。本研究では、対照群に新奇環境処置（軽度ストレス負荷）を行っている。そのため、左利き対照群では軽度ストレスによる摂食量増加が起こったと考える。

Q6. 本研究のうつ病モデル動物としての妥当性はどうか？

A6. Resident/Intruder 系を用いた心理社会的ストレスを負荷した動物では、うつ、不安様および恐怖行動が増加し、これらの行動学的変化は抗うつ薬の慢性投与で改善することが多くの先行研究で示されている。私たちの過去研究においても、先行研究と同様の結果を示すことを確認しているため、本研究で用いたうつ病モデル動物としての妥当性は高いと考えている。

Q7. BDNF-TrkB-CREB シグナルが左脳と右脳で異なるメカニズムには何が考えられるか？

A7. 左脳と右脳の大脳非対称の決定に関わる因子として、LRRTM や PCSK6 が知られている。これら因子が左脳と右脳の BDNF-TrkB-CREB シグナルに異なる影響を与える可能性が考えられる。

Q8. CREB をリン酸化させる因子は BDNF 以外に何かがあるか？

A8. 海馬機能制御因子であるグルタミン酸や、炎症性物質である TNF α なども CREB のリン酸化を引き起こすことが知られている。

以上の審査により、本論文は学位を授与するのに値する研究と判定された。