

令和元年6月17日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17747

研究課題名(和文) 外側手綱核をターゲットとした新規幼少期ストレスモデル：経験が惹起する精神疾患機序

研究課題名(英文) A new early life stress model targeted to the lateral habenula: The mechanism of psychiatric disorder evoked by experience

研究代表者

中村 友也 (Nakamura, Tomoya)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：70733343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：過度の幼少期ストレスが成長後の不安やうつを惹起するメカニズムを明らかにするため、生後10-20日のマウスの仔を母親から毎日3時間分離し、成長後の個体の行動とストレス関連部位の外側手綱核、海馬、扁桃体の神経回路変化を調査した。幼少期ストレスを与えた群では、コントロールと比較して外側手綱核特異的に抑制性のParvalbumin陽性細胞数が減少し、ストレス下の興奮性神経細胞の活動性が上昇し、不安様行動とうつ様行動がみられた。本研究では不安やうつを引き起こす幼少期ストレスが外側手綱核特異的に抑制性回路を改変して高次機能に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外界から影響を受け、経験が神経回路の構造と機能に効果を及ぼす幼少時期を臨界期と呼ぶが、情動の臨界期の存在はこれまで明らかではなく、情動の神経回路の発達と成熟の機構の知見は乏しかった。我々は、本研究において、情動の臨界期を実証的に検証できる動物モデルを確立し、幼少期ストレスに関連した不安様・うつ様症状の発症を見出した。本研究は情動の臨界期のさきがけとなる研究で、幼少期の経験の錯乱が情動の神経回路に与える影響を検証できた。

研究成果の概要(英文)：To know circuit mechanism by which anxiety and depression result from early-life stress, the pups were separated from dam for 3 hours/day during postnatal (P) 10-20 (Repeated maternal separation; RMS), and later on P60 their behaviors and stress-related regions: lateral habenula, hippocampus, and amygdala, are investigated. In the RMS group, it was observed that the smaller number of inhibitory parvalbumin positive cells and the higher neuronal activity under the stress specifically in the lateral habenula accompanying with the anxiety- and depression-like behaviors. Here we reveal that early-life stress causing behavioral alteration undermines the inhibitory circuits in lateral habenula.

研究分野：神経科学

キーワード：パルプアルブミン 幼少期ストレス 外側手綱核 不安 うつ

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

1. 研究開始当初の背景

他の時期より外界から影響を受けやすく、経験が神経回路の構造と機能に効果を及ぼす時期を臨界期と呼ぶが、これまでに情動の臨界期の存在は明らかではなく、情動の神経回路の発達と成熟の機構の知見は乏しかった。我々は、幼少期(生後 10-20 日; P10-20)の外側手綱核(Lateral Habenula; LHb)で、神経可塑性マーカーの parvalbumin (PV) 陽性細胞が少なく、ストレス刺激後の神経活動性が高いという、他の部位で報告されている神経回路の臨界期の特徴を見出した。LHb は不安やうつ疾患の際に異常な活動を示すことが報告されているが、幼少期ストレスと成長後の不安やうつの発症メカニズムについて、LHb に着目している研究は他に例がない。

2. 研究の目的

本研究では、LHb の神経可塑性が高いと考えられる時期に焦点をあて、幼少期ストレスを与えることで、新規幼少期ストレスモデルを作成する。このモデルの神経回路や行動を調査することで、幼少期ストレスによる LHb の神経回路構造や機能の改変機構、LHb の行動制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)一般的に PV 陽性細胞は GABA 作動性介在神経であると言われているが LHb ではわかっていない。PV 陽性細胞が GABA 合成酵素や GABA を含むのかを確認する。

(2)LHb の神経可塑性が高いと考えられる時期(P10-20)、その前の時期(P1-9)に、毎日 3 時間母子分離ストレス(Repeated maternal separation; RMS)、P36-45 拘束ストレス(Repeated immobilization; RIMO)を与え、成長後の神経回路を調査する。不安やうつと関連が深いとよく知られている視床下部-下垂体-副腎系(HPA 系)に影響がないか、各群の非ストレス負荷時とストレス負荷時のコルチコステロン濃度を調査する。

(3) RMS 群の成長後に行動実験を行い、不安様症状やうつ様症状の有無を検討する。

4. 研究成果

(1)免疫染色により、LHb の PV 陽性細胞は $50.02 \pm 0.1\%$ ($n=4$)に GABA を含んでいた。また、遺伝子組み換え動物を用いた実験で、GABA 合成酵素 GAD67 は LHb において発現が見られず($n=3$)、GAD65 が PV 陽性細胞のわずか $4.85 \pm 0.9\%$ ($n=5$)に発現していた。LHb においては、自ら GABA を合成しない抑制性の GABA 作動性の PV 陽性細胞が多いことが示された。

(2)

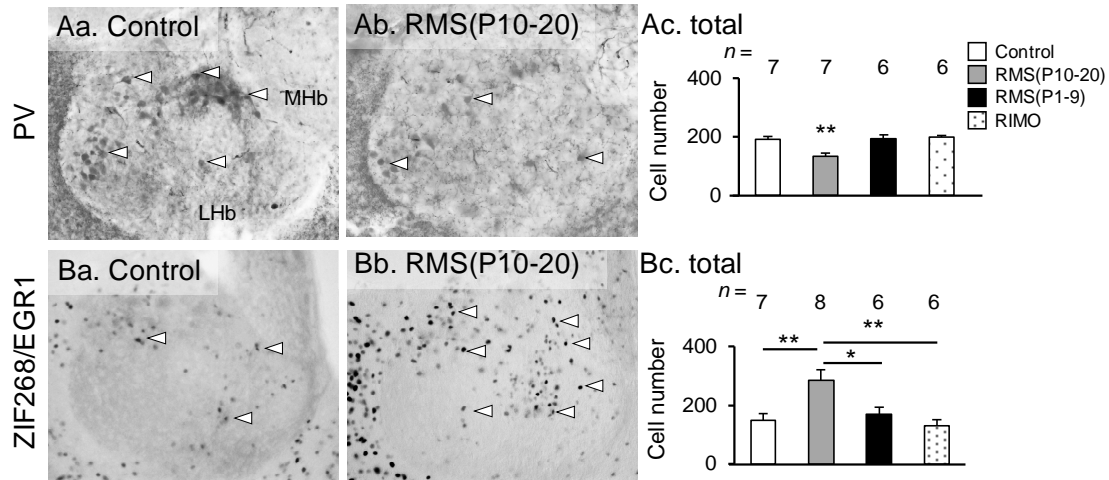


Figure 幼少期ストレスが成長後の PV 陽性細胞と ZIF268/EGR1 陽性細胞に及ぼす効果. PV 陽性細胞(Aab)とストレス負荷後の ZIF268/EGR1 陽性細胞(Bab)の免疫染色画像,矢頭で示されるように黒く染まっているのが免疫染色細胞. Control 群と RMS(P10-20)群,RMS(P1-9)群, RIMO 群における PV 陽性細胞数の比較(Ac)とストレス負荷後の ZIF268/EGR1 陽性細胞の比較(Bc).Significant difference, * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ (Turkey ' s HSD post-hoc test) . Error bars represent SEMs.

RMS(P10-20)群において、Control 群と比較して PV 陽性細胞は、優位に少なかった。しかしながら、Control 群と RMS(P1-9)群や RIMO 群の間に優位な差はなかった。さらに、他のストレス関連部位の海馬歯状回や扁桃体基底核において、RMS 群と RIMO 群の間に優位な差はなかった(海馬; student t-test, $p = 0.57$, 扁桃体; student t-test, $p = 0.34$)

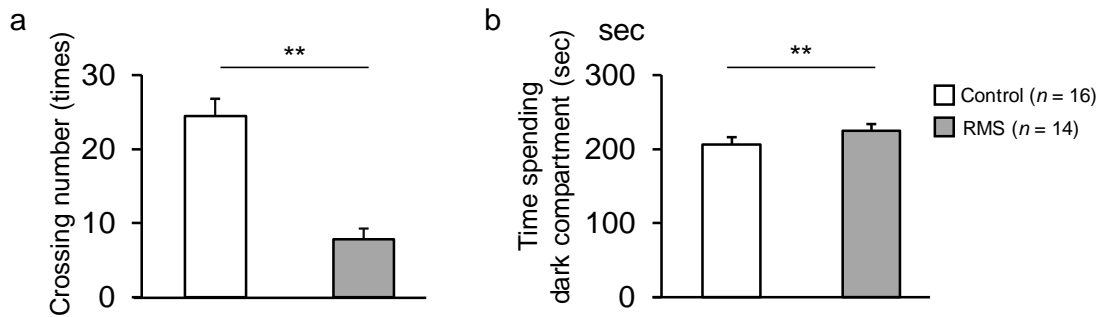
ストレス負荷後の神経細胞活動性マーカーの ZIF268/EGR1 は RMS(P10-20)群において、Control 群と比較して優位に多く、Control 群と RMS(P1-9)群や RIMO 群の間に優位な差はなかった。さらに、海馬歯状回において RMS 群と RIMO 群の間に優位な差はなかった(student t-test, $p = 0.37$)

コルチコステロン濃度は、Two-way ANOVA で非ストレス負荷時とストレス負荷時で主効果が認められたが($p < 0.01$)、各処置群とストレスの間に交差反応は見られなかった($p = 0.88$)。

これらの結果は、幼少期ストレス (RMS) の効果は HPA 軸に依存せずに、LHb に構造と機能の可塑的な変化を特異的に惹起することを示す。

(3)

A. Dark/Light box test



B. Force swimming test

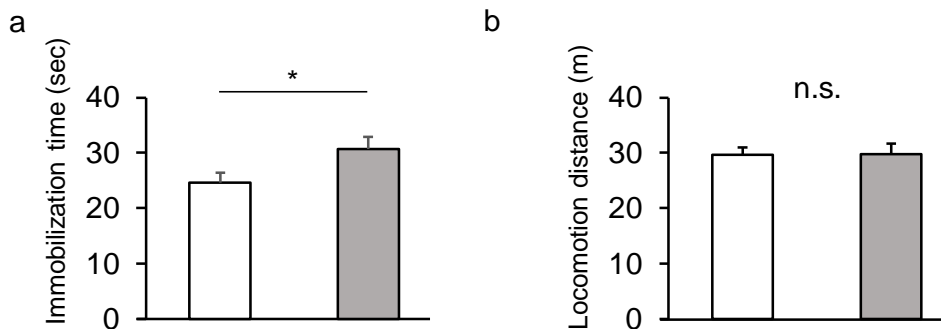


Figure 3 RMS が不安様行動とうつ様行動に及ぼす効果. 明暗箱試験(A)と強制水泳試験(B)におけるControl群とRMS群の比較(A). 明箱-暗箱間の横断回数(Aa), 暗箱の滞在時間(Ab). 不動時間(Ba), 総移動距離(Bb). Significant difference, * $p < 0.05$, $p < 0.01$ (student t-test). Error bars represent SEMs.

明暗箱試験は、マウスが明るい環境を避ける性質を利用した試験で、明箱と暗箱を連結した装置にマウスを5分間入れ、暗箱での滞在時間の増加を不安様行動と評価する。RMS群はControl群と比較して明箱-暗箱の横断回数が優位に減少し、暗箱での滞在時間が優位に増加した。

強制水泳試験は、マウスを10分間水槽に入れ、逃避不可能であることの学習によって生じる無動時間の増加をうつ様行動と評価する。行動はビデオカメラで撮影し、トラッキングにはMATLABベースのmouse tracker(Motr; Ohayon et al., 2013)を使用し、MATLABスクリプトを開発し解析を行った。無動時間は3秒間持続して加速度が 0 cm/sec^2 以下、速度が 3 cm/sec 以下、鼻先と尾の付け根の距離の変化が 0.4 cm/sec 以下のものを無動と定義した。RMS群はControl群と比較して、無動時間が優位に増加したが、総移動距離に優位な差はなかった。

これらの結果は、幼少期のストレス経験が成長後に不安様行動やうつ様行動を惹起することを示した。

(4) 結論 (国内外における位置づけなど)

幼少期ストレスは時期特異的に、HPA軸に依存せずに、LHbに構造と機能の可塑的な変化を部位特異的に惹起し、抑制性のPV陽性細胞を減少させ、ストレス下のLHbの神経細胞活動性の上昇を導き、不安様行動やうつ様行動を発現させることが示唆される。本研究は情動の臨界期の存在を強く示唆する先駆けとなる研究である。

(5) 今後の展望

LHb の PV 陽性細胞は自ら GABA を合成しない GABA 作動性抑制性神経細胞であることを明らかにした。その中には背側縫線核に投射する神経細胞があり、モノアミン神経核に抑制的に働くと示唆される。他方、PV 陽性細胞が LHb に抑制性の介在神経細胞として神経細胞活動性に寄与するかは定かではなく、RMS によって生じた PV 陽性細胞の減少が神経細胞活動性の上昇を惹起したために、不安行動やうつ様行動が生じているのかは未だ証明できていない。これらを光遺伝学的操作や電気生理学の実験を用いて、直接的に証明したいと考えている。

参考文献

Ohayon, S., Avni, O., Taylor, A. L., Perona, P., & Egnor, S. R. (2013). Automated multi-day tracking of marked mice for the analysis of social behaviour. *Journal of neuroscience methods*, 219(1), 10-19.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Kurosaki K, Nakamura T, Kanemoto M, Ichijo H., Lateral habenular structure and function of adult under the influences of early-life stress (2017 神経科学)

Nakamura T, Kurosaki K, Kanemoto M, Ichijo H., Structure and function of the LHb are regioselectively altered under the influences of early-life stress(2018 神経科学)

中村友也., 幼少期外側手綱核のストレスに対する臨界期様現象；神経機構解析(2018 Science GALA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者 該当者なし

(2)研究協力者

氏名：一條 裕之

所属：富山大学 医学部 解剖学講座

職名：教授

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。