

令和元年6月18日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06978

研究課題名(和文) 幼少期ストレス誘発性筋異常疼痛の治療に対する薬理遺伝学を用いた検討

研究課題名(英文) Pharmacogenetics study for the treatment of early life stress induced fibromyalgia

研究代表者

古川 みなみ (Furukawa, Minami)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：00806474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、幼少期ストレスは精神疾患や発達性障害、筋異常疼痛などの発症に関与することが報告されているが、その原因は不明である。我々は幼少期ストレスのうちの母子分離により、GABAが興奮性から抑制性へ機能変化するGABAスイッチが遅延すること、GABAの抑制性に関与するKCC2の細胞体周囲の発現が減少し、GABAの興奮性に関与するNKCC1の発現は母子分離により影響を受けないことを示した。また、思春期相の行動を解析すると、母子分離により、多動性の増加、認知能力の低下、注意力の低下、攻撃性の増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幼少期ストレスが、精神疾患や発達性障害、筋異常疼痛などの発症に関与することが報告されている。我々は幼少期ストレスにより、GABAスイッチが遅れ、細胞体周囲のKCC2の発現が減少し、NKCC1はほとんど影響を受けないことを初めて報告した。これにより、KCC2やGABAスイッチを介した、精神疾患や発達性障害、筋異常疼痛などの発症の予防、改善に抑制系の成熟を標的とした新たな治療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it is reported early life stress is involved in the onset of psychiatric disorders, developmental disorders, muscle pain. However, the cause is unknown. We examined whether neonatal stress can affect the timing of the GABA functional switch and cause disorders during adolescence. Neonatal stress was induced in C57BL/6J male mouse pups by maternal separation on postnatal days (PND) 1-21. We showed that maternal separation delayed the timing of the GABA switch in the hippocampus and inhibited the increase in membrane KCC2 expression, with KCC2 expression inhibition persisting until adolescence. Behavioral tests showed impaired cognition, declined attention, hyperlocomotion, and aggressive character in maternally separated mice. Taken together, our results show that neonatal stress delayed the timing of the GABA switch, which could change the E/I balance and cause neurodegenerative disorders in later life.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：幼少期ストレス GABAスイッチ KCC2 NKCC1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋異常疼痛は線維筋痛症などにみられる全身の耐え難い自発痛と痛覚過敏を特徴とする状態である。しかし、これらの疾患に器質的な異常がみられないため、診断が困難であり、有効な治療法も確立されていない。近年、この筋異常疼痛が幼少期ストレスにより誘発されることが報告された。また、幼少期ストレスにより、精神疾患や発達障害といった様々な疾患が起こることも報告されている。しかし、これらの原因、メカニズムの詳細は解明されていない。

中枢神経系の機能獲得はある一定のタイミングにて、どのような脳機能が発現するのか決まっていると言われている。このような脳神経発達に敏感に時期に、神経回路網に問題が起きると、生涯において非常に強い影響を及ぼす可能性がある。このような敏感な時期のひとつで、マウスにおいて生後 1 ~ 2 週にて、抑制系の主要な神経伝達物質の γ -アミノ酪酸 (GABA) は興奮性から抑制性に機能変化する。これを GABA スイッチという。GABA スイッチのタイミングはクロライドイオン (Cl^-) の共輸送体の機能バランスによって決定される。主要な Cl^- の共輸送体は、細胞内の Cl^- を減少させる K^+-Cl^- 共輸送体 (KCC2) と細胞内の Cl^- を増加させる $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC1) である。GABA スイッチの遅延は中枢神経系における興奮性および抑制性ニューロンの不適切な生理学的バランスをもたらす可能性があり、不適切な興奮性 / 抑制性 (E/I) バランスは神経発達障害にみいだされている。

KCC2 および NKCC1 は GABA スイッチにおいて重要な分子ですが、KCC2 および NKCC1 に対する幼少期ストレスの影響は完全には解明されていません。幼少期ストレスと KCC2 に関するこれまでの研究では、幼少期ストレスのひとつである母子分離において、KCC2 は増加するまたは減少するといった異なる結果が得られている。しかし、これらは異なる評価方法を用いており、KCC2 および NKCC1 の活性は細胞膜内での発現に比例するため、細胞内での発現を評価するべきだと考えられる。

成体ラットにおいて、慢性ストレスの影響を最も受けやすい領域として、海馬の CA3 が報告されている。反復性の母子分離は一種の慢性ストレスとみなすことができるが、幼少期ストレスの評価は CA1 では行われているが、CA3 では行われていない。また、母子分離に対する CA3 領域の脆弱性は調査されていない。さらに、精神神経疾患の多くが思春期に初めて現れるが、マウスの思春期相当での脳や行動に対する母子分離の影響もあまり報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は新生児マウスに母子分離を行い、KCC2 または NKCC1 の発現が変化するか、GABA スイッチ時期は影響されるのか、思春期相当時期において海馬関連の行動試験を行い行動に変化が現れるのか調査することとした。

3. 研究の方法

マウスの飼育環境は 12 時間の明暗サイクルで行った。C57BL6J マウスを搬入後 1 週間の馴化期間をおき、雄と雌を 1 ペアずつ同じケージに入れ交配させ、実験には産まれた雄性新生児マウスを使用した。幼少期ストレスの 1 つである母子分離を新生児マウスに、生後 1 ~ 21 日の 21 日間、1 日 3 時間 (19 時 30 分 ~ 22 時 30 分) 行った。母子分離は元のケージから遮断された環境でヒーティングパッドで温められた別のケージにて行った。母子分離を行う群を母子分離群、行わない群をコントロール群とした。すべての新生児マウスは生後 22 日で離乳し、群ごとに集団飼育した。

生後 7、14、21、35 日において、脳を摘出し、免疫染色にて KCC2 および NKCC1 の定量解析を行った。

生後 2、8、11、15 日にて、脳を摘出し、 Ca^{2+} イメージングにて、GABA の応答を確認した。

思春期時期の行動解析として、生後 35 ~ 38 日にオープンフィールド試験、新奇物質探索試験、高架十字迷路試験、攻撃行動計測システムを使用した攻撃行動試験を行った。

4. 研究成果

(1) 海馬における KCC2 および NKCC1 の発現について

海馬領域で細胞体周囲での KCC2 の発現は、生後 7 日、14 日、21 日、35 日で、CA3 および CA1 の錐体細胞において母子分離群で有意に少なかった。また、歯状回 (DG) の顆粒細胞における KCC2 の発現は生後 7 日、35 日において有意差はなかったが、生後 14 日、21 日において母子分離群で有意に少なかった。

NKCC1 の細胞体周囲の発現は生後 7 日、14 日、21 日、35 日において海馬の CA3、CA1、DG いずれの領域でも母子分離群、コントロール群で有意差はみられなかった。

(2) Ca^{2+} イメージングを用いた GABA スイッチ時期の検討について

GABA スイッチのタイミングを決定するために、 Ca^{2+} イメージングにて、GABA アゴニストの μ シモールは、生後 2 日、8 日、11 日、15 日での海馬 CA3 にて、脱分極または過分極と

して機能するのか評価した。脱分極反応でありムシモール誘発性 Ca²⁺応答を示すニューロンの割合を二元配置分散分析によって分析した。生後2日では、ムシモールは、コントロール群および母子分離群の両方のマウスに由来するCA3ニューロンにおいて100%のCa²⁺応答を誘導した。生後8日、11日では、ムシモール誘発性Ca²⁺応答は、コントロール群よりも母子分離群のニューロンの割合が高かった。生後11日のコントロール群ではCa²⁺応答を検出することができなかったが、生後11日の母子分離群では約20%にCa²⁺応答があった。生後15日では、コントロール群、母子分離群の両群ともCa²⁺応答を検出することができなかった。

(3) 思春期相当時期の海馬関連の行動試験における行動の変化について

オープンフィールド試験において、母子分離群のマウスは自発的活動の増加を示した。新奇物質探索試験では、母子分離群ではより長い総探索時間を示したが、コントロール群のマウスよりも新しい対象を識別することができなかった。高架十字迷路試験では、母子分離群のマウスはオープンアームへの進入時間、進入回数が増加した。攻撃行動計測システムを使用した攻撃行動試験では、母子分離群のマウスはコントロール群よりも強い噛みこみ強度とより多くの噛みこみ回数を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1) Furukawa M, Tsukahara T, Tomita K, Iwai H, Sonomura T, Miyawaki S, Sato T. Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 25;493(3):1243-1249. 査読有

2) Maeda-lino A, Furukawa M, Kwon S, Marutani K, Nakagawa S, Fuchigami T, Nakamura N, Miyawaki S. Evaluation of maxillary central incisors on the noncleft and cleft sides in patients with unilateral cleft lip and palate-Part 2: Relationship between root resorption, horizontal tooth movement, and quantity of grafted autogenous bone. *Angle Orthod*. 2017 Nov;87(6):863-870. 査読有

3) Maeda-lino A, Marutani K, Furukawa M, Nakagawa S, Kwon S, Kibe T, Tezuka M, Nakamura N, Miyawaki S. Evaluation of maxillary central incisors on the noncleft and cleft sides in patients with unilateral cleft lip and palate-Part 1: Relationship between root length and orthodontic tooth movement. *Angle Orthod*. 2017 Nov;87(6):855-862. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1) 福嶋 美佳, 前田 綾, 大牟禮 治人, 迫口 陽子, 大賀 泰彦, 古川 みなみ, 大石 章仁, 大迫 佑季, 高橋 広太郎, 成 昌建, 宮脇 正一. 覚醒時のストレス負荷と食道内酸刺激が咬筋活動に及ぼす影響. 第77回日本矯正歯科学会学術大会 学術展示 2018年10月30日-11月1日 横浜

2) Furukawa M, Tsukahara T, Yamanishi S, Tomita K, Takashi Y, Tanaka K, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Nishiyama N, Nishitani Y, Miyawaki S, Sato T. Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression and induces developmental disorders-like behaviors in mice. *WCP2018-18th world congress of basic and clinical pharmacology*. Kyoto. 2018.7.1-7.6.

3) 前田 綾, 古川 みなみ, 権 相豪, 丸谷 佳菜子, 中川 祥子, 渡邊 温子, 岐部 俊郎, 手塚 征宏, 淵上 貴央, 中村 典史, 宮脇 正一. 片側性唇顎口蓋裂を伴う患者における上顎中切歯の歯根吸収と水平的な歯の移動および移植骨との関連. 第42回日本口蓋裂学会総会・学術集会 示説 2018年5月24-25日 大阪

4) 古川 みなみ, 塚原 飛央, 富田 和男, 高 裕子, 田中 康一, 北中 純一, 北中 順恵, 西谷 佳浩, 竹村 基彦, 西山 信好, 宮脇 正一, 佐藤 友昭. 母子分離雄性マウスに対する GABA スイッチを介した高次機能への影響. 第70回日本薬理学会西南部会 学術口演 2017年11月18日 鹿児島

5) 富田 和男, 桑原 義和, 高 裕子, 並河 英紀, 塚原 飛央, 古川 みなみ, 田中 康一, 漆原 佑介, 北中 純一, 北中 順恵, 栗政 明弘, 西谷 佳浩, 宮脇 正一, 西山 信好, 竹村 基彦, 福本 学, 佐藤 友昭. 治療耐性がん細胞における過酸化水素耐性メカニズムの解析. 第70回日本薬理学会西南部会 学術口演 2017年11月18日 鹿児島

6) 高 裕子, 富田 和男, 桑原 義和, 並河 英紀, 塚原 飛央, 古川 みなみ, 田中 康一, 北中 純一, 北中 順恵, 西谷 佳浩, 宮脇 正一, 西山 信好, 竹村 基彦, 佐藤 友昭. 過酸化水素処理による 0細胞の膜状態変化とその感受性. 第70回日本薬理学会西南部会 学術口演 2017年11月18日 鹿児島

7) 古川 みなみ, 塚原 飛央, 宮脇 正一, 佐藤 友昭. 幼少期ストレスと発達性障害との関係解明 - 矯正治療の効率化に向けた検討 -. 第76回日本矯正歯科学会学術大会 学術展示 2017年10月18-20日 札幌

8) 古川 みなみ, 塚原 飛央, 富田 和男, 高 裕子, 宮脇 正一, 佐藤 友昭. 母子分離ストレスは雄性マウスにおいて GABA スイッチの時期を遅らせ 発達性障害様行動異常を誘発する. 第59回歯科基礎医学会学術大会 学術展示 2017年9月16-18日 松本

9) 塚原 飛央, 古川 みなみ, 富田 和男, 岩井 治樹, 高 裕子, 園村 貴弘, 佐藤 友昭. ストレスによる GPR30 過剰発現は Akt-WINK1 の過敏反応を惹起し, KCC2 を不活性化させることで, GABA 抑制機能を低下させる. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 学術展示 2017 年 9 月 16-18 日 松本

10) 富田 和男, 高 裕子, 塚原 飛央, 古川 みなみ, 西谷 佳浩, 佐藤 友昭. 治療耐性がん細胞における酸化ストレス応答機構の解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 学術口演 2017 年 9 月 16-18 日 松本

11) 高 裕子, 富田 和男, 塚原 飛央, 古川 みなみ, 西谷 佳浩, 佐藤 友昭. O 細胞における酸化ストレス応答機構の解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 学術展示 2017 年 9 月 16-18 日 松本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。