

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

原田 洸秀

福岡大学薬学部臨床薬物治療学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

Effects of handedness (paw preference) on depression related symptoms and changes of hippocampal BDNF-TrkB-CREB signaling pathway activity in male Wistar rats exposed to psychosocial stress

Hiroyoshi Harada

Department of Pharmacotherapeutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Depression is a heterogeneous psychiatric disorder with severe burden of disability worldwide. There is a large body evidence indicating that stressful life events contribute to the development of depression. However, the mechanism underlying the heterogeneity of depression is largely unknown. Handedness not only reflects hemispheric asymmetries but also regulates the stress response. The ventral hippocampus is a brain region for regulating the emotion. In addition, the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) -tropomyosin receptor kinase B (TrkB) -cAMP response element-binding protein (CREB) signaling pathway plays an important role in maintenance of the ventral hippocampal function. Therefore, stress-induced impairment of BDNF-TrkB-CREB signaling pathway in the ventral hippocampus is involved in the pathogenesis of depression. The present study aimed to investigate the relationship between handedness and BDNF-TrkB-CREB signaling pathway activity of the right and left ventral hippocampus. The following results were obtained: (1) Under non-stress conditions, the left-pawed rats exhibited a lower activity of BDNF-TrkB-CREB signaling pathway in the left ventral hippocampus compared to the right-pawed rats. (2) Under stress conditions, social defeat stress decreased the activity of BDNF-TrkB-CREB signaling pathway both the left and right ventral hippocampus in the right-pawed rats. On the other hand, there were no stress-induced changes in the activity of ventral hippocampal BDNF-TrkB-CREB signaling pathway in the left-pawed rats. These results suggest that innate and stress-induced changes in the BDNF-TrkB-CREB signaling pathway activity in the ventral hippocampus differ depending on the handedness, which may lead to the heterogeneity of depression.

keywords : depression, handedness, paw preference, ventral hippocampus, BDNF-TrkB-CREB signaling pathway

【緒言/目的】

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 [1]。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 [2]。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 [3]。また、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 [4]。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 [5]。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 [6]。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 [7]。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。

【実験方法】

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。これらの動物は，室温23 ± 2℃，絶対湿度60 ± 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。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。

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，既報のプロトコルを一部改変してPPTを行った [5]。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。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 ≤ 15) と右利き (平均RPE回数 ≥ 35) にそれぞれ分類した。なお，15 < 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。

Resident/Intruder (R/I) 系を用いた心理社会的ストレス負荷プロトコル

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 [8]。本研究における心理社会的ストレス負荷は，既報のプロトコルを用いて行った [9]。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。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。

ウエスタンブロッティング

腹側海馬サンプルのタンパク質分離は、4-20% Mini-PROTEAN®TGXTM 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℃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。

RT-PCR

腹側海馬サンプルの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。

【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

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($F_{(1,16)} = 6.360, P < 0.05$), 利き手に関連した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×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. 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 ($P < 0.001$)。

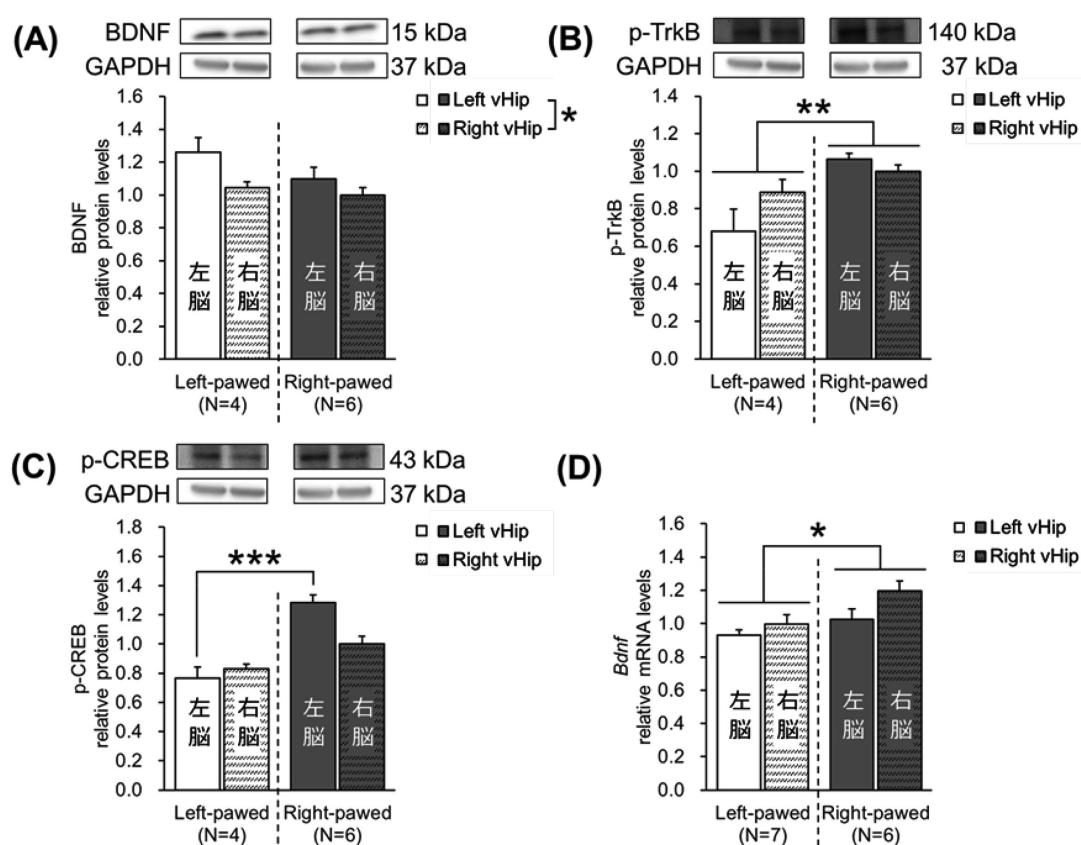


Fig. 1. Effects of paw preference on BDNF-TrkB-CREB signaling pathway activity in left and right ventral hippocampus. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

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

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. 2C)。

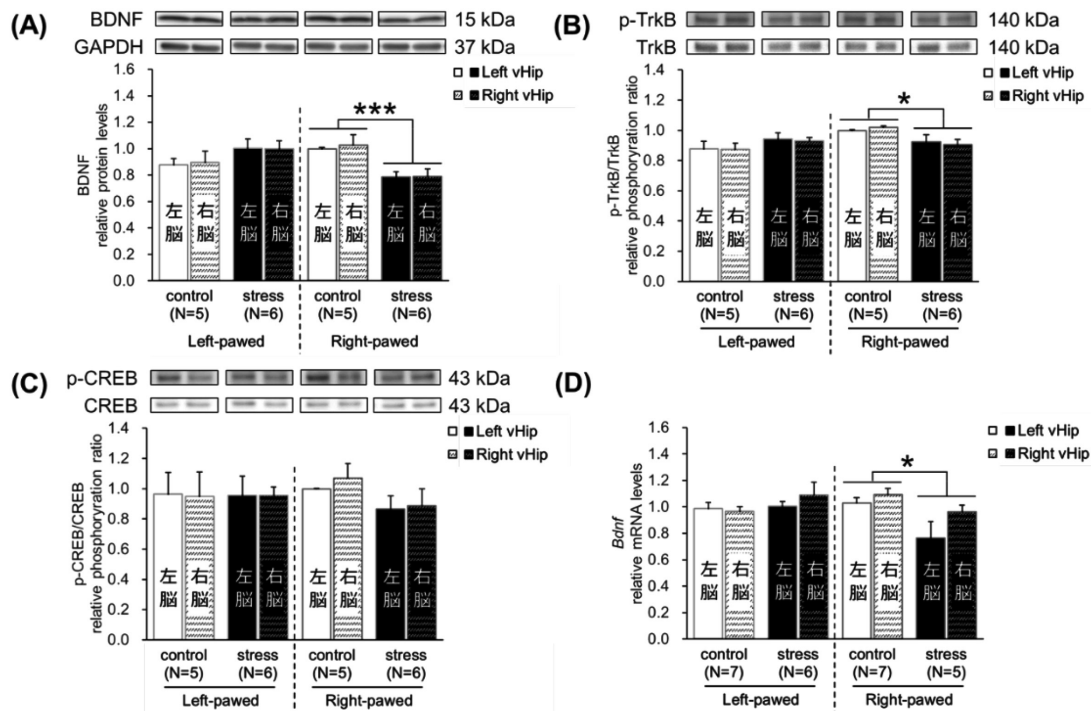


Fig. 2. Effects of psychosocial stress on BDNF-TrkB-CREB signaling pathway activity in left and right ventral hippocampus of left- and right-pawed rats. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

【考察】

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 [6]。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 [3]。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。

【参考文献】

1. World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med.*, 358: 55-68, 2008.
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.*, 59:1116-1127, 2006.
7. 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.
8. 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.
9. 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.