

福岡大学博士論文

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

令和3年度3月

PD181010

原田 洸秀

## 目次

第 1 章 非ストレス条件下において雄性 Wistar ラットの利き手がうつ・不安様行動と海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性に与える影響	
1. 緒言-----	2
2. 方法-----	4
3. 結果-----	10
4. 考察-----	14
参考文献-----	17
第 2 章 雄性 Wistar ラットの利き手が心理社会的ストレスによって出現するうつ関連症状と海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性変化に与える影響	
1. 緒言-----	22
2. 方法-----	24
3. 結果-----	31
4. 考察-----	37
参考文献-----	42
Supplementary Information: 実験の部-----	48
謝辞-----	62

## 第1章 非ストレス条件下において雄性 Wistar ラットの利き手がうつ・不安様行動と海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性に与える影響

### 1. 緒言

大脳は構造的には左右半球が対称的なつくりをしているにもかかわらず、その広範な機能を効率的に制御するうえで左脳と右脳のいずれかが非対称かつ優先的に働くこと（側性化）が重要である。たとえば感情の調節に関して言えば、ポジティブ感情に対しては左脳優位、ネガティブ感情では右脳優位な活動を示す (Davidson et al., 1987; Silberman and Weingartner, 1986)。精神疾患の病態生理には、この感情機能の側性化の異常が関連することが示されており (Berretz et al., 2020)、うつ病患者は健常人に比べて安静時での大脳活動性が右脳優位になることが報告されている (Herrington et al., 2010; Rotenberg, 2008)。

行動の側性化は、大脳機能の側性化の研究においてよく調べられており、その代表的なものとして利き手が存在する。利き手は複雑な作業で手を使う時に左または右手のいずれか一方を好む特性であり、利き手の違いは左脳・右脳の神経機能に異なる影響を与えている。利き手とモチベーション制御に関わる側坐核の関係を調べた研究では、利き手と反対側の側坐核におけるドパミン発現量が同側よりも高くなることが示されている (Budilin et al., 2007; Cabib et al., 1995)。また、利き手は感情処理プロセスの違いに関連しており (Wang et al., 2021)、利き手とうつ症状を調べた研究では、右利きに比べて左利きのヒトやラットはうつ症状・うつ様行動をより多く示すことが報告されている (Elias et al., 2001; Denny, 2009; Logue et al., 2015; Ecevitoglu et al., 2020; Soyman et al., 2015)。したがって、これらの知見は利き手によって左脳・右脳による感情制御メカニズムが異なることを示唆している (Brookshire and Casasanto, 2012; Shadli et al., 2021)。しかしながら、利き手が感情制御に関連した脳領域における分子生理学的メカニズムに及ぼす影響については明らかではない。

海馬は記憶・学習機能に加えて、感情やストレス反応を制御する脳領域である (Moser and Moser, 1998; Sahay and Hen, 2007)。脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor: BDNF)は神経細胞の成長や可塑性に関わるタンパク質であり (Leal et al., 2015)、海馬に多く発現している (Barde et al., 1982; Ernfors et al., 1990)。BDNFはその受容体である tropomyosin receptor kinase B (TrkB)に結合し、転写因子である cAMP response element-binding protein (CREB)のリン酸化を引き起こすことで海馬神経機能を調節している (Castrén and Monteggia et al., 2021; Finkbeiner et al., 1997; von Bohlen Und Halbach and von Bohlen Und Halbach, 2018)。また、リン酸化した CREB は BDNF 転写の制御にも関わっている (Conti et al., 2002; Nibuya et al., 1996; Tao et al., 1998)。そして、空間記憶の獲得には海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性の亢進が重要であることが示されている (Broadbent et al., 2004; Jiang et al., 2017)。また、海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性はうつ病の病態メカニズムと密接に関連しており (Miyanishi and Nitta, 2021; Duman et al., 2021; Duman and Monteggia, 2006)、うつ病モデル動物では海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が減弱していること、またこのシグナル活性の減

弱は抗うつ薬の投与によって改善することが示されている (Casarotto et al., 2021; Duman and Monteggia, 2006; Nibuya et al., 1995)。さらに、利き手と海馬機能の関係を調べた研究によると、ラットの利き手によって海馬依存的な機能である空間記憶が異なることが報告されている (Ecevitoglu et al., 2020; Budilin et al., 2014)。

これらの知見を踏まえると、利き手による感情制御メカニズムの違いは左脳および右脳の海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル活性レベルの違いに起因する可能性が考えられる。したがって本研究では、左利きと右利きラットにおいて、左脳および右脳の海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性レベルが異なるかどうかを明らかにすることを目的とした。また、利き手によるうつ・不安様行動の違いを評価するために行動試験 (強制水泳試験、高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験)も併せて行った。

## 2.方法

### 2-1. 実験動物および飼育環境

本研究では、実験動物として雄性 Wistar ラット (搬入時8週齢、搬入時体重: 220-250 g、日本クレア)を用いた。これらの動物は、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、絶対湿度 $60 \pm 2\%$ 、および明期12時間、暗期12時間の明暗サイクルの環境下で飼育した。肢嗜好性試験期間を除いて飼料と水は自由に摂取できるようにし、飼料には CE-2 (日本クレア)を用いた。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. 肢嗜好性試験 (paw preference test: PPT)

雄性 Wistar ラットの利き手を決定するために、既報のプロトコールを一部改変して PPT を行った (Cabib et al., 1995; Ecevitoglu et al., 2020; Soyman et al., 2015)。各 PPT において、24 時間絶食させたラットを試験当日の明期に実験室へ運び、10分間の adaptation を行った後、白色灯下で PPT を開始した。PPT には前面に給餌スペースが設けられたテストボックス (幅 15 cm×奥行 20 cm×高さ 15 cm)を用いた。各ラットをテストボックスに入れた後、給餌スペースに餌 (砕いた CE-2片)を置いた。ラットが餌を獲得するために、左または右前肢のいずれか一方を給餌スペースに入れる行動 (paw entry)をビデオカメラで撮影した (Fig. 1)。PPT は8日間で4セッション (50 paw entry/session)行った。前半2セッションでは、各ラットに餌の獲得方法を学習させた (training session)。後半2セッションは test session とし、肢嗜好性を評価するために、右前肢による paw entry (right paw entry: RPE)の回数を測定した。各ラットは test session における平均 RPE 回数に基づいて左利き (平均 RPE 回数  $\leq 15$ )と右利き (平均 RPE 回数  $\geq 35$ )にそれぞれ分類した。なお、 $15 < \text{平均 RPE 回数} < 35$ は両利きに分類した。各ラットの PPT 終了後に、テストボックスは消毒用アルコールで清拭した。



Fig. 1 給餌スペースに置いた餌を獲得するために左または右前肢を伸ばす行動 (paw entry)

### 2-3. 実験スケジュールおよび群分け

本研究における実験スケジュールを下に示す (Fig. 2)。雄性 Wistar ラットを搬入後、実験環境への adaptation を1週間行った。その後、PPT を8日間で4セッション行うことにより、各ラットの利き手を決定した。最終 PPT の4日後から、後述する行動実験を行った後、断頭・脳分画を行った。そのうち、左利きラット4匹と右利きラット6匹はウエスタンブロッティングに、左利きラット7匹と右利きラット6匹は RT-PCR に使用した。

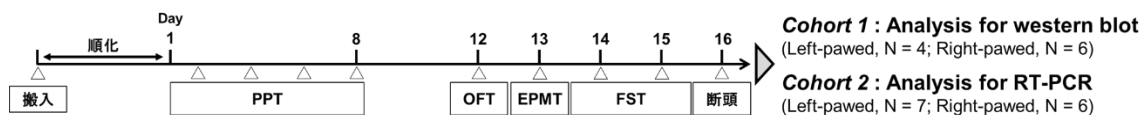


Fig. 2 本研究における実験スケジュール

(PPT: 肢嗜好性試験、OFT: オープンフィールド試験、EPMT: 高架式十字迷路試験、FST: 強制水泳試験)

### 2-4. 行動実験

#### 2-4-1. オープンフィールド試験 (open field test: OFT)

試験当日の明期に各ラットを実験室へ運び、実験室への adaptation を 60 分間行った後、赤色灯下で OFT を開始した。ラットを円形のオープンフィールドアリーナ (直径 60 cm) の周辺部に置き、5 分間自由探索させた (Fig. 3)。OFT でのラットの行動をアリーナの真上に設置したビデオカメラで撮影し、後日行動を解析した。各ラットの OFT 終了後に、アリーナを消毒用アルコールで清拭した。オープンフィールドにおける総移動距離 (total distance) は video-tracking software (SMART, Panlab Harvard Apparatus)を用いて測定し、自発行動量の指標とした。また、オープンフィールドにおける中央滞在時間を測定し、不安様行動の指標とした。

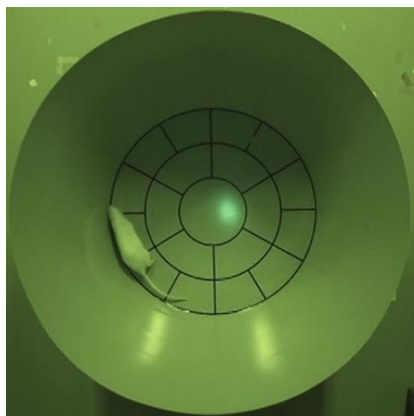


Fig. 3 オープンフィールド試験の様子

#### 2-4-2. 高架式十字迷路試験 (elevated plus maze test: EPMT)

試験当日の明期に各ラットを実験室へ運び、実験室への adaptation を 60 分間行った後、赤色灯下で EPMT を開始した。EPMT には、床から 40 cm の高さに設置した正方形の中央プラットフォーム (12 cm×12 cm) から、それぞれ反対方向へと伸びた 2 つの壁のない走行路 (オープンアーム; 幅 12 cm×長さ 51 cm)、および 2 つの壁で囲まれた走行路 (クローズドアーム; 幅 12 cm×長さ 51 cm×壁 40 cm) が十字に交差したアクリル製のアリーナを用いた。ただしオープンアームには、ラットが走行路から落下するのを防止するために、高さ 1 cm の壁を設置した。ラットをオープンアームに向けた状態でプラットフォームに置き、5 分間自由探索させた (Fig. 4)。EPMT でのラットの行動をアリーナの真上に設置したビデオカメラで撮影し、後日行動を解析した。各ラットの EPMT 終了後に、アリーナを消毒用アルコールで清拭した。各アームへの侵入は、ラットの四肢がすべてアーム内に入った時と定義した。オープンおよびクローズドアーム滞在時間を測定し、オープンおよびクローズドアームの総滞在時間に対するオープンアーム滞在時間の割合を不安様行動の指標とした。

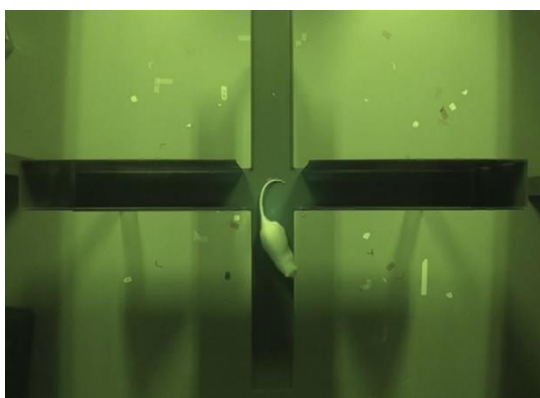


Fig. 4 高架式十字迷路試験の様子

### 2-4-3. 強制水泳試験 (forced swimming test: FST)

試験当日の明期に各ラットを実験室へ運び、実験室への adaptation を60分間行った後、赤色灯下で FST を開始した。透明なアクリル製の円筒型容器 (直径 20 cm×高さ 50 cm) に、水温を $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整した水道水を30 cm の高さまで満たした。初日は pre test を15分間行い、翌日に5分間の本試験を行った。試験終了後、各ラットを中型プラスチックケージ (幅 30 cm×奥行 35 cm×高さ 17 cm) に入れて別の実験室へ運び、予め設置していた白熱電球の下に置いた。中型プラスチックケージ内でラットをペーパータオルで拭き、ドライヤーで毛皮を乾燥させた後、ホームケージに戻した。なお、各ラットの試験開始前に円筒型容器と水は交換した。本試験ではラットの水中での行動を円筒型容器の横に設置したビデオカメラで撮影し、後日行動を解析した。行動は、よじ登り行動 (climbing)、水泳行動 (swimming)、無動行動 (immobility) の回数を評価した (Table 1 に評価した各行動の定義を示す)。評価方法は本試験時間を5秒ごとの区間に分け、各区間において最も顕著であった行動をスコア化するという既報のプロトコール (Detke et al., 1995) を用いた。

Table 1 強制水泳試験における行動の定義

行動名	定義
climbing	壁に向かって前肢を縦にかき、壁をよじ登ろうとする行動
swimming	水面に対して水平方向の行動
immobility	無動状態および水面上に頭を維持するための必要最小限の行動

### 2-5. 断頭および脳分画

各ラットにペントバルビタール Na (200 mg/kg 体重) を腹腔内に投与することで、深麻酔状態にした。麻酔薬投与から2分後に断頭し、全脳を迅速に摘出した。氷上にて左脳と右脳からそれぞれ海馬を分画し、背側海馬と腹側海馬に分離した (Yamada et al., 2013)。具体的には、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。



## 2-6. ウェスタンブロットティング

各海馬サンプルは、1 mM PMSF (CST)を添加した RIPA Buffer (CST)を組織重量に応じて加えた後、ソニケーションを用いて homogenize することで組織を溶解した。組織溶解液を遠心分離した後 (4°C, 14,000 rpm, 30 min)、上清を分取した。組織溶解液の上清中の総タンパク濃度は、Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific)を用いることで測定した。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になるように 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、室温で30分間静置した。

各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はウェット式ブロットティング装置 (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は室温で1時間、5% non-fat dry milk/TBST でブロッキング処理を行った後、一次抗体溶液中で振盪させながら4°Cで一晩インキュベートした。翌日、二次抗体溶液中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、各タンパク発現量は GAPDH の値で補正した。ウェスタンブロット法で用いた試薬類、機器類、およびプロトコールの詳細については Supplementary Information に示す。

## 2-7. RT-PCR

各海馬サンプルからの total RNA 抽出は、Isogen II (311-07361、ニッポンジーン)と SV Total RNA Isolation System (Z3105、Promega)を用いて、メーカーの推奨するプロトコールを一部改変して行った。total RNA の溶液濃度と A260/A280 値は Nanodrop (ThermoFisher)を用いて、完全性はホルマリン変性 1%アガロースゲル電気泳動を用いて確認した。A260/A280 値が 1.9 以上かつ完全性が十分に保たれている total RNA サンプルのみをその後の解析に用いた。

各サンプルの cDNA は、total RNA 0.5 µg に対し ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301、東洋紡ライフサイエンス)を用いて逆転写反応を行うことで作製した。その後リアルタイム PCR システム (AriaMx®, Agilent Technologies)とターゲット遺伝子に特異的に結合するプライマーオリゴ DNA を用いて、逆転写反応で生成した cDNA 量の定量を行った。定量は Pfaffl 法による相対定量とし、実験サンプル以外の外部標準 (external control)に対する発現量の比として算出した。ターゲット遺伝子の mRNA 発現量は *Actb* 遺伝子の mRNA 発現量を用いて補正した。RT-PCR 法で用いた試薬類、機器類、およびプロトコールの詳細については Supplementary Information に示す。

## 2-8. 統計学的解析

全てのデータは平均値  $\pm$  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。データの解析には R version 4.0.1 を用いた。各群のすべてのデータは、Shapiro-Wilk test および Levene test を用いて正規性と等分散性を評価した。ノンパラメトリックなデータについては、各統計処理を行う前に整列ランク変換 (aligned rank transform) を行った。各行動試験の結果については、利き手 (左利き、右利き) の影響を評価するために、student's *t*-test を用いて統計処理を行った。左脳および右脳の背側と腹側海馬におけるタンパクと mRNA 発現量については、利き手と大脳半球 (左脳、右脳) の2つの要因の影響を評価するために、two-way ANOVA を用いて統計処理を行った。各統計処理において各要因の交互作用で有意差が見られた場合、どの群間に差があるかを調べるために、Shaffer 法または Holm 法をそれぞれ用いて *post-hoc* 検定を行った。

### 3. 結果

#### 3-1. 肢嗜好性試験 (PPT)

計 33 匹の雄性 Wistar ラットに対して PPT を行った。PPT の test session における平均 right paw entry (RPE) 回数の結果を下に示す (Fig. 5)。その結果、ラット全体における平均 RPE 回数は  $27.5 \pm 4.8$  であった。その中で、左利き (left-pawed, 平均 RPE 回数  $\leq 15$ ) に属するラットが 11 匹 ( $4.5 \pm 1.3$ , 48%)、右利き (right-pawed, 平均 RPE 回数  $\geq 35$ ) に属するラットが 12 匹 ( $48.6 \pm 0.9$ , 52%) であり、いずれも明らかな嗜好性を示した。

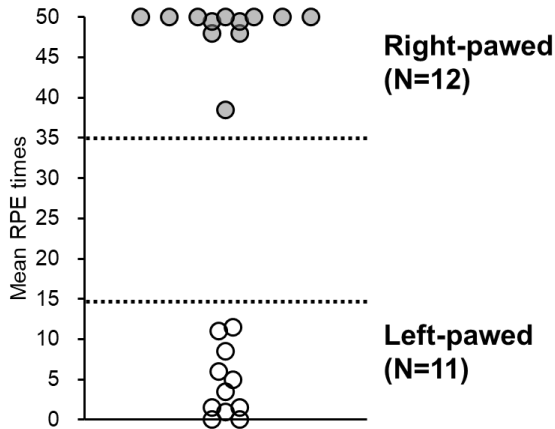


Fig. 5 各雄性 Wistar ラットの平均 RPE 回数

#### 3-2. オープンフィールド試験 (OFT)

OFT における総移動距離および中央滞在時間について、左利き群と右利き群の 2 群間で比較したところ、いずれも 2 群間で有意な差は認められなかった (Fig. 6A and B)

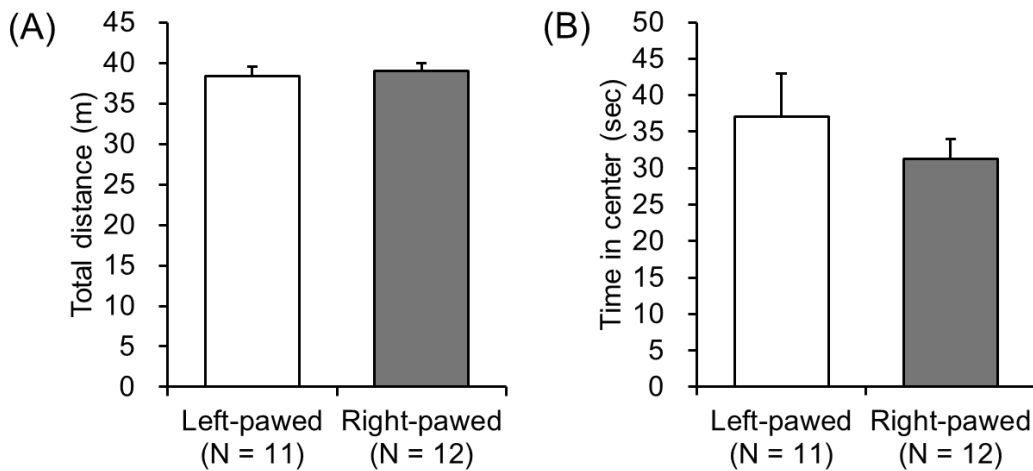


Fig. 6 利き手が OFT における総移動距離 (A)および中央滞在時間 (B)に与える影響

### 3-3. 高架式十字迷路試験 (EPMT)

EPMT におけるオープンアーム滞在時間の割合について、左利き群と右利き群の 2 群間で比較したところ、右利き群に比べて左利き群で有意に高かった ( $t_{(1,21)}=3.246, P<0.01$ , Fig. 7)。

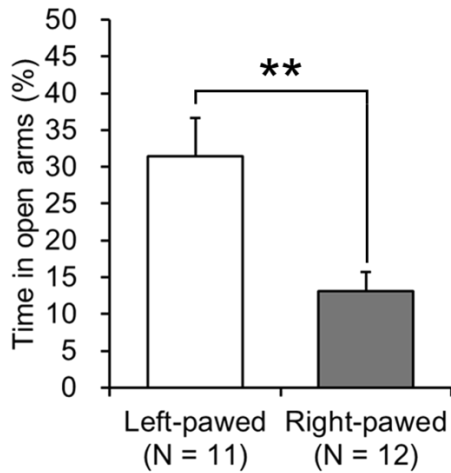


Fig. 7 利き手が EPMT におけるオープンアーム滞在時間の割合に与える影響 (\*\* $P<0.01$ )

### 3-4. 強制水泳試験 (FST)

FST における climbing、swimming および immobility 回数について、左利き群と右利き群の 2 群間で比較したところ、左利き群の immobility 回数は右利き群に比べて有意に高かった ( $t_{(1,21)}=2.250, P<0.05$ , Fig. 8)。一方、climbing および swimming 回数については 2 群間に有意な差は認められなかった (Fig. 8)。

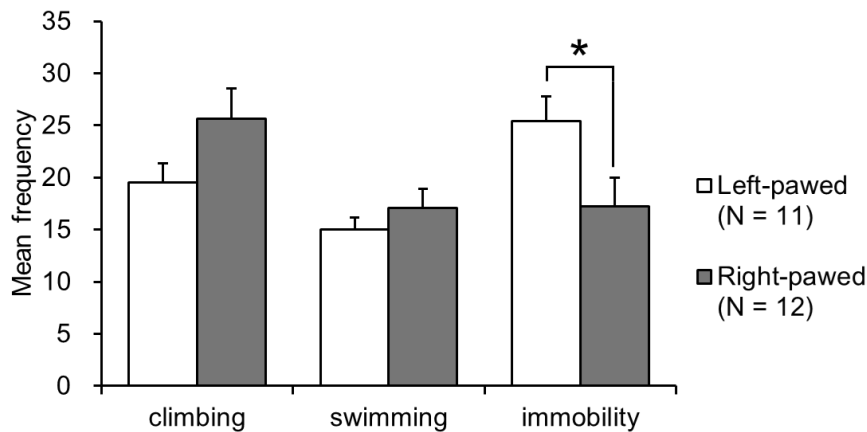


Fig. 8 利き手が FST における climbing、swimming および immobility 回数に与える影響 (\* $P<0.05$ )

### 3-5. 左脳および右脳の背側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル

BDNF タンパク発現量については、利き手×大脳半球による交互作用でのみ有意差が認められた ( $F_{(1,16)} = 5.313, P < 0.05, \text{Fig. 9A1}$ )。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、左脳の背側海馬における BDNF 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 ( $P < 0.05$ )。次に、p-TrkB 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、右脳に比べて左脳の背側海馬で有意に高かった ( $F_{(1,16)} = 10.94, P < 0.01, \text{Fig. 9B1}$ )。次に、p-TrkB リン酸化比率については、利き手による主効果でのみ有意差が認められ、右利き群に比べ左利き群で有意に低かった ( $F_{(1,16)} = 6.797, P < 0.05, \text{Fig. 9B2}$ )。次に、p-CREB タンパク発現量については、利き手×大脳半球による交互作用でのみ有意差が認められた ( $F_{(1,16)} = 5.872, P < 0.05, \text{Fig. 9C1}$ )。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、左脳の背側海馬における p-CREB タンパク発現量は、右利き群に比べて左利き群では有意に低かった ( $P < 0.05$ )。一方で、p-CREB リン酸化比率については、利き手×大脳半球による交互作用、利き手および大脳半球による主効果のいずれにおいても有意差は認められなかった ( $\text{Fig. 9C2}$ )。最後に、背側海馬における *Bdnf* mRNA 発現量については、利き手×大脳半球による交互作用、利き手および大脳半球による主効果のいずれにおいても有意差は認められなかった ( $\text{Fig. 9A2}$ )。

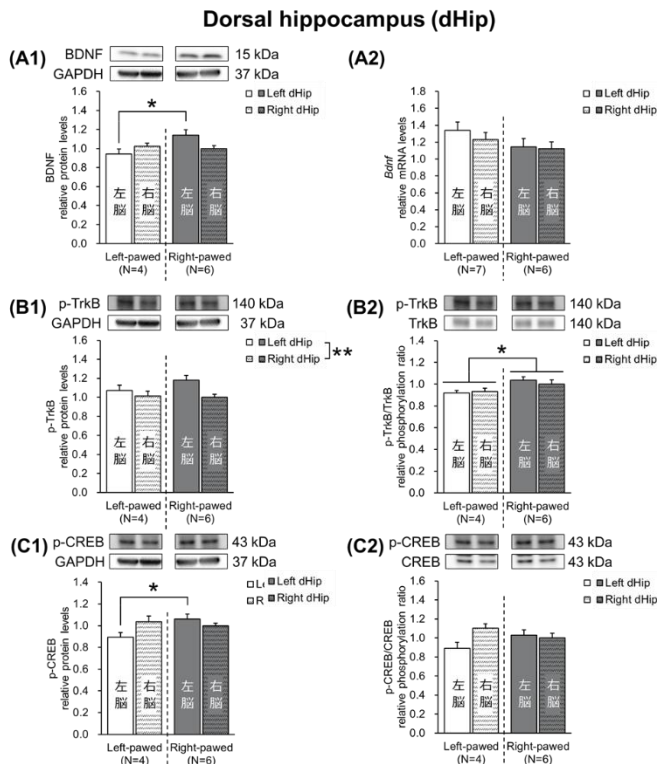


Fig. 9 利き手が左脳および右脳の背側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル関連タンパク発現量に与える影響 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

### 3-6. 左脳および右脳の腹側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル

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た ( $F_{(1,16)} = 6.360, P < 0.05$ , Fig. 10A1)。次に、p-TrkB タンパク発現量については、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. 10B1)。次に、p-TrkB リン酸化比率については、利き手×大脳半球による交互作用 ( $F_{(1,16)} = 14.56, P < 0.01$ )および大脳半球 ( $F_{(1,16)} = 4.877, P < 0.05$ )による主効果において有意差が認められた (Fig. 10B2)。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、右脳の腹側海馬における p-TrkB リン酸化比率は、右利き群に比べて左利き群で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。次に、p-CREB タンパク発現量については、利き手×大脳半球による交互作用 ( $F_{(1,16)} = 9.625, P < 0.01$ )、利き手 ( $F_{(1,16)} = 31.65, P < 0.001$ )および大脳半球 ( $F_{(1,16)} = 6.545, P < 0.05$ )による主効果のすべてにおいて有意差が認められた (Fig. 10C1)。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 ( $P < 0.001$ )。一方で、p-CREB リン酸化比率については、利き手×大脳半球による交互作用、利き手および大脳半球による主効果のいずれにおいても有意差は認められなかった (Fig. 10C2)。また、腹側海馬における *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 ( $F_{(1,22)} = 6.375, P < 0.05$ , Fig. 10A2)。

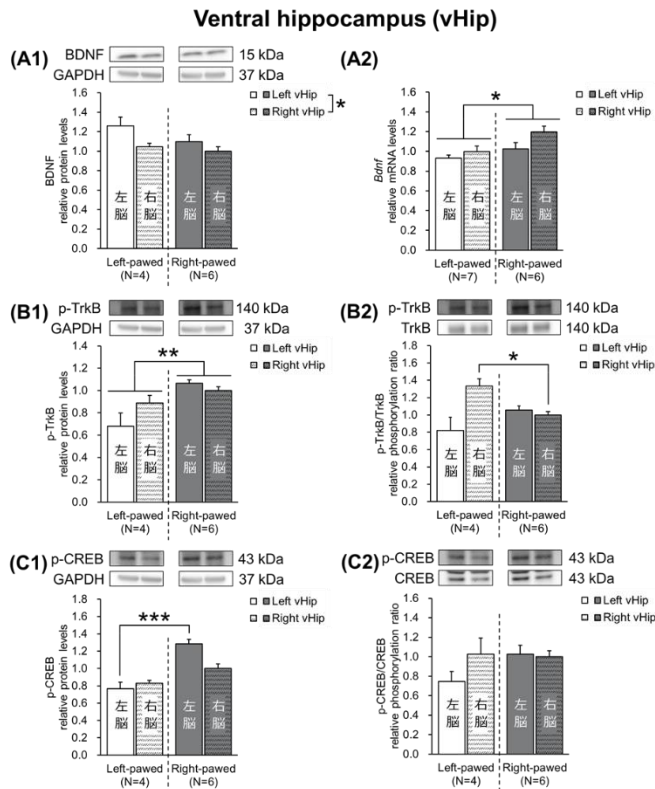


Fig. 10 利き手が左脳および右脳の腹側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル関連タンパクおよび mRNA 発現量に与える影響 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

#### 4. 考察

本章では、利き手によって左脳および右脳の海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性レベルと、うつ・不安様行動が異なるかどうかを検証した。その結果、右利きラットに比べて左利きラットでは、うつ様行動が多く、不安様行動が少なかった。また、右利きラットに比べて左利きラットでは、腹側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が低く、この差は特に左脳で顕著であった。

PPT は餌を獲得するために用いる前肢の嗜好性 (利き手) を調べる試験である (Cabib et al., 1995; Ecevitoglu et al., 2020; Soyman et al., 2015)。本研究で用いたすべての雄性 Wistar ラットは左または右前肢のいずれかの嗜好性を示し、その割合はそれぞれ 48% と 52% であった。この割合は、先行研究結果と一致している (Ecevitoglu et al. 2020; Soyman et al. 2015)。これらの報告から、本研究におけるラットの利き手の評価方法が妥当であることを示している。

まず、FST での行動について考察する。本研究では、右利き群に比べて左利き群は FST における immobility 回数が有意に多かった。FST は水中での無動行動 (immobility) を行動学的絶望とみなすことで、うつ症状を評価する試験である (Porsolt et al., 1977, 1978)。したがって、左利きラットは右利きラットに比べて強制水泳ストレス環境下でより強くうつ症状を示したと言える。本研究結果と同様に、左利きのヒトやラットは、右利きに比べてうつ症状が多いことが報告されている (Elias et al., 2001; Denny, 2009; Logue et al., 2015; Ecevitoglu et al., 2020; Soyman et al., 2015)。次に、OFT および EPMT における行動について考察する。OFT と EPMT は、不安症状の評価に用いられる行動試験である (Lira et al., 2003; Walf and Frye, 2007)。本研究では、EPMT におけるオープンアーム滞在時間の割合は右利き群に比べて左利き群で有意に高かった。一方で、OFT における中央滞在時間については左利き群と右利き群の 2 群間で有意な差は認められなかった。したがって本研究結果は、左利きラットは右利きラットに比べて特定の嫌悪環境での不安症状が低いことを示している。利き手と同様に行動の側性化の 1 つである夜間の活動期での自発的な circling 行動は、不安様行動に影響することが報告されている。OFT や高架式ゼロ迷路試験において、時計回りを好むマウスは反時計回りを好むマウスに比べて不安様行動が多いことが示されている (Kim et al., 2018)。また、肢嗜好性と同様に circling 行動はうつ様行動にも影響することが報告されている (Carlson and Glick, 1991; Krahe et al., 2002)。これらの報告は、利き手によって不安様行動が変化する可能性を支持している。しかしながら、ヒトの利き手と不安症状の関係を調べた研究では、右利きに比べて左利きのヒトは不安が高いことが示されており (Hicks and Pellegrini; 1978; Logue et al., 2015; Wright and Hardie, 2011)、本研究の結果と一致しない。この理由として、不安のタイプが関与していると考えられる。不安障害には強迫性障害など様々な不安のタイプが存在しており、げっ歯類で用いられる不安様行動試験は、それぞれ異なる不安のタイプを評価している (Griebel and Holmes, 2013)。実際に、OFT と EPMT でみられる不安のタイプは異なることが示されている (Cryan and Holmes, 2005; Radhakrishnan and Gulia, 2018)。したがって、利き手は、ある特定の不安タイプにのみ影響する可能性が考えら

れる。以上のことから、利き手によってうつ・不安症状が異なることが示唆された。

次に、利き手と左脳および右脳の海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナルの関係について考察する。本研究では、背側海馬については、左脳でのみ BDNF および p-CREB タンパク発現量が右利き群に比べて左利き群で有意に低かったが、*Bdnf* mRNA 発現量については 2 群間で有意な差は認められなかった。また、腹側海馬については、p-TrkB および p-CREB タンパク発現量が右利き群に比べて左利き群で有意に低く、また *Bdnf* mRNA 発現量についても同様に右利き群に比べて左利き群で有意に低かった。さらに、腹側海馬における p-CREB タンパク発現量の利き手依存的な違いは、右脳に比べて左脳で大きかった。海馬は解剖学的かつ機能の違いに基づいて背側領域と腹側領域の 2 つに分類でき、背側海馬は空間記憶や学習などの認知機能に関与しており、腹側海馬は感情やストレス反応を制御している (Fanselow and Dong, 2010; Gulyaeva, 2019; Moser and Moser, 1998; Sahay and Hen, 2007)。BDNF は海馬に多く発現しており (Barde et al., 1982; Ernfors et al., 1990)、TrkB や CREB のリン酸化を介して海馬神経機能を調節している (Castrén and Monteggia et al., 2021; Finkbeiner et al., 1997; von Bohlen Und Halbach and von Bohlen Und Halbach, 2018)。また、CREB は BDNF 転写を調節しており、CREB の活性化は *Bdnf* mRNA 発現量を増加させる (Conti et al., 2002; Nibuya et al., 1996; Tao et al., 1998)。したがって、本研究結果は右利きラットに比べて左利きラットでは腹側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル活性レベルが低く、特に左脳で低いことを示唆している。

過去の多くの研究において、海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナルの減弱が、慢性ストレスによるうつ・不安様行動に関連していることが示されている (Garabadu et al., 2019; Jiang et al., 2019; Ji et al., 2021)。海馬歯状回の BDNF をレンチウイルスによって選択的にノックダウンしたラットでは、うつ様行動が増加することが報告されている (Taliaz et al., 2010, 2013)。また、BDNF を海馬に直接投与したラットではうつ様行動の減少を示し、この行動変化は TrkB アンタゴニストによって阻害されることが示されている (Shirayama et al., 2002)。さらに、腹側海馬に直接 BDNF を投与すると、うつ様行動が減少するが、不安様行動は増加することが報告されている (Deltheil et al., 2009)。したがって、利き手依存的なうつ・不安様行動の違いには、腹側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナルの違いが寄与していると考えられる。この結果を支持するように、過去の研究において行動特性と海馬 BDNF および TrkB 発現量の関連が報告されている。その例として、FST における無動行動が多いラットは、無動行動が少ないラットに比べて海馬 BDNF 発現量が低いこと (Stepanichev et al., 2018) また、同一系統のラットの中でも嫌悪刺激に対する学習能力が異なるように選別飼育した Roman low-avoidance と high-avoidance ラットの間で、海馬 BDNF および TrkB 発現量が異なることが示されている (Serra et al., 2017)。

また、BDNF や p-CREB の発現量の違いが神経活動レベルと密接に関連していることを踏まえると (Bukalo et al., 2016; Kitagawa et al., 2017)、利き手による左脳の海馬での BDNF や p-CREB タンパク発現量の違いは、左脳の神経活動レベルが異なる可能性を示している。左



脳と右脳はそれぞれ異なる感情制御を行っており、左脳はポジティブ感情、右脳はネガティブ感情の制御を行っている (Davidson et al., 1987; Silberman and Weingartner, 1986)。実際に、うつ病患者では右脳に比べて左脳の活動性が低い、つまりネガティブ感情が優位になりやすいことが報告されている (Herrington et al., 2010; Rotenberg, 2008)。しかし、不安と左脳・右脳活動性については、複雑な関連性が報告されている。不安感 (anxious apprehension) では左脳優位な活動が関連しているが、一方で不安覚醒 (anxious arousal) は右脳優位な活動と関連している (Bruder et al., 2017; Härpfer et al., 2021)。また、強い不安環境では左右の腹側海馬の活動性が異なることも報告されている (Sakaguchi and Sakurai, 2017)。そのため、不安における左脳・右脳の側性化は、そのタイプなどの要因によって異なると考えられる。ここで、EPMT と海馬の関係を調べた研究では、EPMT における不安様行動と左脳の海馬におけるグルタミン酸受容体発現量には正の相関があることが示されており (Xiang et al., 2011)、この結果は EPMT における不安の制御には左脳の海馬の活動性が関連していることを示唆している。したがってこれらの知見より、利き手依存的なうつ・不安様行動の違いには、左脳の海馬活動性が関連していると考えられる。

しかしながら、本研究結果には限界 (limitation) として健常なラットを用いたことに注意する必要がある。このことは、本研究における利き手による行動および神経科学的な違いが、うつ病や不安障害などの精神疾患であることを示すわけではない。したがって、利き手依存的な行動および神経科学的な違いがうつ病などの精神疾患の病態生理にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、今後はうつ病モデル動物を用いて調べる必要がある。

結論として、利き手によって左脳の腹側海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性が異なり、それによってうつ・不安様行動レベルが異なることが示唆された。このことは利き手によって、海馬による感情制御機能が異なることを示している。そのため、本研究結果は感情制御メカニズム解明において利き手は有用な指標となる可能性を強く期待させる。

## 参考文献

- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.*, 1:549-553, 1982. [PMID: 7188352]
- Berretz G, Wolf OT, Güntürkün O, Ocklenburg S. Atypical lateralization in neurodevelopmental and psychiatric disorders: What is the role of stress? *Cortex*, 125:215-232, 2020. [PMID: 32035318]
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101:14515-14520, 2004. [PMID: 15452348]
- Brookshire G, Casasanto D. Motivation and motor control: hemispheric specialization for approach motivation reverses with handedness. *PLoS One*, 7:e36036, 2012. [PMID: 22563436]
- Bruder GE, Stewart JW, McGrath PJ. Right brain, left brain in depressive disorders: Clinical and theoretical implications of behavioral, electrophysiological and neuroimaging findings. *Neurosci Biobehav Rev.*, 78:178-191, 2017. [PMID: 28445740]
- Budilin Slu, Pletneva EV, Ioffe ME, Arsen'ev GN. Motor asymmetry and learning new skills in animals. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.*, 64:201-207, 2014. [PMID: 25713870]
- Budilin Slu, Midzianovskaia IS, Shchegolevskii NV, Ioffe ME, Bazian AS. Asymmetry in the dopamine content in the nucleus accumbens and the motor preference in rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.*, 57:598-603, 2007. [PMID: 18064898]
- Bukalo O, Lee PR, Fields RD. BDNF mRNA abundance regulated by antidromic action potentials and AP-LTD in hippocampus. *Neurosci Lett.*, 635:97-102, 2016. [PMID: 27760383]
- Cabib S, D'Amato FR, Neveu PJ, Deleplanque B, Le Moal M, Puglisi-Allegra S. Paw preference and brain dopamine asymmetries. *Neuroscience*, 64:427-432, 1995. [PMID: 7700530]
- Carlson JN, Glick SD. Brain laterality as a determinant of susceptibility to depression in an animal model. *Brain Res.*, 550:324-328, 1991. [PMID: 1884240]
- Casarotto PC, Girysh M, Fred SM, Kovaleva V, Moliner R, Enkavi G, Biojone C, Cannarozzo C, Sahu MP, Kaurinkoski K, Brunello CA, Steinzeig A, Winkel F, Patil S, Vestring S, Serchov T, Diniz CRAF, Laukkanen L, Cardon I, Antila H, Rog T, Piepponen TP, Bramham CR, Normann C, Lauri SE, Saarma M, Vattulainen I, Castrén E. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell*, 184:1299-1313.e19, 2021. [PMID: 33606976]
- Castrén E, Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biol Psychiatry.*, 90:128-136, 2021. [PMID: 34053675]
- Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci.*, 22:3262-3268, 2002. [PMID: 11943827]
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov.*, 4:775-790, 2005. [PMID: 16138108]

Davidson RJ, Mednick D, Moss E, Saron C, Schaffer CE. Ratings of emotion in faces are influenced by the visual field to which stimuli are presented. *Brain Cogn.*, 6:403-411, 1987. [PMID: 3663382]

Deltheil T, Tanaka K, Reperant C, Hen R, David DJ, Gardier AM. Synergistic neurochemical and behavioural effects of acute intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor and antidepressants in adult mice. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 12:905-915, 2009. [PMID: 19236729]

Denny K. Handedness and depression: evidence from a large population survey. *Laterality*, 14:246-255, 2009. [PMID: 19012075]

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl.)*, 121:66-72, 1995. [PMID: 8539342]

Duman RS, Deyama S, Fogaça MV. Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants. *Eur J Neurosci.*, 53:126-139, 2021. [PMID: 31811669]

Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.*, 59:1116-1127, 2006. [PMID: 16631126]

Ecevitoglu A, Soyman E, Canbeyli R, Unal G. Paw preference is associated with behavioural despair and spatial reference memory in male rats. *Behav Processes.*, 180:104254, 2020. [PMID: 32961284]

Elias LJ, Saucier DM, Guylee MJ. Handedness and depression in university students: a sex by handedness interaction. *Brain Cogn.*, 46:125-129, 2001. [PMID: 11527310]

Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*, 5:511-526, 1990. [PMID: 2206535]

Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65:7-19, 2010. [PMID: 20152109]

Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19:1031-1047, 1997. [PMID: 9390517]

Garabadu D, Srivastava N, Murti Y. Calotropis procera attenuates chronic unpredictable mild stress-induced depression in experimental animals. *Metab Brain Dis.*, 34:1635-1647, 2019. [PMID: 31346860]

Griebel G, Holmes A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 12:667-687, 2013. [PMID: 23989795]

Gulyaeva NV. Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. *Neurochem Res.*, 44:1306-1322, 2019. [PMID: 30357653]

Härpfer K, Spychalski D, Kathmann N, Riesel A. Diverging patterns of EEG alpha asymmetry in anxious apprehension and anxious arousal. *Biol Psychol.*, 162:108111, 2021. [PMID: 33961931]

- Herrington JD, Heller W, Mohanty A, Engels AS, Banich MT, Webb AG, Miller GA. Localization of asymmetric brain function in emotion and depression. *Psychophysiology*, 47:442-454, 2010. [PMID: 20070577]
- Hicks RA, Pellegrini RJ. Handedness and anxiety. *Cortex*, 14:119-121, 1978. [PMID: 16295116]
- Ji CH, Gu JH, Liu Y, Tang WQ, Guan W, Huang J, Chen YM, Xu DW, Jiang B. Hippocampal MSK1 regulates the behavioral and biological responses of mice to chronic social defeat stress: Involving of the BDNF-CREB signaling and neurogenesis. *Biochem Pharmacol.*, 11:114836, 2021. [PMID: 34774532]
- Jiang N, Lv JW, Wang HX, Lu C, Wang Q, Xia TJ, Bao Y, Li SS, Liu XM. Dammarane sapogenins alleviates depression-like behaviours induced by chronic social defeat stress in mice through the promotion of the BDNF signalling pathway and neurogenesis in the hippocampus. *Brain Res Bull.*, 153:239-249, 2019. [PMID: 31542427]
- Jiang T, Wang XQ, Ding C, Du XL. Genistein attenuates isoflurane-induced neurotoxicity and improves impaired spatial learning and memory by regulating cAMP/CREB and BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling. *Korean J Physiol Pharmacol.*, 21:579-589, 2017. [PMID: 29200900]
- Kim D, Koo H, Cheon K. Differential anxiety-like behavior, HPA responsiveness, and host-resistance in mice with different circling preference. *J Neuroimmunol.*, 316:112-116, 2018. [PMID: 29338929]
- Kitagawa H, Sugo N, Morimatsu M, Arai Y, Yanagida T, Yamamoto N. Activity-Dependent Dynamics of the Transcription Factor of cAMP-Response Element Binding Protein in Cortical Neurons Revealed by Single-Molecule Imaging. *J Neurosci.*, 37:1-10, 2017. [PMID: 28053025]
- Krahe TE, Filgueiras CC, Schmidt SL. Effects of rotational side preferences on immobile behavior of normal mice in the forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 26:169-176, 2002. [PMID: 11853109]
- Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res.*, 1621:82-101, 2015. [PMID: 25451089]
- Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH, Bradley-Moore M, Lira J, Underwood MD, Arango V, Kung HF, Hofer MA, Hen R, Gingrich JA. Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry.*, 54:960-971, 2003. [PMID: 14625138]
- Logue DD, Logue RT, Kaufmann WE, Belcher HM. Psychiatric disorders and left-handedness in children living in an urban environment. *Laterality*, 20:249-256, 2015. [PMID: 25280263]
- Miyaniishi H, Nitta A. A Role of BDNF in the Depression Pathogenesis and a Potential Target as Antidepressant: The Modulator of Stress Sensitivity "Shati/Nat81-BDNF System" in the Dorsal Striatum. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14:889, 2021. [PMID: 34577589]
- Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8:608-619, 1998. [PMID: 9882018]

- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci.*, 15:7539-7547, 1995. [PMID: 7472505]
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci.*, 16:2365-2372, 1996. [PMID: 8601816]
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.*, 47:379-391, 1978. [PMID: 204499]
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 229:327-336, 1977. [PMID: 596982]
- Radhakrishnan A, Gulia KK. Categories of Wistar Rats Based on Anxiety Traits: A Study Using Factor and Cluster Method. *Ann Neurosci.*, 25:234-240, 2018. [PMID: 31000962]
- Rotenberg VS. Functional brain asymmetry as a determinative factor in the treatment of depression: theoretical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 32:1772-1777, 2008. [PMID: 18775761]
- Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci.*, 10:1110-1115, 2007. [PMID: 17726477]
- Sakaguchi Y, Sakurai Y. Left-right functional asymmetry of ventral hippocampus depends on aversiveness of situations. *Behav Brain Res.*, 325:25-33, 2017. [PMID: 28235588]
- Serra MP, Poddighe L, Boi M, Sanna F, Piludu MA, Corda MG, Giorgi O, Quartu M. Expression of BDNF and trkB in the hippocampus of a rat genetic model of vulnerability (Roman low-avoidance) and resistance (Roman high-avoidance) to stress-induced depression. *Brain Behav.*, 7:e00861, 2017. [PMID: 29075579]
- Shadli SM, Tewari V, Holden J, McNaughton N. Laterality of an EEG anxiety disorder biomarker largely follows handedness. *Cortex*, 140:210-221, 2021. [PMID: 34000477]
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci.*, 22:3251-3261, 2002. [PMID: 11943826]
- Silberman EK, Weingartner H. Hemispheric lateralization of functions related to emotion. *Brain Cogn.*, 5:322-353, 1986. [PMID: 3530287]
- Soyman E, Tunckol E, Lacin E, Canbeyli R. Right-but not left-paw use in female rats provides advantage in forced swim tests. *Behav Brain Res.*, 293:162-165, 2015. [PMID: 26213334]
- Stepanichev M, Manolova A, Peregud D, Onufriev M, Freiman S, Aniol V, Moiseeva Y, Novikova M, Lazareva N, Gulyaeva N. Specific Activity Features in the Forced Swim Test: Brain Neurotrophins and Development of Stress-induced Depressive-like Behavior in Rats. *Neuroscience*, 375:49-61, 2018. [PMID: 29438801]

- Taliaz D, Nagaraj V, Haramati S, Chen A, Zangen A. Altered brain-derived neurotrophic factor expression in the ventral tegmental area, but not in the hippocampus, is essential for antidepressant-like effects of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry.*, 74:305-312, 2013. [PMID: 22906519]
- Taliaz D, Stall N, Dar DE, Zangen A. Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. *Mol Psychiatry.*, 15:80-92, 2010. [PMID: 19621014]
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, 20:709-726, 1998. [PMID: 9581763]
- von Bohlen Und Halbach O, von Bohlen Und Halbach V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell Tissue Res.*, 373:729-741, 2018. [PMID: 29450725]
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.*, 2:322-328, 2007. [PMID: 17406592]
- Wang H, Zhou H, Guo Y, Gao L, Xu H. Voxel-Wise Analysis of Structural and Functional MRI for Lateralization of Handedness in College Students. *Front Hum Neurosci.*, 15:687965, 2021. [PMID: 34483863]
- Wright L, Hardie SM. Are left-handers really more anxious? *Laterality*, 17:629-642, 2012. [PMID: 22973815]
- Xiang X, Huang W, Haile CN, Kosten TA. Hippocampal GluR1 associates with behavior in the elevated plus maze and shows sex differences. *Behav Brain Res.*, 222:326-331, 2011. [PMID: 21497621]
- 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. [PMID: 23583289]

## 第2章 雄性 Wistar ラットの利き手が心理社会的ストレスによって出現するうつ関連症状と海馬 BDNF-TrkB-CREB シグナル活性変化に与える影響

### 1. 緒言

うつ病は、身体的および精神的健康の両方を損なう精神疾患であり、自殺や心血管障害の危険因子であることが報告されている (Charlson et al., 2013; Fuster and Vedanthan, 2008; Nemeroff and Goldschmidt-Clermont, 2012)。世界保健機関によると、2030年までにうつ病の障害調整生命年 (disability-adjusted life year: DALY) があらゆる疾患の中で最も高くなり、それに伴う甚大な社会的損失・医療費増大が予想されている (World Health Organization, 2017)。うつ病は「抑うつ」や「興味または喜びの喪失」といった中核症状と随伴症状 (不安症状、体重および食欲の変化など) の数によって診断されるため (American Psychiatric Association, 2013)、全てのうつ病患者が同じ症状を呈するとは限らない (Olbert et al., 2014)。このことは、うつ病患者ごとにその病態メカニズムが異なる可能性を示しており、この病態の多様性が臨床での適切な診断と治療を困難にしている (Belmaker and Agam, 2008)。この問題点を解決するためにも、うつ病の病態の形成に影響する要因、およびそのメカニズムを解明する必要がある。

本研究では、うつ病の病態に影響する要因の一つとして「利き手」に注目した。うつ病発症には心理社会的ストレスが強く関係しており (Björkqvist, 2001; Kessler, 1997)、興味深いことに、利き手によってストレスに対する視床下部-下垂体-副腎 (hypothalamus-pituitary-adrenal: HPA) 系の反応性が異なることが示されている (Neveu and Moya, 1997; Yang et al., 2018)。HPA系は生体内のストレス応答システムの一つであり、ストレス刺激が視床下部や下垂体を介して最終的に副腎からグルココルチコイド (ヒトではコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロン [corticosterone: CORT]) の分泌を促進することで、生体をストレス状況に適応させる (de Kloet et al., 1999)。ストレス環境下での HPA 系の活動異常は、うつ病発症に関与している (Harada et al., 2021 [Psychiatry Investigation 投稿中]; Nestler et al., 2002)。さらに、他の研究では左利きのヒトは右利きに比べて、うつ病発症リスクが高いことが示されており (Elias et al., 2001; Denny, 2009; Logue et al., 2015)、動物研究においても、左利きのラットは右利きに比べて、強制水泳ストレス環境下でのうつ様行動が多いことが報告されている (Ecevitoglu et al., 2020; Soyman et al., 2015)。これらの報告に加えて前章の結果から、ラットの利き手によってうつ・不安症状の程度が異なり、この利き手による精神症状の差異には、右脳ではなく左脳の海馬 BDNF シグナルの活性レベルの違いが関与する可能性が示された。また、HPA 系の反応性は海馬によるネガティブフィードバック機構によっても制御されている (de Kloet et al., 2007; Nestler et al., 2002)。これらの結果は、利き手による海馬の機能差がうつ病の病態の形成に関与することを示唆する。

そこで本章では、ストレス負荷を行ったラットを用いて、①利き手によって出現するうつ病関連症状は異なるのか、②利き手によって海馬における BDNF シグナル活性変化は異なる

るのか、③利き手による②の変化に大脳半球差はあるのか、の3点を明らかにすることを目的とした。

ストレス負荷法には居住者/侵入者 (Resident/Intruder: R/I)系を用いた。R/I系は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 (Hao et al., 2019)。R/I系を用いた心理社会的ストレスを負荷した動物では、うつ様行動の増加や体重および摂食量の減少などの様々な変化が確認されている (Becker et al., 2008; Iio et al., 2014; Yu et al., 2011)。これらの変化は、臨床におけるうつ病患者でみられる症状と類似しているため、モデル動物としての妥当性は高いと考えられている (Björkqvist, 2001; Kessler, 1997)。そして、私たちの過去の研究結果においても、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では、うつ病関連症状が出現することを確認している (Harada et al., 2021 [Psychiatry Investigation 投稿中]; Mori et al., 2020)。そこで、肢嗜好性試験を用いて利き手を評価した後、R/I系を用いた心理社会的ストレス負荷を10日間行った。各ラットのうつ関連症状を評価するためにうつ、不安、恐怖行動試験を実施した後、海馬におけるBDNFシグナル活性を評価した。



## 2.方法

### 2-1. 実験動物および飼育環境

本研究では、実験動物として雄性 Wistar ラット (搬入時8週齢、搬入時体重: 210-240 g、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。飼育環境と使用した飼料については第1章 2-1. と同様である。Wistar ラットは肢嗜好性試験期間を除いて飼料と水を自由に摂取させた。また、LE ラットについてはすべての期間において飼料と水を自由に摂取させた。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. 肢嗜好性試験 (paw preference test: PPT)

第1章 2-2. と同様である。

### 2-3. Resident/Intruder paradigm を用いた心理社会的ストレス負荷

#### 2-3-1. Resident colony の作製と Intruder ラット

Resident/Intruder 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)と雌性 LE ラット (搬入時6週齢)を1匹ずつ特大型プラスチックケージ (幅 50 cm×奥行 40 cm×高さ 20 cm)で3週間集団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 23 cm×奥行 14 cm×高さ 12 cm)で単独飼育を行った雄性 Wistar ラットを用いた。

#### 2-3-2. 雄性 Resident ラットの衝動性トレーニング

衝動性の高い雄性 Resident ラットを選別するために、colony 作製後、1回につき10分間の衝動性トレーニングを本実験開始前の1週間に3回以上行った。衝動性トレーニングでは、本実験で用いる Intruder ラットとは別に、未処置の雄性 Wistar ラット (トレーニング用 Intruder ラット)を用いた。すべての衝動性トレーニングにおいてトレーニング用 Intruder ラットを10分以内に降伏体勢 (Fig. 11)にさせた Resident colony のみを本実験に用いた。



Fig. 11 降伏体勢 (submissive posture)

Intruder ラットが背中・横腹を地に付け、無抵抗な状態 (社会的敗北ストレスの指標)

### 2-3-3. 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 系は社会的敗北ストレスと脅威ストレスの2種類のストレスを組み合わせることで、心理社会的ストレスを負荷する実験系である (Berton et al., 2006)。本研究における心理社会的ストレス負荷は、Mori ら (2020)が報告したプロトコールを用いて行った。R/I 系を用いた心理社会的ストレス負荷プロトコールを次頁に示す (Fig. 12)。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 LE 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 ラットから様々な嫌がらせ行動を受けるが、その中でもストレス負荷開始10分以内に降伏体勢 (submissive posture)またはすくみ行動 (freezing)を示した 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。明確な降伏体勢が見られた後、直ちに Intruder ラットを金属製 wire mesh cage (幅 15 cm×奥行 20 cm×高さ 15 cm)に入れて Resident colony の中央に静置した。Intruder ラットを wire mesh cage 内に入れることにより、Resident ラットとの過度な身体的接触、および Intruder ラットの激しい身体的受傷を防ぐことができる。同時に Resident ラットとの視覚的、嗅覚的、聴覚的な接触を継続させることで、Intruder ラットに脅威ストレス負荷を行った (Fig. 13)。ストレス負荷開始から30分経過した時点で、Intruder ラットを wire mesh cage から取り出し、ホームケージに戻した。なお、Intruder ラットがストレス負荷開始10分以内に明確な降伏体勢を示さなかった場合、開始から10分経過した時点で 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 作製用の特大型プラスチックケージ内に入れて10分間観察した。その後、wire mesh cage に入れて特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。

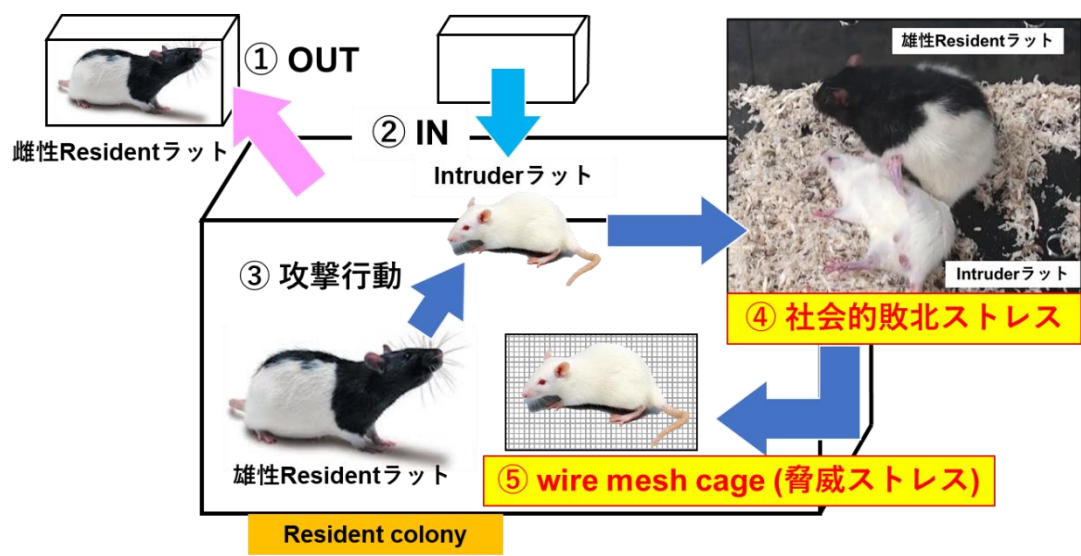


Fig. 12 Resident-Intruder 系を用いた心理社会的ストレス負荷プロトコール

- ① Resident colony から雌性 Resident ラットを別ケージに移す。
- ② Intruder ラットを Resident colony に入れる。
- ③ 雄性 Resident ラットが Intruder ラットに対して様々な嫌がらせ行動を仕掛ける。
- ④ 10分以内に、Intruder ラットが 降伏体勢 (submissive posture) またはすくみ行動 (freezing) を示した場合に「Intruder ラットに社会的敗北ストレスが負荷された」とみなす。
- ⑤ 明確な降伏体勢または開始から10分経過した場合、直ちに Intruder ラットを金属製 wire mesh cage に入れ、それ以上の過度な身体的接触 (被攻撃や外傷) を避ける。Intruder ラットを入れた wire mesh cage を Resident colony の中央に置き、Intruder ラットに脅威ストレスを負荷する。
- ⑥ ②からの経過時間として合計で30分間観察する。



Fig. 13 金属製 wire mesh cage を用いた脅威ストレス負荷  
Resident ラットとの身体的接触を除き、嗅覚・視覚・聴覚的な接触によるストレス負荷

## 2-4. 実験スケジュールおよび群分け

本研究における実験スケジュールを下に示す (Fig. 14)。雄性 Wistar ラット (Intruder ラット) は実験環境への adaptation を1週間行った。その後、PPT を8日間で4セッション行うことにより、各ラットの利き手を決定した。最終 PPT の2日後から、R/I 系を用いた心理社会的ストレス負荷または Novel cage 処置を1日1回10日間行った。各ラットを利き手 (左利き群と右利き群) と心理社会的ストレス負荷の有無 [Stress 群 (心理社会的ストレス負荷) と Control 群 (Novel cage 処置)] の計4群に分類した。最終ストレス負荷終了後に、後述する行動実験を行った後、断頭・脳分面を行った。そのうち、左利きラット11匹と右利きラット11匹はウエスタンブロットティングに、左利きラット13匹と右利きラット12匹は RT-PCR に使用した。

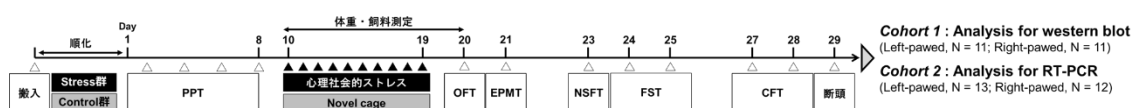


Fig. 14 本研究における実験スケジュール

(PPT: 肢嗜好性試験、OFT: オープンフィールド試験、EPMT: 高架式十字迷路試験、NSFT: 新奇環境下食餌行動抑制試験、FST: 強制水泳試験、CFT: 恐怖条件付け試験)

## 2-5. 体重・飼料測定

各ラットの体重および飼料の残量は、ストレス負荷開始日から最終ストレス負荷終了翌日まで毎日測定した。それぞれのデータに基づき、体重増加率および累積食餌摂食量を算出した。

## 2-6. 行動実験

### 2-6-1. オープンフィールド試験 (open field test: OFT)

第1章 2-4-1. と同様である。

### 2-6-2. 高架式十字迷路試験 (elevated plus maze test: EPMT)

第1章 2-4-1. と同様である。

### 2-6-3. 新奇環境下食餌行動抑制試験 (novelty-suppressed feeding test: NSFT)

NSFT の24時間前から各ラットを絶食状態にして、試験当日の明期に各ラットを実験室へ運び、実験室への adaptation を60分間行った後、赤色灯下で NSFT を開始した。アクリル製のアリーナ (幅82 cm×奥行82 cm×高さ45 cm) の中心部に予め接着しておいた直径5.5 cm のプラスチック製シャーレの中に飼料 (CE-2) を1粒置いた。アリーナの隅からラットを1匹入れて観察し、摂食を開始するまでの時間 (食潜時: latency) を測定した (Fig. 15)。飼料は摂食開始を確認後すぐに取り除き、最低5分間は装置内に留まらせてからラットをホームケージに戻した。5分以上かかった場合は、摂食後すぐにホームケージに戻した。12分以上経過しても摂食行動が見られない場合、latency は12分とした。

また、latency の変化がラットの食欲に依存している可能性があるため、後述の方法でホームケージ内における appetite drive を評価した。NSFT 終了後、各ラットを飼育室に戻して10分間の adaptation を行った後、飼料5粒の重さを計測し、各ラットのケージ蓋に置いた。10分経過後、飼料を回収・計測して摂食量を算出し、appetite drive として評価した。

#### 摂食を開始するまでの時間 (Latency)

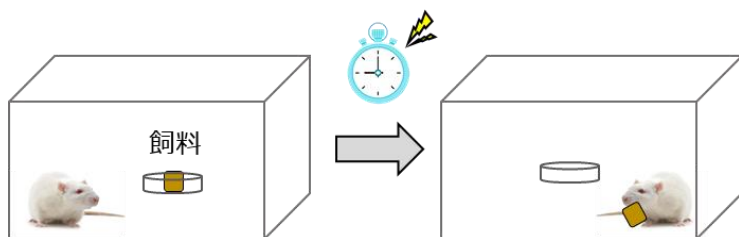


Fig. 15 NSFT プロトコールの模式図

- ① テスト24時間前からラットを絶食状態にする。
- ② アリーナの中心部に置いたシャーレに飼料を1粒置いておき、ラットが摂食を開始するまでの時間 (latency) を測定する。
- ③ 12分以上経過しても摂食行動が見られない場合、latency は12分とする。

### 2-6-4. 強制水泳試験 (forced swimming test: FST)

第1章 2-4-3. と同様である。

### 2-6-5. 恐怖条件付け試験 (conditioned fear test: CFT)

試験当日の明期にラットを実験室へ運び、実験室への adaptation を10分間行った後、赤色灯下で CFT を開始した。CFT にはフットショック装置 (室町機械)を用いた。1日目 (acquisition session)では、恐怖条件付け学習を14分間行った。ラットを装置に入れて、2分間自由探索させた後、計10回のフットショック (0.8mA、2秒間、60秒間隔)を行った。その後、再びフットショック無しの条件下で2分間自由探索させた後、ラットをホームケージに戻した。2日目 (recall session)では、再びラットを1日目と同じ装置に入れ、フットショック無しの条件下で8分間自由探索させた。recall session におけるラットの行動を、装置の直上に設置したビデオカメラで撮影し、後日行動を解析した。各ラットの CFT 終了後に、装置を消毒用アルコールで清拭した。すくみ行動 (Freezing)は呼吸運動以外の体動を示さない状態が3秒以上持続した時と定義した。recall session における Freezing 時間を測定し、試験時間に対する Freezing 時間の割合を恐怖行動の指標とした。

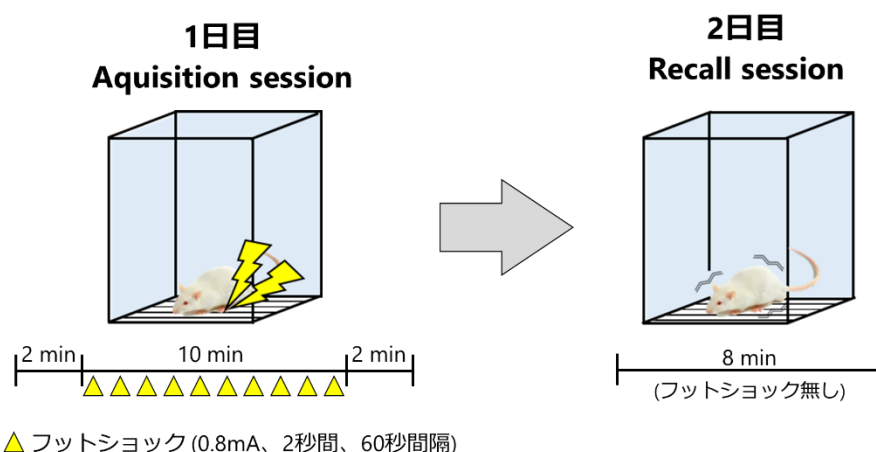


Fig. 16 CFT プロトコールの模式図

### 2-7. 断頭および脳分画

第1章 2-5. と同様である。

### 2-8. ウェスタンブロッティング

各海馬サンプルは、100×protease/phosphatase inhibitor cocktail (CST)を添加した RIPA Buffer (CST)を組織重量に応じて加えた後、ソニケーションを用いて homogenize することで組織を溶解した。組織溶解液は遠心分離した後 (4°C, 14,000 rpm, 10 min)、上清を分取した。組織溶解液の上清中の総タンパク濃度は、Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific)を用いて測定した。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になるように RIPA buffer を加えた後、1.25M dithiothreitol (CST)を添加した3×blue loading buffer (CST)を加え、95°Cで5分間加熱した。以降の手順については第1章 2-6. と同様である。

## 2-9. RT-PCR 法

第1章 2-7. と同様である。

## 2-10. 統計学的解析

全てのデータは平均値  $\pm$  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。データの解析には R version 4.0.1 を用いた。各群のすべてのデータは、Shapiro-Wilk test および Levene test を用いて正規性と等分散性を評価した。ノンパラメトリックなデータについては、各統計処理を行う前に整列ランク変換 (aligned rank transform) を行った。体重増加率については、利き手 (左利き、右利き)、ストレス (Stress、Control) と経過日数の3つの要因の影響を評価するために、repeated three-way analysis of variance (ANOVA) を用いて統計処理を行った。各行動試験の結果および累積食餌摂食量については、利き手とストレスの2つの要因の影響を評価するために、two-way ANOVA を用いて統計処理を行った。左脳と右脳の背側および腹側海馬におけるタンパクと mRNA 発現量については、利き手、ストレスと大脳半球 (左脳と右脳) の3つの要因の影響を評価するために、three-way ANOVA を用いて統計処理を行った。各統計処理において各要因の交互作用で有意差が見られた場合、どの群間に差があるかを調べるために、Shaffer 法または Holm 法をそれぞれ用いて *post-hoc* 検定を行った。

### 3. 結果

#### 3-1. ストレス負荷期間中における体重増加率

ストレス負荷期間中における体重増加率については、ストレス×経過日数による交互作用でのみ有意差が認められ、Control 群に比べて Stress 群で体重増加率が有意に低かった ( $F_{(10, 430)} = 19.65, P < 0.001, \text{Fig. 17}$ )。

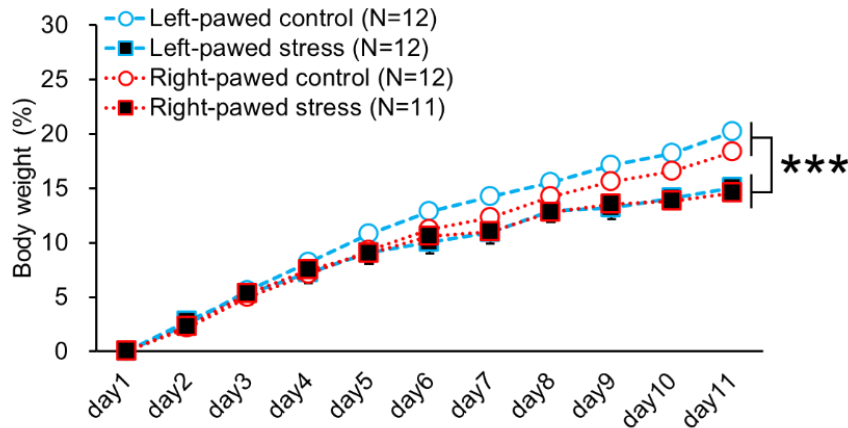


Fig. 17 R/I系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの体重増加率に与える影響 (\*\*\*) $P < 0.001$ )

#### 3-2. ストレス負荷期間中における累積食餌摂取量

ストレス負荷期間中における累積食餌摂取量については、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 ( $F_{(1, 43)} = 4.701, P < 0.05, \text{Fig. 18}$ )。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、ストレス負荷期間中の累積食餌摂取量は、左利き群でのみ Control 群に比べて Stress 群で有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

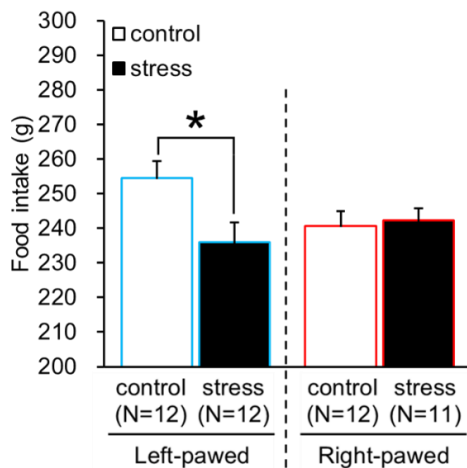


Fig. 18 R/I系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの累積食餌摂取量に与える影響 (\* $P < 0.05$ )



### 3-3. オープンフィールド試験 (OFT)

OFT における総移動距離および中央滞在時間については、利き手×ストレスによる交互作用、利き手およびストレスによる主効果のいずれにおいても有意差は認められなかった (Fig. 19A and B)。

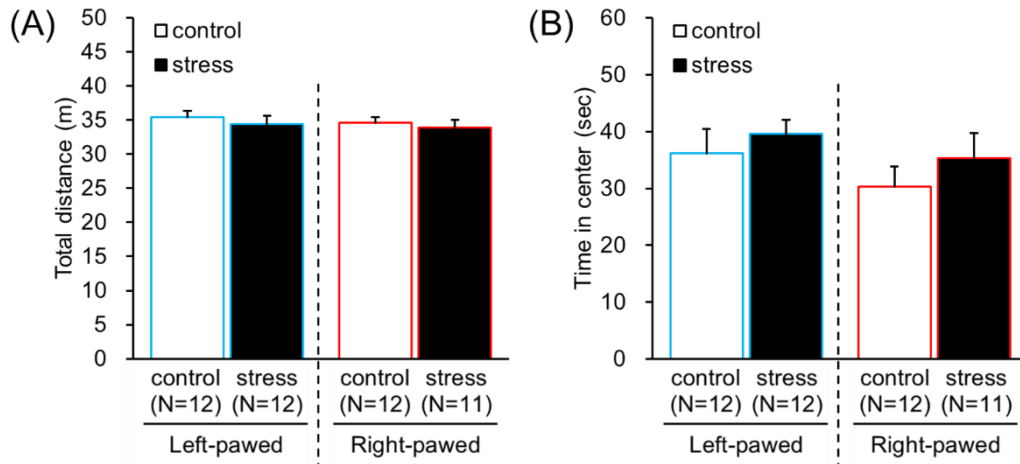


Fig. 19 R/I 系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの OFT における総移動距離 (A)および中央滞在時間 (B)に与える影響

### 3-4. 高架式十字迷路試験 (EPMT)

EPMT におけるオープンアーム滞在時間の割合については、利き手×ストレスによる交互作用、利き手およびストレスによる主効果のいずれにおいても有意差は認められなかった (Fig. 20)。

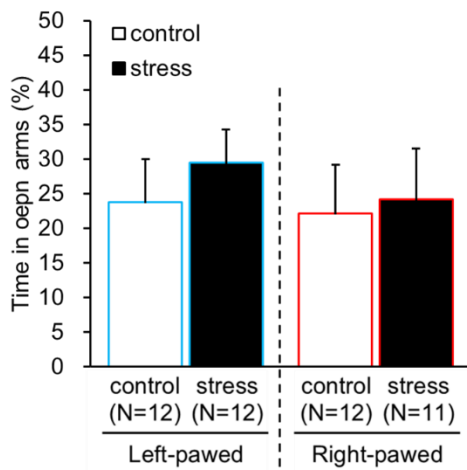


Fig. 20 R/I 系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの EPMT におけるオープンアーム滞在時間の割合に与える影響

### 3-5. 新奇環境下食餌行動抑制試験 (NSFT)

NSFT における食潜時 (latency) については、ストレスによる主効果でのみ有意差が認められ、Control 群に比べて Stress 群で有意に高かった ( $F_{(1,43)} = 8.548, P < 0.01$ , Fig. 21A)。また、NSFT 終了後のホームケージ内での appetite drive については、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 ( $F_{(1,43)} = 4.136, P < 0.05$ , Fig. 21B)。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、いずれの利き手群においても Control 群と Stress 群の 2 群間で有意差は認められなかった。

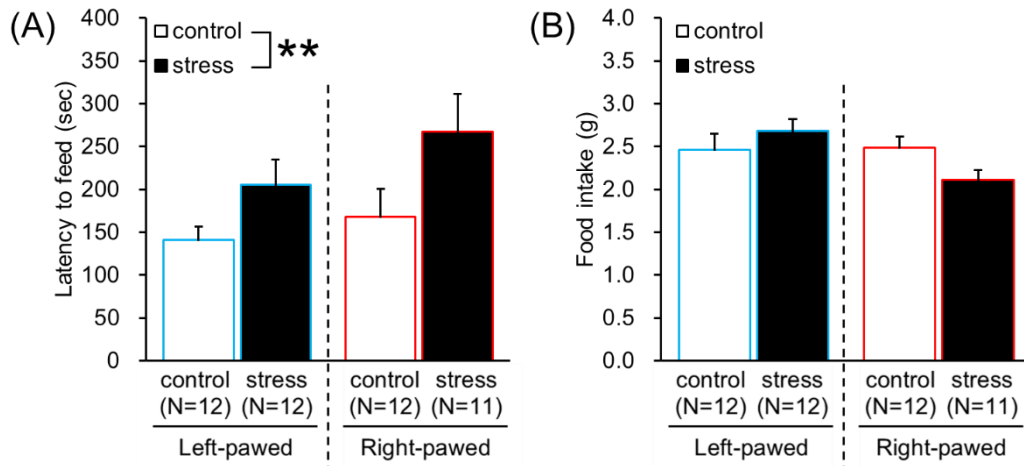


Fig. 21 R/I系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの NSFT における latency (A)および appetite drive (B)に与える影響 (\*\* $P < 0.01$ )

### 3-6. 強制水泳試験 (FST)

FST における immobility 回数については、ストレスによる主効果でのみ有意差が認められ、Control 群に比べて Stress 群で有意に高かった ( $F_{(1,43)} = 48.55, P < 0.001$ , Fig. 22)。また、climbing および swimming 回数については、ストレスによる主効果でのみ有意差が認められ、Control 群に比べて Stress 群で有意に低かった ( $F_{(1,43)} = 12.17, P < 0.01$ ;  $F_{(1,43)} = 35.40, P < 0.001$ , Fig. 22)。

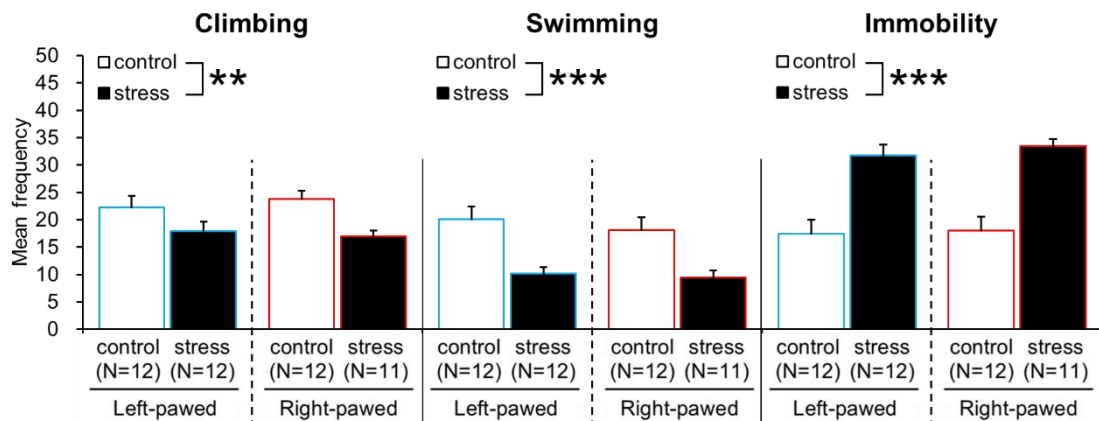


Fig. 22 R/I系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの FST における climbing、swimming および immobility 回数に与える影響 (\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )

### 3-7. 文脈的恐怖条件づけ試験 (CFT)

CFT における Freezing 時間の割合については、ストレスによる主効果でのみ有意差が認められ、Control 群に比べて Stress 群で有意に高かった ( $F_{(1,43)} = 11.26, P < 0.01, \text{Fig. 23}$ )。

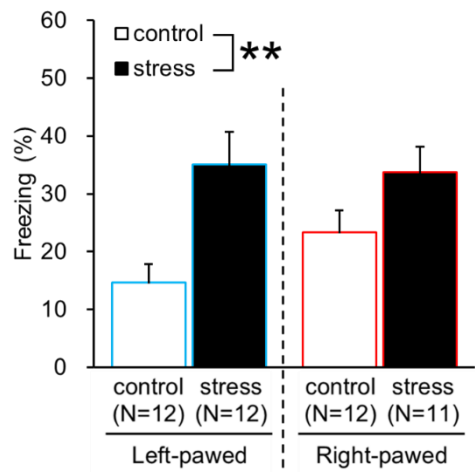


Fig. 23 R/I系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの CFT における Freezing 時間の割合に与える影響 (\*\* $P < 0.01$ )

### 3-8. 左脳および右脳の背側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル

BDNF タンパク発現量については、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 ( $F_{(1,36)} = 13.35, P < 0.001$ , Fig. 24A)。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 タンパク発現量は、左利き群では Control 群に比べて Stress 群で有意に高く ( $P < 0.01$ )、右利き群では Control 群に比べて Stress 群で有意に低かった ( $P < 0.05$ )。次に、p-CREB リン酸化比率については、利き手×ストレス×大脳半球による交互作用でのみ有意差が認められた ( $F_{(1,36)} = 5.096, P < 0.05$ , Fig. 24C2)。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、いずれの利き手群においても Control 群と Stress 群の 2 群間で有意差は認められなかった。一方で、p-TrkB および p-CREB タンパク発現量と p-TrkB リン酸化比率については、いずれの交互作用および主効果においても有意差は認められなかった (Fig. 24B1, C1 and B2)。また、背側海馬における *Bdnf* mRNA 発現量については、いずれの交互作用および主効果においても有意差は認められなかった (Fig. 24D)。

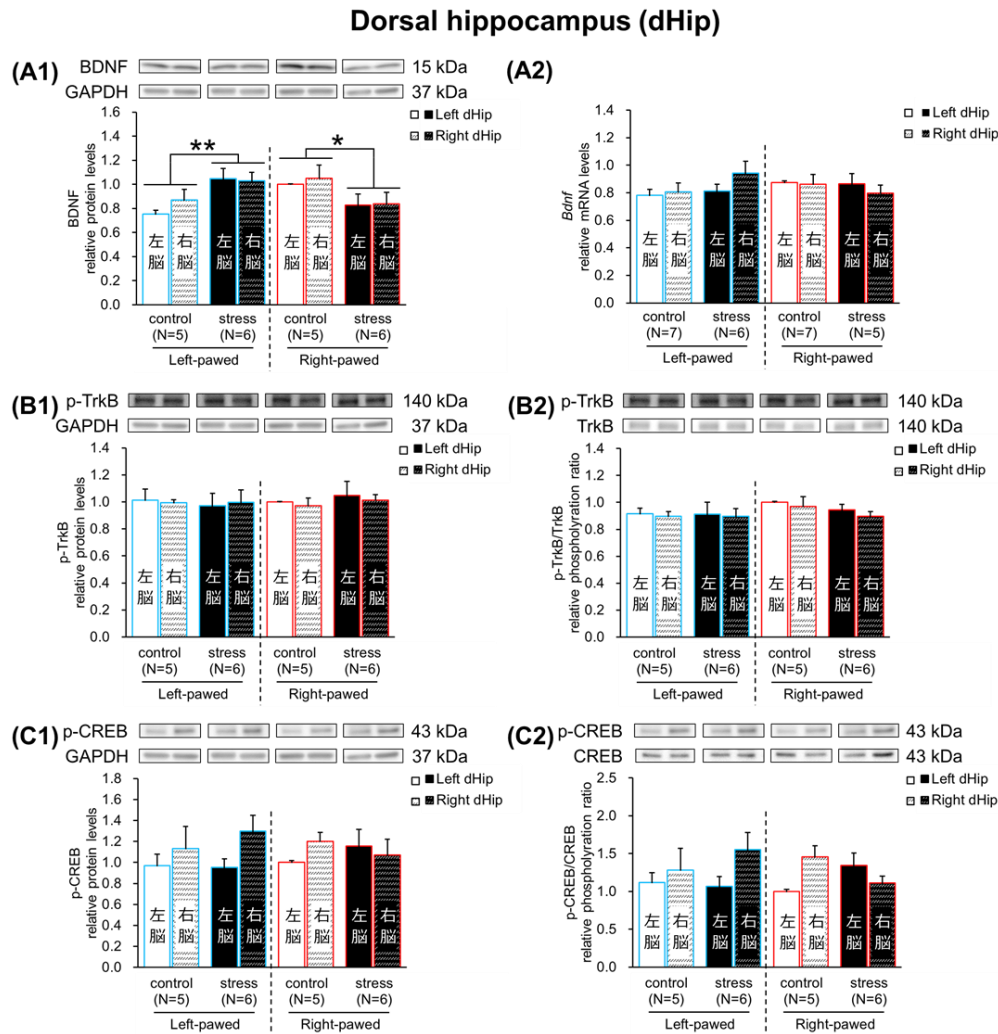


Fig. 24 R/I系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの左脳および右脳の背側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル関連タンパクおよび mRNA 発現量に与える影響 (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )

### 3-9. 左脳および右脳の腹側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル

BDNF タンパク発現量および p-TrkB リン酸化比率については、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 ( $F_{(1, 36)} = 15.43, P < 0.001, \text{Fig. 25A1}$ ;  $F_{(1, 36)} = 6.978, P < 0.05, \text{Fig. 25B2}$ )。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 タンパク発現量および p-TrkB リン酸化比率は、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 ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.05$ )。一方で、p-TrkB および p-CREB タンパク発現量と p-CREB リン酸化比率については、いずれの交互作用および主効果においても有意差は認められなかった (Fig. 25B1, C1 and C2)。また、腹側海馬における *Bdnf* mRNA 発現量については、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 ( $F_{(1, 42)} = 8.606, P < 0.01, \text{Fig. 25A2}$ )。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* mRNA 発現量は、右利き群でのみ Control 群に比べて Stress 群で有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

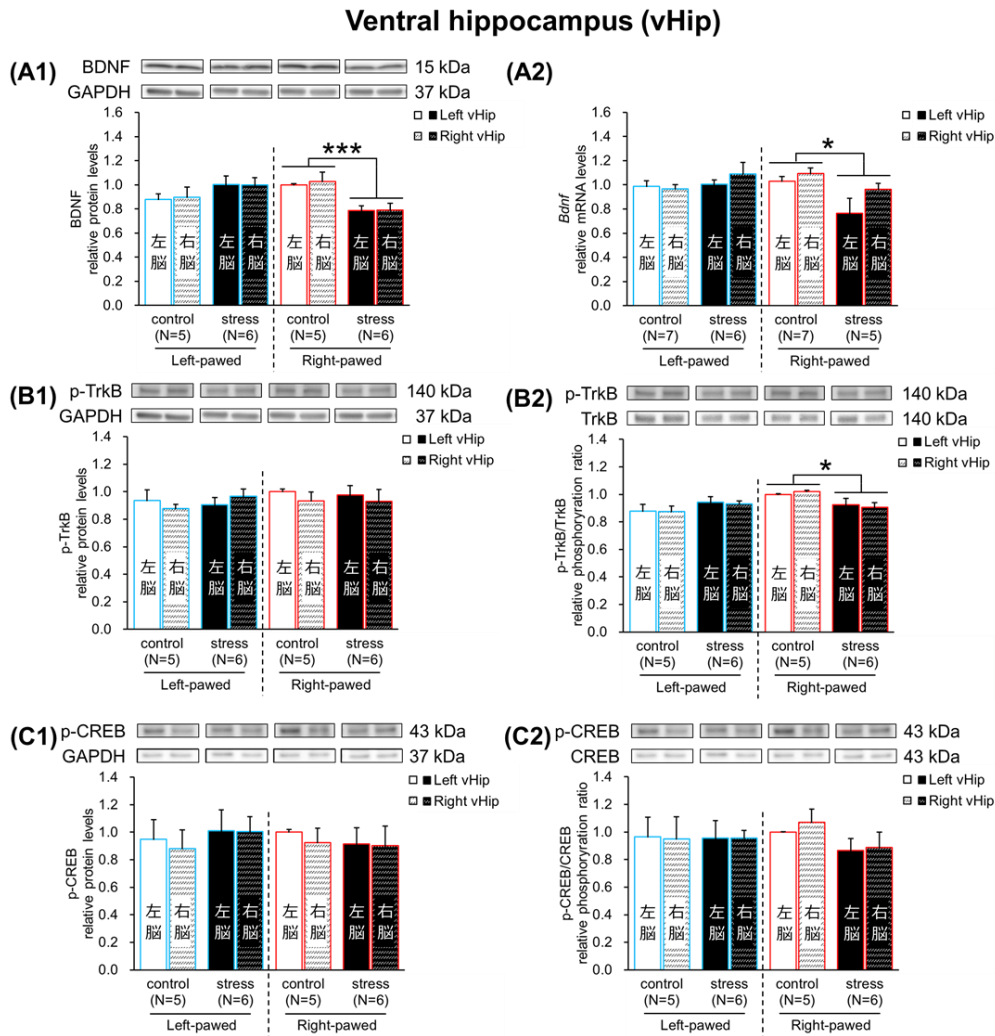


Fig. 25 R/I系を用いた心理社会的ストレスが左利きと右利きラットの左脳および右脳の腹側海馬における BDNF-TrkB-CREB シグナル関連タンパクおよび mRNA 発現量に与える影響 (\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )

#### 4. 考察

本章では、ストレス負荷を行ったラットを用いて、①利き手によって出現するうつ病関連症状は異なるのか、②利き手によって海馬における BDNF シグナル活性変化は異なるのか、③利き手による②の変化に大脳半球差はあるのか、の 3 点を明らかにすることを目的とした。その結果、心理社会的ストレス負荷によって出現するうつ病に関連する精神症状は、いずれの利き手においても同一の症状を呈するが、身体症状については利き手によって一部異なっていた。また、腹側海馬における BDNF シグナル活性は、左脳と右脳に関わらず右利きラットでのみ心理社会的ストレスによって減少した。

本研究ではうつ病関連症状である身体症状を評価するために、体重増加率と累積食餌摂取量を測定した。その結果、体重増加率は利き手に関係なく Control 群に比べて Stress 群で低かったのに対し、累積食餌摂取量は左利きラットでのみ Control 群に比べて Stress 群で低かった。過去の研究では、R/I 系を用いた心理社会的ストレスを含む多くのストレス実験系で体重が減少することが報告されているため、体重増加率の減少は実験動物がストレスを受けているという信頼性の高い指標と見なされている (Muscat and Willner, 1992; Sapolsky et al., 2000)。そのため本研究結果は、心理社会的ストレスによる体重減少 (ストレス反応) は利き手の違いによらず確実に引き起こされる、一貫性の高い変化であることを示している。その一方で、ストレスが摂食行動に与える影響については、ストレス負荷により摂食量が増加、減少、または変化しない、など一貫した結果が得られてない (Patki et al., 2009)。過去の報告では、急性および慢性ストレスによる摂食行動変化は、ストレス応答システムの一つである HPA 系が関与することが示されている (Epel et al., 2001)。また、ストレス刺激に対する HPA 系の反応性には個体差が存在することが広く知られており (Franklin et al., 2012; McIlwrick et al., 2017)、その個体差には利き手が関与することが報告されている (Neveu and Moya, 1997; Yang et al., 2018)。そのため、これらの既報知見と本研究結果を組み合わせると、ストレスが摂食行動に与える影響について研究間で不一致が生じる原因の一つに、利き手が関与している可能性が考えられる。

本研究ではうつ病関連症状である精神症状を評価するために不安、うつ、および恐怖行動試験を行った。前章でも述べた通り、OFT および EPMT は不安様行動の評価に用いられる行動試験である。そして、NSFT は新奇環境による不安と食欲との葛藤ベースに摂食を開始するまでの時間 (食潜時: latency) の長さを不安の尺度として評価する行動試験である (Bodnoff et al., 1988)。本研究では、OFT および EPMT での不安様行動については、利き手とストレスのいずれの条件においても有意な変化が認められなかった。一方、NSFT での latency は利き手に関係なく Control 群に比べて Stress 群で高かった。過去の報告では、心理社会的ストレス負荷により OFT、EPMT、および NSFT において、不安様行動が増加することが示されている (Kinsey et al., 2007; Krishnan et al., 2007; Mori et al., 2020)。そのため、本研究における NSFT での結果は過去の研究結果と一致しているが、OFT および EPMT での結果は過去研究と異なっている。この理由として、本研究で用いた動物種が先行研究と異なる

ことが考えられる。マウスを用いた多くの研究では、心理社会的ストレスによって OFT や EPMT における不安様行動が増加することが示されているが (Kinsey et al., 2007; Krishnan et al., 2007; Liao et al., 2021; Venzala et al., 2012)、ラットを用いた研究では、OFT や EPMT における不安様行動が変化しないことが複数報告されている (Hayashida et al., 2010; McCormick et al., 2008; Morais-Silva et al., 2019; Rygula et al., 2008; Yang et al., 2019)。動物種の違いによって心理社会的ストレスが不安様行動に与える影響が異なるメカニズムについては詳しく分かっていないが、これまでの研究知見を踏まえると、心理社会的ストレスを負荷したラットでは、OFT や EPMT における不安様行動の変化を捉えにくいのではないかと考えられる。本研究において OFT と EPMT を実施した理由は、同試験が不安行動試験として広く使用されているからであるが (Griebel and Holmes, 2013; Himanshu et al., 2020)、これらの行動試験とは別のドメインの不安行動試験である社会的相互作用試験 (social interaction test) では、マウスとラットの両方において心理社会的ストレス負荷による不安様行動の増加が報告されている (Toth and Neumann, 2013; Vidal et al., 2011)。そのため、今後は利き手と心理社会的ストレスによる不安症状の関係を詳細に調べるために、マウスを用いた検証や社会的相互作用試験を行う必要があるだろう。

次に、FST における immobility 回数は利き手に関係なく Control 群に比べて Stress 群で高かった。また、climbing および swimming 回数は利き手に関係なく Control 群に比べて Stress 群で低かった。CFT における Freezing 時間の割合は、利き手に関係なく Control 群に比べて Stress 群で高かった。FST は水中での無動行動 (immobility) を行動学的絶望とみなすことで、うつ様行動を評価する行動試験である (Porsolt et al., 1977, 1978)。CFT はフットショックなどの嫌悪刺激と無害な前刺激 (音や光) または文脈 (嫌悪刺激を受ける装置に入れる) との関連付けを行った後、再度無害な刺激や文脈に曝露した時に起こるすくみ行動 (Freezing) の長さを恐怖行動の尺度として評価する行動試験である (Campos et al., 2013)。また、R/I 系を用いた心理社会的ストレス負荷を行った動物では、FST および CFT において、それぞれうつ様および恐怖行動が増加することが報告されており (Becker et al., 2008; Harada et al., 2021 [Psychiatry Investigation 投稿中]; Yu et al., 2011)、本研究結果と一致している。そのため本研究結果は、利き手に関係なく心理社会的ストレスによってうつ・恐怖症状が出現したことを示している。以上のことから、心理社会的ストレスにより出現するうつ病関連症状である精神症状は、いずれの利き手においても同一の症状を呈するが、身体症状については利き手によって一部異なることが示された。

本研究では、心理社会的ストレス負荷がうつ病関連症状と関連している海馬 (左脳および右脳) における BDNF シグナル活性に与える影響が利き手によって異なるかどうかについて検証した。利き手による変化が認められたパラメータとして、背側海馬における BDNF タンパク発現量は、左利きラットでは Control 群に比べて Stress 群で高く、右利きラットでは Control 群に比べて Stress 群で低かった。また、腹側海馬において、右利きラットでのみ BDNF および p-TrkB タンパク発現量、*Bdnf* mRNA 発現量が Control 群に比べて Stress 群で低かつ



た。また、これらの変化は全て海馬の左右半球による違いは認められなかった。前章でも述べた通り、BDNFは海馬に多く発現しており、その受容体である TrkB に結合してリン酸化を引き起こす。そして、その標的タンパクである CREB のリン酸化を介して、最終的に *Bdnf* mRNA の転写を促進することで BDNF シグナル伝達が行われる (Conti et al., 2002; Nibuya et al., 1996; Tao et al., 1998)。BDNF シグナルの活性化は海馬の神経成長やシナプス可塑性を亢進するため、海馬の機能維持に深く関わっている (Castrén and Monteggia et al., 2021; Finkbeiner et al., 1997; von Bohlen Und Halbach and von Bohlen Und Halbach, 2018)。また、海馬は背側領域と腹側領域でその機能が異なることが知られている。背側海馬は空間記憶や学習などの認知機能に関与しており、腹側海馬は感情や HPA 系などのストレス反応を制御している (Fanselow and Dong, 2010; Gulyaeva, 2019; Moser and Moser, 1998; Sahay and Hen, 2007)。そのため、うつ病などの精神疾患の発症には、感情制御に重要な腹側海馬の機能障害が強く関与している (Tanti and Belzung, 2013)。慢性ストレス負荷によりうつ、不安および恐怖行動が増加した動物では、海馬における BDNF シグナル活性が低下しており (Chang et al., 2021; Garabadu et al., 2019; Jiang et al., 2019; Ji et al., 2021; Shafia et al., 2017)、これらの動物に対する抗うつ薬の慢性投与や BDNF の海馬内投与は、腹側海馬 BDNF シグナル活性を正常化させることで、うつ病関連症状を改善することが示されている (Diniz et al., 2021; Shirayama et al., 2002; Yamada and Jinno, 2019)。これらのことから、本研究結果のうち右利きラットについては、心理社会的ストレスにより腹側海馬における BDNF シグナル活性が低下し、この腹側海馬 BDNF シグナル活性低下がうつ病関連症状の出現に寄与した可能性が考えられる。その一方で、左利きラットでは、腹側海馬 BDNF シグナル活性が変化していなかったにも関わらず、うつ病関連症状が出現していた。慢性ストレスが海馬機能に与える影響を利き手で分けて調べた研究は限られているが、慢性ストレス負荷が HPA 系および左脳と右脳の海馬グルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor: GR)発現量に与える影響を利き手で分けて調べた研究が 1 報のみ存在する。捕食者であるネコの匂いを慢性曝露したマウスでは、利き手に関係なく HPA 系の最終産物である CORT の血中濃度を増加させるが、その増加レベル (HPA 系のストレス反応性)は右利きマウスに比べて左利きで低いことが示されている。また、CORT 受容体である GR の海馬内発現量の変化については、ネコの匂いの慢性曝露により利き手に関係なく海馬 GR 発現量が減少するが、その減少レベルは右利きマウスに比べて左利きで大きく、かつ、どちらの利き手においてもストレス負荷による海馬 GR 発現量は両側とも同レベルまで減少する (海馬の左右差なし)ことが示されている (Yang et al., 2018)。GR は海馬に豊富に存在しており、かつ海馬の HPA 系に対するネガティブフィードバック制御は GR 活性化を介して行われるため (de Kloet et al., 2007; Nestler et al., 2002)、心理社会的ストレス負荷による海馬 GR 数の減少はうつ病形成に寄与している (Wang et al., 2019)。そのため Yang ら (2018)の報告は、慢性ストレスが海馬のうつ病関連因子に与える影響が利き手依存的に異なることを示唆している。本研究の評価対象である海馬 BDNF シグナル活性もうつ病の病態メカニズムに強く関連する因子であるため、心理社会的ストレスの慢性



負荷による海馬 BDNF シグナル活性変化が利き手依存的に異なる変化を示した点、かつ、その変化に海馬の左右差が認められなかった、という点で過去の研究結果と一致していると言えるだろう。

次に、本研究の左利きラットにおいて、心理社会的ストレスの慢性負荷条件下でも海馬 BDNF シグナル活性の変化が見られなかった点に関して考察する。上述のとおり Yang ら (2018)は、ストレスに対する HPA 系の反応性が右利きに比べて左利きで低いことを報告しており、同様の結果が他の研究でも示されている。感染ストレス誘発物質である Lipopolysaccharide (LPS)投与を行ったマウスでは、CORT 分泌促進因子である副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH)の血漿中濃度の増加反応が右利きマウスでのみ引き起こされ、左利きマウスは無反応であることが報告されている (Neveu and Moya, 1997)。ストレス応答システムである HPA 系は、生体をストレス環境に順応させる役割を担っているので、長期の HPA 系の活動異常はうつ病形成に強く関連している (Mori et al., 2021 [Neuropsychopharmacology reports 投稿中]; Nestler et al., 2002)。臨床においても、うつ病患者では HPA 系が過活動または低活動を示すといった HPA 系活動異常が確認されている (Ceruso et al., 2020; Maripuu et al., 2014; Steckler et al., 1999)。また、グルココルチコイドや GR 刺激薬などの投与により海馬 GR を活性化させると、BDNF 発現量が減少することが示されている (Chen et al., 2017)。本研究では血中 CORT 濃度や海馬 GR 発現量を評価していないため推測の域を出ないが、Yang ら (2018)の研究結果と同様に、心理社会的ストレスを慢性負荷した左利きラットが HPA 系低活動を示すうつ病フェノタイプであったと仮定すると、左利きラットでは海馬 GR 活性が低下していたため、BDNF シグナル活性の低下がみられなかった可能性が考えられる。この可能性を検証するために、今後は海馬 GR 発現量、血中 CORT および ACTH 濃度を測定することで、利き手と心理社会的ストレスの慢性負荷による海馬 HPA 系制御機能変化の関係性についてさらなる検証を行う必要がある。

本研究の限界 (limitation)として、うつ病の病態に関わる脳領域として海馬 BDNF シグナル活性しか評価してないことが挙げられる。海馬と同様に、うつ病の病態メカニズムに関わる脳領域の一つとして側坐核も注目されている。側坐核はドパミン神経回路を構成している主要な脳領域であり、モチベーションや報酬反応に関わっている (Dubol et al., 2018)。そして、心理社会的ストレスによる側坐核 BDNF シグナルの活性亢進がうつ病発症に関与することが報告されている (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007)。過去の研究によると、利き手は海馬だけでなく側坐核の機能差とも関連しており、右利きマウスに比べて左利きマウスの側坐核ではドパミンの発現量および利用率が高いことが示されており (Budilin et al., 2007; Nielsen et al., 1997)、左利きのヒトは右利きに比べて異常な報酬反応によって引き起こされる依存症のリスクが高いことも明らかになっている (Bouna-Pyrrou et al., 2015; Denny, 2011; Preti et al., 2012)。利き手とうつ病の病態メカニズムを解明していくために、今後は利き手と側坐核 BDNF シグナル活性変化の関係性についても検証する必要がある。

結論として、本研究結果から心理社会的ストレスによって出現する一部のうつ病関連症

状や腹側海馬 BDNF シグナル活性変化が、利き手で異なることが示された。このことは、利き手によって海馬におけるストレス反応が異なること、またその違いがあるためにうつ病の異なる病態が形成されることを示唆している。ストレス反応性には個体差があり、うつ病の病態メカニズム解明を目的とした研究では統一した見解が得られていないことが多い。そのため本研究結果は、うつ病の病態メカニズムにおけるストレス反応性の個体差を解明する上で、利き手が有用な指標となる可能性を示している。

#### 参考文献

- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013.
- Becker C, Zeau B, Rivat C, Blugeot A, Hamon M, Benoliel JJ. Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. *Mol Psychiatry*, 13:1079-1092, 2008. [PMID: 17893702]
- Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med*, 358:55-68, 2008. [PMID: 18172175]
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311:864-868, 2006. [PMID: 16469931]
- Björkqvist K. Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav*, 73:435-442, 2001. [PMID: 11438372]
- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R, Meaney MJ. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 95:298-302, 1988. [PMID: 3137614]
- Bouna-Pyrrou P, Mühle C, Kornhuber J, Lenz B. Internet gaming disorder, social network disorder and laterality: handedness relates to pathological use of social networks. *J Neural Transm (Vienna)*, 122:1187-1196, 2015. [PMID: 25576300]
- Budilin Slu, Midzianovskaia IS, Shchegolevskii NV, Ioffe ME, Bazian AS. Asymmetry in the dopamine content in the nucleus accumbens and the motor preference in rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 57:598-603, 2007. [PMID: 18064898]
- Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry*, 2:S101-11, 2013. [PMID: 24271222]
- Castrén E, Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biol Psychiatry*, 90:128-136, 2021. [PMID: 34053675]
- Ceruso A, Martínez-Cengotitabengoa M, Peters-Corbett A, Diaz-Gutierrez MJ, Martínez-Cengotitabengoa M. Alterations of the HPA Axis Observed in Patients with Major Depressive Disorder and Their Relation to Early Life Stress: A Systematic Review. *Neuropsychobiology*, 79:417-427, 2020. [PMID: 32203965]
- Chang SH, Yu YH, He A, Ou CY, Shyu BC, Huang ACW. BDNF Protein and BDNF mRNA Expression of the Medial Prefrontal Cortex, Amygdala, and Hippocampus during Situational Reminder in the PTSD Animal Model. *Behav Neurol*, 2021:6657716, 2021. [PMID: 33763156]
- Charlson FJ, Moran AE, Freedman G, Norman RE, Stapelberg NJ, Baxter AJ, Vos T, Whiteford HA. The contribution of major depression to the global burden of ischemic heart disease: a comparative

- risk assessment. *BMC Med.*, 11:250, 2013. [PMID: 24274053]
- Chen H, Lombès M, Le Menuet D. Glucocorticoid receptor represses brain-derived neurotrophic factor expression in neuron-like cells. *Mol Brain.*, 10:12, 2017. [PMID: 28403881]
- Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci.*, 22:3262-3268, 2002. [PMID: 11943827]
- de Kloet ER, Derijk RH, Meijer OC. Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.*, 3:168-179, 2007. [PMID: 17237843]
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.*, 22:422-426, 1999. [PMID: 10481183]
- Denny K. Handedness and depression: evidence from a large population survey. *Laterality*, 14:246-255, 2009. [PMID: 19012075]
- Denny K. Handedness and drinking behaviour. *Br J Health Psychol.*, 16:386-95, 2011. [PMID: 21489064]
- Diniz CRAF, da Silva LA, Domingos LB, Sonogo AB, Moraes LRB, Joca S. Fluoxetine acts concomitantly on dorsal and ventral hippocampus to Trk-dependently modulate the extinction of fear memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 113:110451, 2021. [PMID: 34619303]
- Dubol M, Trichard C, Leroy C, Sandu AL, Rahim M, Granger B, Tzavara ET, Karila L, Martinot JL, Artiges E. Dopamine Transporter and Reward Anticipation in a Dimensional Perspective: A Multimodal Brain Imaging Study. *Neuropsychopharmacology*, 43:820-827, 2018. [PMID: 28829051]
- Ecevitoglu A, Soyman E, Canbeyli R, Unal G. Paw preference is associated with behavioural despair and spatial reference memory in male rats. *Behav Processes.*, 180:104254, 2020. [PMID: 32961284]
- Elias LJ, Saucier DM, Guylee MJ. Handedness and depression in university students: a sex by handedness interaction. *Brain Cogn.*, 46:125-129, 2001. [PMID: 11527310]
- Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 26:37-49, 2001. [PMID: 11070333]
- Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65:7-19, 2010. [PMID: 20152109]
- Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19:1031-1047, 1997. [PMID: 9390517]
- Franklin TB, Saab BJ, Mansuy IM. Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, 75:747-761, 2012. [PMID: 22958817]
- Fuster V, Vedanthan R. Cardiovascular disease and the UN Millennium Development Goals: time to

- move forward. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*, 5:593, 2008. [PMID: 18813335]
- Garabadu D, Srivastava N, Murti Y. Calotropis procera attenuates chronic unpredictable mild stress-induced depression in experimental animals. *Metab Brain Dis.*, 34:1635-1647, 2019. [PMID: 31346860]
- Griebel G, Holmes A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 12:667-687, 2013. [PMID: 23989795]
- Gulyaeva NV. Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. *Neurochem Res.*, 44:1306-1322, 2019. [PMID: 30357653]
- Hao Y, Ge H, Sun M, Gao Y. Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. *Int J Mol Sci.*, 20:4827, 2019. [PMID: 31569393]
- Hayashida S, Oka T, Mera T, Tsuji S. Repeated social defeat stress induces chronic hyperthermia in rats. *Physiol Behav.*, 101:124-131, 2010. [PMID: 20438740]
- Himanshu; Dharmila, Sarkar D; Nutan. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. *Clin Psychopharmacol Neurosci.*, 18:341-351, 2020. [PMID: 32702213]
- Iio W, Takagi H, Ogawa Y, Tsukahara T, Chohnan S, Toyoda A. Effects of chronic social defeat stress on peripheral leptin and its hypothalamic actions. *BMC Neurosci.*, 15:72, 2014. [PMID: 24906408]
- Ji CH, Gu JH, Liu Y, Tang WQ, Guan W, Huang J, Chen YM, Xu DW, Jiang B. Hippocampal MSK1 regulates the behavioral and biological responses of mice to chronic social defeat stress: Involving of the BDNF-CREB signaling and neurogenesis. *Biochem Pharmacol.*, 11:114836, 2021. [PMID: 34774532]
- Jiang N, Lv JW, Wang HX, Lu C, Wang Q, Xia TJ, Bao Y, Li SS, Liu XM. Dammarane sapogenins alleviates depression-like behaviours induced by chronic social defeat stress in mice through the promotion of the BDNF signalling pathway and neurogenesis in the hippocampus. *Brain Res Bull.*, 153:239-249, 2019. [PMID: 31542427]
- Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol.*, 48:191-214, 1997. [PMID: 9046559]
- Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA, Avitsur R. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. *Brain Behav Immun.*, 21:458-466, 2007. [PMID: 17178210]
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131:391-404, 2007. [PMID: 17956738]

- Liao J, Zeng G, Fang W, Huang W, Dai X, Ye Q, Zhang J, Chen X. Increased Notch2/NF- $\kappa$ B Signaling May Mediate the Depression Susceptibility: Evidence from Chronic Social Defeat Stress Mice and WKY Rats. *Physiol Behav.*, 228:113197, 2021. [PMID: 33017602]
- Logue DD, Logue RT, Kaufmann WE, Belcher HM. Psychiatric disorders and left-handedness in children living in an urban environment. *Laterality*, 20:249-256, 2015. [PMID: 25280263]
- Maripuu M, Wikgren M, Karling P, Adolfsson R, Norrback KF. Relative hypo- and hypercortisolism are both associated with depression and lower quality of life in bipolar disorder: a cross-sectional study. *PLoS One*, 9:e98682, 2014. [PMID: 24932586]
- McCormick CM, Smith C, Mathews IZ. Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behav Brain Res.*, 187:228-238, 2008. [PMID: 17945360]
- McIlwrick S, Pohl T, Chen A, Touma C. Late-Onset Cognitive Impairments after Early-Life Stress Are Shaped by Inherited Differences in Stress Reactivity. *Front Cell Neurosci.*, 11:9, 2017. [PMID: 28261058]
- Morais-Silva G, Costa-Ferreira W, Gomes-de-Souza L, Pavan JC, Crestani CC, Marin MT. Cardiovascular outcomes related to social defeat stress: New insights from resilient and susceptible rats. *Neurobiol Stress.*, 11:100181, 2019. [PMID: 31236438]
- Mori M, Murata Y, Tsuchihashi M, Hanakita N, Terasaki F, Harada H, Kawanabe S, Terada K, Matsumoto T, Ohe K, Mine K, Enjoji M. Continuous psychosocial stress stimulates BMP signaling in dorsal hippocampus concomitant with anxiety-like behavior associated with differential modulation of cell proliferation and neurogenesis. *Behav Brain Res.*, 392:112711, 2020. [PMID: 32461130]
- Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8:608-619, 1998. [PMID: 9882018]
- Muscat R, Willner P. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neurosci Biobehav Rev.*, 16:507-517, 1992. [PMID: 1480347]
- Nemeroff CB, Goldschmidt-Clermont PJ. Heartache and heartbreak--the link between depression and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.*, 9:526-539, 2012. [PMID: 22733213]
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34:13-25, 2002. [PMID: 11931738]
- Neveu PJ, Moya S. In the mouse, the corticoid stress response depends on lateralization. *Brain Res.*, 749:344-346, 1997. [PMID: 9138736]
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci.*, 16:2365-2372, 1996. [PMID: 8601816]
- Nielsen DM, Visker KE, Cunningham MJ, Keller RW Jr, Glick SD, Carlson JN. Paw preference,

- rotation, and dopamine function in Collins HI and LO mouse strains. *Physiol Behav.*, 61:525-535, 1997. [PMID: 9108571]
- Olbert CM, Gala GJ, Tupler LA. Quantifying heterogeneity attributable to polythetic diagnostic criteria: theoretical framework and empirical application. *J Abnorm Psychol.*, 123:452-462, 2014. [PMID: 24886017]
- Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res.*, 1539:73-86, 2013. [PMID: 24096214]
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.*, 47:379-391, 1978. [PMID: 204499]
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 229:327-336, 1977. [PMID: 596982]
- Preti A, Usai I, Pintus E, Sardu C, Petretto DR, Masala C. Left-handedness is statistically linked to lifetime experimentation with illicit drugs. *Laterality*, 17:318-339, 2012. [PMID: 22594814]
- Rygula R, Abumaria N, Havemann-Reinecke U, Rütther E, Hiemke C, Zernig G, Fuchs E, Flügge G. Pharmacological validation of a chronic social stress model of depression in rats: effects of reboxetine, haloperidol and diazepam. *Behav Pharmacol.*, 19:183-196, 2008. [PMID: 18469536]
- Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci.*, 10:1110-1115, 2007. [PMID: 17726477]
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.*, 21:55-89, 2000. [PMID: 10696570]
- Shafia S, Vafaei AA, Samaei SA, Bandegi AR, Rafiei A, Valadan R, Hosseini-Khah Z, Mohammadkhani R, Rashidy-Pour A. Effects of moderate treadmill exercise and fluoxetine on behavioural and cognitive deficits, hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction and alternations in hippocampal BDNF and mRNA expression of apoptosis - related proteins in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Neurobiol Learn Mem.*, 139:165-178, 2017. [PMID: 28137660]
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci.*, 22:3251-3261, 2002. [PMID: 11943826]
- Soyman E, Tunckol E, Lacin E, Canbeyli R. Right-but not left-paw use in female rats provides advantage in forced swim tests. *Behav Brain Res.*, 293:162-165, 2015. [PMID: 26213334]
- Steckler T, Holsboer F, Reul JM. Glucocorticoids and depression. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 13:597-614, 1999. [PMID: 10903817]
- Tanti A, Belzung C. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neuroscience*, 252:234-252, 2013. [PMID: 23425223]

23973415]

- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, 20:709-726, 1998. [PMID: 9581763]
- Toth I, Neumann ID. Animal models of social avoidance and social fear. *Cell Tissue Res.*, 354:107-118, 2013. [PMID: 23760888]
- Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Delagrangre P, Tordera RM. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology (Berl.)*, 224:313-325, 2012. [PMID: 22707231]
- Vidal J, Buwalda B, Koolhaas JM. Male Wistar rats are more susceptible to lasting social anxiety than Wild-type Groningen rats following social defeat stress during adolescence. *Behav Processes.*, 88:76-80, 2011. [PMID: 21854839]
- von Bohlen Und Halbach O, von Bohlen Und Halbach V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell Tissue Res.*, 373:729-741, 2018. [PMID: 29450725]
- Wang W, Liu L, Yang X, Gao H, Tang QK, Yin LY, Yin XY, Hao JR, Geng DQ, Gao C. Ketamine improved depressive-like behaviors via hippocampal glucocorticoid receptor in chronic stress induced- susceptible mice. *Behav Brain Res.*, 364:75-84, 2019. [PMID: 30753876]
- World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 2017.
- Yamada J, Jinno S. Potential link between antidepressant-like effects of ketamine and promotion of adult neurogenesis in the ventral hippocampus of mice. *Neuropharmacology*, 158:107710, 2019. [PMID: 31310776]
- Yang J, Zhang L, Dai JP, Zeng J, Chen XX, Xie ZF, Li KS, Su Y. Differential responses of stressful elements to predatory exposure in behavior-lateralized mice. *Behav Brain Funct.*, 14:12, 2018. [PMID: 29884193]
- Yang LN, Pu JC, Liu LX, Wang GW, Zhou XY, Zhang YQ, Liu YY, Xie P. Integrated Metabolomics and Proteomics Analysis Revealed Second Messenger System Disturbance in Hippocampus of Chronic Social Defeat Stress Rat. *Front Neurosci.*, 13:247, 2019. [PMID: 30983951]
- Yu T, Guo M, Garza J, Rendon S, Sun XL, Zhang W, Lu XY. Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 14:303-317, 2011. [PMID: 20735879]

**Supplementary Information: 実験の部**



## Supplement 1. ウェスタンブロットに用いた試薬類及び機器類

本研究で用いた試薬類を Table S1 に、機器類を Table S2 に示す。

Table S1 使用した試薬類、カタログ No.および業者の詳細

試薬名	カタログ No.	業者
RIPA Buffer (10×)	9806	CST
PMSF	8553	CST
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (100×)	5872	CST
Pierce BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific
2×Laemmli Sample Buffer	1610737	Bio-Rad
2- mercaptoethanol	1610710	Bio-Rad
DTT (Dithiothreitol)	7016	CST
Blue Loading Buffer Pack	7722	CST
トリス (ヒドロキシメチル)アミノメタン	207-66275	WAKO
グリシン	17109-35	ナカライテスク
ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)	31606-75	ナカライテスク
メタノール特級	25183-80	関東化学
アルブミン, ウシ血清由来, フラクション V, pH 7.0	015-27053	WAKO
Non fat dry milk	9999	CST
塩化ナトリウム	31319-45	ナカライテスク
TWEEN 20	P9416	SIGMA
TBST-10×	9997	CST
4-20% Mni-PROTEAN®TGX™ Precast Gel	4561096	Bio-Rad
Prestained XL-ladder Broad range	SP-2120	Aproscience
Immun-Blot® PVDF メンブレン	1620177	Bio-Rad
Mni-PROTEAN® Filter Paper	1703932	Bio-Rad
ハイブリバッグ・ハード	S-1001	SE
SignalFire ECL Reagent	6883	CST
SignalFire Plus ECL Reagent	12630	CST
SignalFire Elite ECL Reagent	12757	CST
Restore Western Blot Stripping Buffer	21059	Thermo Fisher Scientific

※一次抗体および二次抗体については、別記とする

Table S2 使用した機器類、型番および業者の詳細

機器名	型番	業者
マイクロ冷却遠心機	KUBOTA 3740	久保田商事
テーブルトップマイクロ冷却遠心機	KUBOTA 3500	久保田商事
微量超音波ホモジナイザー	Q125	QSONICA
ドライバスインキュベーター	K30	ALLSHENG
電気泳動および転写装置	Mini-PROTEAN <sup>®</sup> Tetra Cell System	Bio-Rad
シェーカー	NA-M201、NA-M101	日伸理化
化学発光撮影装置	MultiImager II MultiBOX	BioTools
ホットシーラー	NL-201JC-3	西崎電機製作所

## Supplement 2. 泳動用サンプル調製

第1章および第2章における泳動用サンプル調製のプロトコールを以下に示す。

### [Supplement 2-1-1. total protein 抽出と濃度測定 (第1章)]

組織片からの total protein 抽出と濃度測定は以下の要領で実施した。

- ①組織片 100 mg あたりに 1,000  $\mu$ L の 1×RIPA buffer (1mM PMSF 含有)を加え、氷冷しながら超音波ホモジナイザー (強度 30%、on/off: 5/10 sec、計 15 sec)で十分に homogenize した。
- ②4°C、14,000 rpm で 30 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。
- ③別のチューブで組織 homogenate を 1×RIPA buffer で 40 倍に希釈し、メーカーの推奨するプロトコールに従い、Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit を用いて total protein 濃度を測定した。

### [Supplement 2-1-2. 電気泳動用サンプル調製 (第1章)]

組織 homogenate の電気泳動用サンプル調製は以下の要領で実施した。

- ①測定した total protein 濃度を基に、各サンプルの total protein 濃度が一律の同じ値になるよう 1×RIPA buffer (1mM PMSF 含有)で希釈した。
- ②2×Laemmli Sample Buffer (5% 2-mercaptoethanol 含有)を①の溶液量と等量加え、ピペッティングにより混和した。
- ③spin down 後、室温で 30 分間静置した。
- ④全てのステップを終えたサンプルは−80°Cで保存した。

### [Supplement 2-2-1. total protein 抽出と濃度測定 (第2章)]

組織片からの total protein 抽出と濃度測定は以下の要領で実施した。

- ①組織片 100 mg あたりに 1,000  $\mu$ L の 1×RIPA buffer (100×Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail 含有)を加え、氷冷しながら超音波ホモジナイザー (強度 30%、on/off: 5/10 sec、計 15 sec)で十分に homogenize した。
- ②4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。
- ③別のチューブで組織 homogenate を 1×RIPA buffer で 20 倍に希釈し、メーカーの推奨するプロトコールに従い、Pierce™ BCA Protein Assay Kit を用いて total protein 濃度を測定した。

#### [Supplement 2-2-2. 電気泳動用サンプル調製 (第 2 章)]

組織 homogenate の電気泳動用サンプル調製は以下の要領で実施した。

- ①測定した total protein 濃度を基に、各サンプルの total protein 濃度が一律の同じ値になるよう 1×RIPA buffer (100×Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail 含有)で希釈した。
- ②Blue Loading Buffer (1.25 M Dithiothreitol 含有)を①の溶液量の 3 分の 1 量加え、ピペッティングにより混和した。
- ③95°Cに加熱したドライバスインキュベーターで、サンプルを 5 分間ボイルした。
- ④全てのステップを終えたサンプルは spin down 後、-4°Cで保存した。

### Supplement 3. SDS-PAGE と転写

[Supplement 3-1. 泳動用および転写用バッファの組成]

以下のバッファ類は実験当日に用時調製した。

1) 泳動用トリス/グリシン/SDS バッファ

トリス            3.03 g

グリシン        14.4 g

) SDS            1.0 g

上記 3 試薬を ddw で 1,000mL にメスアップし、作製した。

2) 転写用トリス/グリシン/メタノールバッファ

トリス            3.0 g

グリシン        14.4 g

) メタノール    100 mL

上記 3 試薬を混和し、ddw で 1,000mL にメスアップした後、使用まで冷蔵保存した。

[Supplement 3-2. 泳動および転写プロトコール]

sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)は、Mini-PROTEAN® Tetra Cell System および 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel を用いて行った。1 レーンあたり 20 µg のタンパク質をゲルにアプライし、サンプルがゲルの下端に到達するまで電圧 100V で通電した。

泳動後のゲルを転写用バッファで 15 分間インキュベートする間に、PVDF メンブレンの親水化を行った。具体的には、メタノール 30 sec → ddw 60 sec → 転写バッファ 5 min の順にメンブレンを浸漬した。その後、ゲル内で分離したタンパク質をウェット式ブロッキング装置 Mini Trans-Blot® Transfer Cell (1703930, Bio-Rad)を用いて、電圧 70V、通電 150 min の条件で、polyvinyl difluoride (PVDF)メンブレン (1620177, Bio-Rad)に転写した。

**Supplement 4. ブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応および化学発光検出**

[Supplement 4-1. 共通で用いる試薬の組成]

1) TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20: wash buffer として使用)

[10×TBS]

トリス 24.2 g

) 塩化ナトリウム 80.0 g

上記 2 試薬を適当量の ddw に溶解し、6N 塩酸で pH 7.6 に調整した後、ddw で 1,000mL にメスアップし、作製した (常温保存)。

wash buffer としての 1×TBST は、1×TBS 1,000 mL に対し、Tween 20 を 1.0 mL 加えて混和して作製し、冷蔵保存した。

2) 5% BSA/TBST (抗体希釈液として使用)

Ready to use の 1×TBST 100 mL に BSA 5.0 g を十分に溶解させ、冷蔵保存した。

3) 5% non-fat dry milk/TBST (ブロッキング溶液および抗体希釈液として使用)

Ready to use の 1×TBST 100 mL に non-fat dry milk 5.0 g を十分に溶解させ、冷蔵保存した。

[Supplement 4-2. ブロッキング以降のプロトコール]

転写終了からの工程は以下の要領で行った。

- ①メンブレンを室温下、wash buffer で 5 min×3 回 wash した。
- ②メンブレンを室温下、5% non-fat dry milk/TBST に浸漬し、1 時間 shake した。
- ③メンブレンを室温下、wash buffer で 5 min×3 回 wash した。
- ④メンブレンをハイブリバッグに入れ、分子量マーカーを目安に、特定の位置で水平にカットした。
- ⑤カットしたメンブレンをそれぞれ異なる一次抗体溶液に浸漬し、4℃で一晩 shake した。
- ⑥翌日、各メンブレンを室温下、wash buffer で 5 min×4 回 wash した。
- ⑦各メンブレンを適切な二次抗体溶液に浸漬し、室温下で 1 時間 shake した。
- ⑧各メンブレンを室温下 wash buffer で 5 min×4 回 wash した。
- ⑨化学発光検出試薬 SignalFire ECL Reagent または SignalFire plus ECL Reagent をプロトコール通りに調製し、メンブレンを 1 分間反応させた後、MultiImager II MultiBOX を用いて抗原の検出を行った。

[Supplement 4-3. ストリッピング&リプローブのプロトコール]

発色終了からの工程は以下の要領で行った。

- ①発色に使用したメンブレンを室温下、wash buffer で 5 min×3 回 wash した。
- ②メンブレンを室温下、Stripping Buffer に浸漬し、30 分間 shake した。
- ③Supplement 4-2. の①以降の手順で行った。

各抗体に関する詳細を Table S3 に、バンドパターンと検出目的のタンパク質の局在を

Fig.S1、 Fig. S2 および Fig. S3 に示す。

Table S3 ウェスタンブロットで用いた抗体に関する詳細

(A) 一次抗体

antigen	host	mono/poly	dilution	Catalog No.	maker
BDNF	rabbit	monoclonal	1 : 1000	ab108319	abcam
p-TrkB	rabbit	polyclonal	1 : 1000	11328	Signalway Antibody
TrkB	rabbit	monoclonal	1 : 1000	4603	CST
p-CREB	rabbit	monoclonal	1 : 1000	9198	CST
CREB	rabbit	monoclonal	1 : 1000	9197	CST
GAPDH	rabbit	monoclonal	1 : 10000	5174	CST

(B) 二次抗体

antigen	Label	dilution	Catalog No.	maker
rabbit IgG	Horseradish peroxidase (HRP)	1 : 5000	7074	CST

Supplement 5. バンド発色強度の解析

検出されたバンドの発光強度は、フリーソフトウェアの ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>, NIH)を用いて定量し、その値を loading control である GAPDH の値で補正した。そして各サンプルのデータは、右利き群、または左利き control 群における左海馬の発色強度補正值の平均値が 1 となるような相対値として算出した。

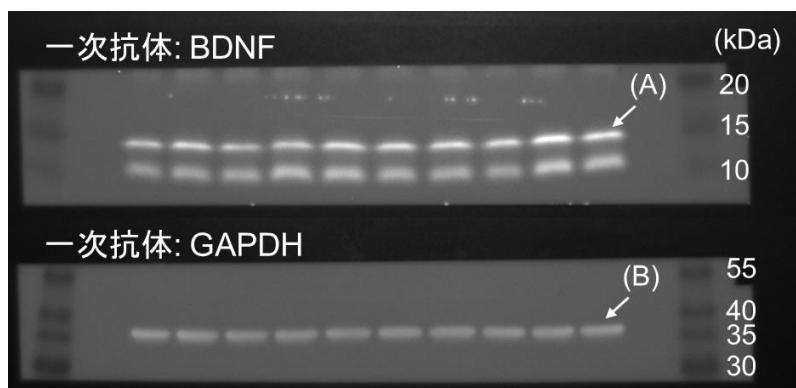


Fig.S1 BDNF 抗体および GAPDH 抗体によるウエスタンブロットの発色例  
(サンプル: 腹側海馬) 15 kDa 付近, BDNF (A)、37 kDa 付近, GAPDH (B)

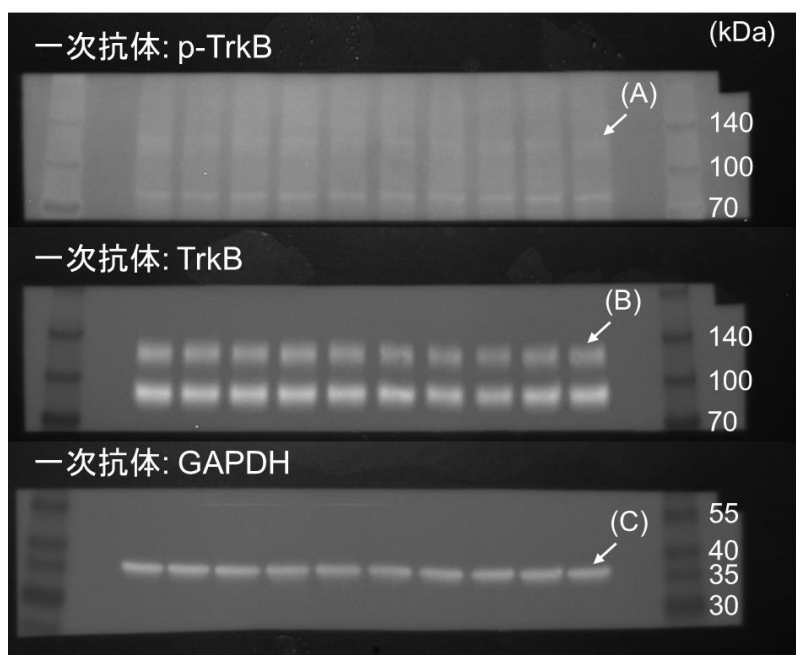


Fig. S2 p-TrkB 抗体、TrkB 抗体および GAPDH 抗体によるウエスタンブロットの発色例  
(サンプル: 腹側海馬) 140 kDa 付近, p-TrkB (A), TrkB (B)、37 kDa 付近, GAPDH (C)

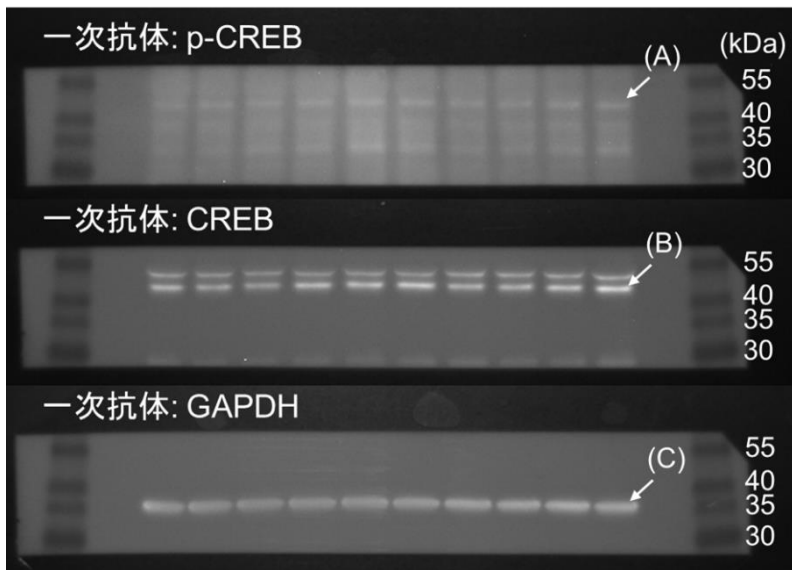


Fig. S3 p-CREB 抗体、CREB 抗体および GAPDH 抗体によるウエスタンブロットの発色例  
(サンプル: 腹側海馬) 43 kDa 付近, p-CREB (A), CREB (B)、37 kDa 付近, GAPDH (C)



## Supplement 6. RNA 解析に用いた試薬類及び機器類

本研究で用いた試薬類を Table S4 に、機器類を Table S5 に示す。

Table S4 使用した試薬類、カタログ No.および業者の詳細

(用途：①RNA 抽出用、②逆転写反应用、③定量 PCR 用、④アガロースゲル作製用)

用途	試薬名	カタログ No.	業者
①	ISOGEN II	311-07361	ニッポンジーン
	SV Total RNA Isolation System	FARBC-C50	FAVORGEN
	Nuclease-free water (not DEPC-Treated)	AM9938	Ambion
	RNA Ladder (0.125-6.0 kb)	317-06263	ニッポンジーン
②	ReverTra Ace® qPCR Master Mix with gDNA remover	FSQ-301	東洋紡ライフサイエンス
	2×Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix with Low Rox	600892	Agilent Technologies
③	カスタムオリゴ DNA		ユーロフィン ジェノミクス
	TE 緩衝液 (pH 8.0)	06890-54	ナカライテスク
④	3-(N-モノホリノ)プロパンスルホン酸 [MOPS]	23425-54	ナカライテスク
	酢酸ナトリウム三水和物	31115-05	ナカライテスク
	0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH 8.0)	14347-21	ナカライテスク
	Agarose S	312-01193	ニッポンジーン
	トリス (ヒドロキシメチル)アミノメタン ほう酸	35406-75	ナカライテスク
	3NA (EDTA・3Na)	05215-05	ナカライテスク
	ホルムアミド	340-01871	同仁化学
	37%ホルムアルデヒド液	16229-82	ナカライテスク
	ブロモフェノールブルー	16223-55	ナカライテスク
	キシレンシアノール FF	05808-61	ナカライテスク
	キシレンシアノール FF	04565-71	ナカライテスク
	グリセリン	27210-1230	純正化学
	臭化エチジウム溶液 (2 mg/mL)	14575-43	関東化学
	Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution	21141	iNtRON Biotechnology

Table S5 使用した機器類、型番および業者の詳細

機器名	型番	業者
マイクロ冷却遠心機	KUBOTA 3740	久保田商事
テーブルトップマイクロ冷却遠心機	KUBOTA 3500	久保田商事
NanoDropLite 分光光度計		ThermoFisher SCIENTIFIC
電気泳動槽	Mupid <sup>®</sup> -2plus	ADVANCE
サーマルサイクラー	PC818	ASTEC
リアルタイム PCR システム	AriaMx	Agilent Technologies
UV トランスイルミネーター	UVT-2126	ASTEC
デジプリント・ミニカメラセット	DP-MCCDz	バイオツールズ

### Supplement 7. アガロースゲル作製

後述する抽出 RNA の完全性確認用、および定量 PCR 終了後の product のバンドパターン確認用のアガロースゲル作製手順を以下に示す。

#### [Supplement 7-1. RNA 完全性確認用アガロースゲル]

##### 1) 1×MOPS buffer

MOPS	4.186 g
酢酸ナトリウム三水和物	0.6804 g

) 0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH 8.0) 20 mL

上記 3 試薬を ddw で 1000mL にメスアップし、冷蔵保存した。

##### 2) 6×Dye solution

ブロモフェノールブルー	125 mg
キシレンシアノール	125 mg

) グリセリン 15 mL

上記 3 試薬を 1×MOPS buffer で 50 mL までメスアップし、冷蔵保存した。

##### 3) 6×loading buffer

ホルムアミド	500 μL
37% ホルムアルデヒド液	100 μL
臭化エチジウム溶液 (2 mg/mL)	20 μL
6×Dye solution	200 μL
10×MOPS buffer	100 μL

) 1×MOPS buffer 80 μL

上記 6 試薬を混和し、冷蔵保存した。

4) ホルマリン変性 1%アガロースゲル作製

1×MOPS buffer	100 mL
Agarose S	1.0 g
37% ホルムアルデヒド液	1.8 mL
) <u>RedSafe®</u>	<u>5.0 μL</u>

1×MOPS buffer に Agarose S を添加し、電子レンジで加熱溶解した。室温である程度冷却した後、37% ホルムアルデヒド液と RedSafe®を混和し、ゲルトレイに流し入れ、粗熱を取った後、冷蔵庫で保存した。

[Supplement 7-2. PCR product バンドパターン確認用アガロースゲル]

1) 5×TBE buffer

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	54.0 g
ほう酸	27.5 g
) <u>3NA (EDTA · 3Na)</u>	<u>3.55 g</u>

上記 3 試薬を ddw で 1,000mL にメスアップし、オートクレーブにて滅菌後、冷蔵保存した。

2) 6×Dye solution

Supplement 2-1 と同じものを用いた。

3) 1%アガロースゲル作製

1×TBE buffer	100 mL
Agarose S	1.0 g
) <u>RedSafe®</u>	<u>5.0 μL</u>

1×TBE buffer に Agarose S を添加し、電子レンジで加熱溶解した。室温である程度冷却した後、RedSafe®を混和し、ゲルトレイに流し入れ、粗熱を取った後、冷蔵庫で保存した。

## Supplement 8. total RNA 抽出

### [Supplement 8-1. total RNA 抽出と精製]

各海馬サンプルからの total RNA 抽出はメーカーの推奨するプロトコールを一部改変して行った。

- ①各海馬サンプルに対して 300  $\mu\text{L}$  の Isogen II を加えバイオマッシャー®II (300-95441, ニッピ)内で十分にホモジナイズした。
- ②120  $\mu\text{L}$  の nuclease-free water を加え、約 15 秒間、強度 10 の vortex で強く混合し、室温で 10 分程静置した。
- ③常温、15,000 $\times\text{g}$  で 15 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。
- ④上清 390 $\mu\text{L}$  に対して 99.5% エタノール 187.6  $\mu\text{L}$  を加え、穏やかに転倒混和した。
- ⑤Mixture を抽出カラム (FAVORGEN)に通し、常温、10,000 $\times\text{g}$  で 1 分間遠心した。
- ⑥Wash Solution (Promega) 650  $\mu\text{L}$  をカラムに通し、再度常温、10,000 $\times\text{g}$  で 1 分間遠心する工程を 2 回繰り返した後、さらに 15,000 $\times\text{g}$  で 1 分間遠心した。
- ⑦カラムを total RNA 溶液を保存するためのチューブにセットし、蓋を開けた状態で 30 秒ほど風乾した。
- ⑧30  $\mu\text{L}$  の Nuclease free water をカラムに通し、10,000 $\times\text{g}$  で 1 分間遠心する工程を 2 回繰り返し、total RNA 溶液を回収した。

### [Supplement 8-2. total RNA のクオリティー確認]

NanoDropLite 分光光度計 (ThermoFisher SCIENTIFIC)を用いて各溶液中の total RNA 濃度および A260/A280 比を測定した。

また、total RNA 0.5  $\mu\text{g}$  を加熱 (65 $^{\circ}\text{C}$  $\times$ 5 分)した後、急速に冷却し変性させた。その後、ホルマリン変性アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、完全性を判定した (Fig. S4)。

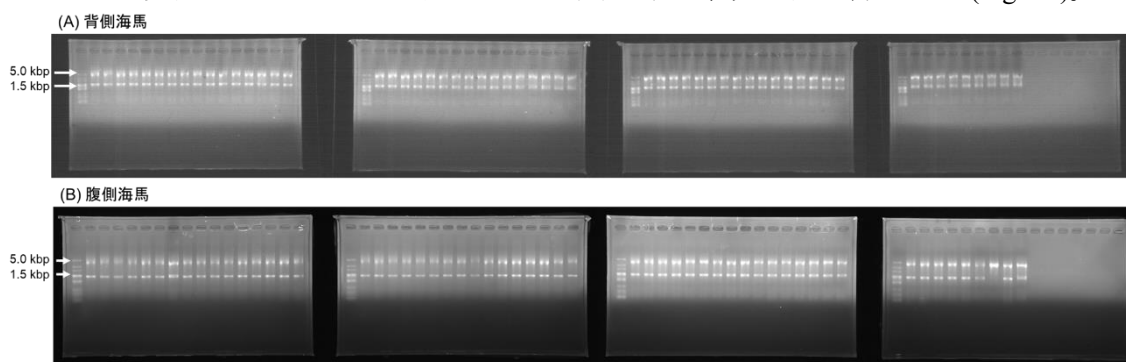


Fig. S4 RNA 泳動写真、5.0 kb と 1.5 kb の部分に 2 本のバンドが確認できる

## Supplement 9. 逆転写反応と定量 PCR

### [Supplement 9-1. 逆転写反応]

逆転写反応は ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR Master Mix with gDNA remover (東洋紡ライフサイエンス)に同梱された推奨プロトコールに従って実施した。

- ①抽出した total RNA 0.5  $\mu\text{g}$  に対し、適量の Nuclease free water をチューブに加えて 65°C×5 分で incubate し、急冷した。
- ②4×DN Master Mix と gDNA remover を 50 : 1 で混合した試薬を total RNA と補正水の混合液 3  $\mu\text{L}$  に対し 1  $\mu\text{L}$  の割合で加え、37°C×5 分で incubate した。
- ③さらに 4×DN Master Mix と gDNA remover の混合試薬と同量の 5×RT Master Mix II を加え、37°C×15 分、50°C×5 分、98°C×5 分の順で incubate し、cDNA を作製した。

### [Supplement 9-2. Real Time PCR 法による定量 PCR]

リアルタイム PCR システムを用いた定量 PCR には、2×Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix Low Rox Plus (Agilent Technologies)を用いた。ターゲット遺伝子およびリファレンス遺伝子を増幅するためのプライマーセットの詳細を Table S6 に示す。各プライマーセットは本実験で用いるサンプルと同種同系統の動物から抽出した予備実験用の組織サンプルを用いて、あらかじめ standard curve を作製し、増幅効率 (efficiency) を評価すると共に、非特異的な増幅がみられないことを確認した。

PCR チューブ 1 本あたりの反応系は以下の要領で調製した。

2×Master mix	5.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$ Primer mix	0.4 $\mu\text{L}$
Nuclease free water	2.1 $\mu\text{L}$
<u>) cDNA (2.5 倍希釈)</u>	<u>2.5 <math>\mu\text{L}</math></u>
Total	10 $\mu\text{L}$

10  $\mu\text{M}$  Primer mix は Fw-primer、Rv-primer、TE buffer を 1:1:3 の割合で混合して作製した。

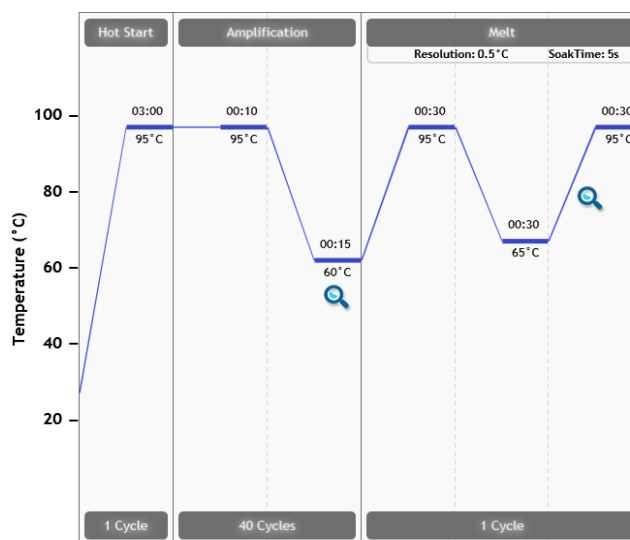


Fig. S5 定量 PCR における thermal profile

各サンプルの反応系は triplicate で準備し、Fig. S5 に示す温度条件で増幅および融解曲線作成を行った。

増幅した PCR product は、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、amplicon size が適切かどうか、また非特異的な増幅がないかを判定した。

Table S6 Primer set に関する詳細

種：ラット、系統：Wistar、性別：雄性、組織：海馬

gene	NCBI Gene ID	sequence (5'-3')	efficiency	amplicon size (bp)	reference No.
<i>Bdnf</i>	24225	Fw GTGACAGTATTAGCGAGTGG	98.22	85	[1]
		Rv TTCTCTAGGACTGTGACCGT			
<i>Actb</i>	81822	Fw GAACCCTAAGGCCAACCGTG	99.87	115	[2]
		Rv GGTACGACCAGAGGCATACAGG			

[Supplementary references list]

- [1] Reichmann F, Hassan AM, Farzi A, Jain P, Schuligoi R, Holzer P. Dextran sulfate sodium-induced colitis alters stress-associated behaviour and neuropeptide gene expression in the amygdala-hippocampus network of mice. *Sci Rep.*, 5:9970, 2015. [PMID: 26066467]
- [2] Audet MC, Jacobson-Pick S, Wann BP, Anisman H. Social defeat promotes specific cytokine variations within the prefrontal cortex upon subsequent aggressive or endotoxin challenges. *Brain Behav Immun.*, 25:1197-1205, 2011. [PMID: 21435391]

## 謝辞

本文の執筆にあたり、終始懇切な御指導、御校閲を賜りました福岡大学薬学部 臨床薬物治療学教室 遠城寺 宗近 教授、森 征慶 助教に心より深謝の意を表します。

また、本研究に温かいご協力を頂きました福岡大学薬学部 臨床薬物治療学教室 大江 賢治 教授、村田 雄介 講師に謹んで感謝申し上げます。

そして、本文の審査過程において数々の御助言、御指導を賜りました福岡大学薬学部 臨床疾患薬理学教室 桂林 秀太郎 教授、生体機能制御学教室 佐野 和憲 准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究者として多大なる御協力と御助言をいただきました同研究室、川邊 隼輔 学士、上之 将明 学士、田口 美咲 女史に心から感謝致します。

終始苦楽を共にした同研究室、栗山 透 学士、寺井 大輝 学士に深く感謝致します。

本研究に関係した実験動物に感謝するとともに、心からの御冥福をお祈り致します。

最後に、4年間の学生生活において、終始精神的、経済的支援を賜りました家族、これまで支えて下さった方々皆様に多大なる感謝の意を表し、謝辞に代えさせていただきます。