

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 ～ 2010

課題番号：19390035

研究課題名（和文）

認知、ストレス感知における海馬亜鉛のユニークな応答とストレス性精神障害の予防

研究課題名（英文）

Unique response of hippocampal zinc in recognition and stress and prevention of stress-induced neuropsychological diseases

研究代表者：武田 厚司

（静岡県立大学・薬学部・准教授）

研究者番号：90145714

研究成果の概要（和文）：

長期増強（long-term potentiation: LTP）などのシナプス可塑性は学習・記憶の分子基盤と考えられている。記憶形成に関係する海馬において、苔状線維-CA3 錐体細胞間での LTP は亜鉛イオンにより減弱され、シャープファー側枝-CA1 錐体細胞間での LTP は亜鉛イオンにより増強されることを明らかにした。一方、ストレス負荷によりシナプス可塑性や学習・記憶は影響を受けるが、ラットに急性ストレスを負荷すると海馬細胞外（シナプス）亜鉛ホメオスタシスが変化し、LTP 発現が減弱することを明らかにした。以上より、海馬での亜鉛シグナリングが LTP の調節に深く関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Long-term potentiation (LTP) is known as a cellular mechanism of memory formation. In the hippocampus, Zn^{2+} attenuates mossy fiber LTP, while potentiated CA1 LTP. On the other hand, the stressful environment changes synaptic plasticity and memory formation. When rats were subjected to acute stress, zinc homeostasis in the extracellular compartment was significantly changed in the hippocampus. This change may attenuate LTP in the hippocampus. The present study suggests that Zn^{2+} signaling modulates LTP in the hippocampus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
平成 20 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
平成 21 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：亜鉛、海馬、学習、記憶、シナプス可塑性、長期増強、ストレス、精神障害

1. 研究開始当初の背景
高度情報化社会のなかで、ヒトは様々なスト

レスを受けており、ストレスが惹起するうつ病（気分障害）は大きな社会問題となってい

る。うつ病は自殺の一因であり、我が国の自殺者は年間3万人を越え、自殺未遂者を含めると27万人になる。精神活動を司る脳の仕組みの解明と精神疾患の予防は21世紀の大きな課題である。

生体にストレスが負荷されると、視床下部-下垂体-副腎皮質（HPA）系が活性化され、グルココルチコイド分泌が亢進する。WHOの調査ではHPA系の脱抑制、すなわち、海馬などを介したフィードバック機構（副腎皮質からのグルココルチコイドの分泌抑制）の破綻は約45%のうつ病（気分障害）患者で観察され、うつ病の本質的原因の一部を表現している可能性がある。慢性的なストレス下ではグルココルチコイドの作用を介して、グルタミン酸作動性神経の興奮性が高まり、海馬CA3錐体細胞ではシナプスリモデリング、樹状突起棘の喪失、神経細胞死が惹起される。その結果、HPA系のフィードバック機構が障害されると考えられるが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、記憶・学習などの高次機能、ストレス応答において重要な役割を担う海馬に着目し、環境ストレスに起因する精神障害のメカニズムを解析し、その予防法を微量栄養素である亜鉛などに着目して検討する。歯状回顆粒細胞由来の苔状線維のシナプス小胞にはグルタミン酸とともに亜鉛が高濃度（約300 μ M）で含まれ、CA3錐体細胞由来のシャープ側枝シナプス小胞にも亜鉛イオンを含むものがある（約45%）。シナプス小胞から放出された亜鉛イオンは細胞内カルシウムシグナルとクロストークし、興奮性のグルタミン酸シグナルを抑制的に調節することをこれまで示した。本研究では、記憶や学習の分子基盤と考えられているシナプス可塑的の一つである長期増強（LTP: long-term potentiation）に対する亜鉛の作用明らかにする。また、ストレス負荷に伴う海馬機能変化についてLTP誘導を指標にシナプスでの亜鉛動態に着目して解析する。また、食生活から精神障害を予防するため、亜鉛摂取不足に伴う行動異常を海馬機能に着目して解析する。

3. 研究の方法

ラット脳から海馬スライスを作成し、電気生理的研究手法を用いて、海馬LTP誘導における亜鉛の作用を検討した。

ラットにTail suspension ストレスを与え、海馬LTP（Long-term Potentiation）誘導に与える効果を評価するとともに、その効果に対する海馬亜鉛の関与を検討した。

低亜鉛食飼育したラットの不安・うつ様行動を解析するとともに、行動異常のメカニズ

ムを海馬グルタミン酸作動性神経活動に着目して検討した。

4. 研究成果

亜鉛はグルタミン酸放出に対するネガティブフィードバックファクターとして働く。グルタミン酸放出はシナプス可塑性と密接に関係することから、海馬LTPに対する亜鉛の作用を検討した。塩化亜鉛（1-5 μ M）は苔状線維-CA3錐体細胞間（図1の2）のLTPを減弱することが明らかとなった。興味深いことに、シャープ側枝-CA1錐体細胞間（図1の3）のLTPは逆に同濃度の亜鉛で増強された。苔状線維LTPはプレシナプスからのグルタミン酸の放出増加に依存する。亜鉛は苔状線維に取込まれ、苔状線維LTPを抑制的に調節することが示唆された。一方、シャープ側枝LTPにはN-methyl D-aspartate（NMDA）受容体に依存したLTPとNMDA受容体に依存しないLTPがあるが、亜鉛はポスト側CA1錐体細胞に取込まれ、NMDA受容体に依存したLTPを促進的に調節することが示唆された。

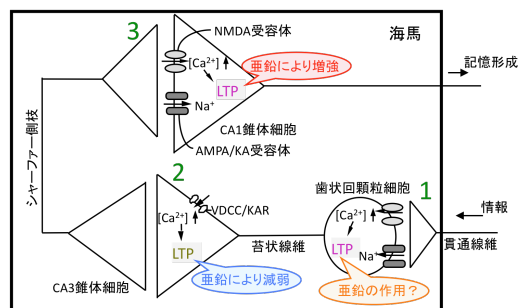


図1. 海馬の神経回路とLTPに対する亜鉛の調節作用
大脳皮質からの情報は貫通線維を介して海馬に入力され、三シナプス(1-3)で処理後、大脳皮質に貯蔵される。

ラットに30秒間のTail suspension ストレスを与えると海馬細胞外液中のグルタミン酸濃度が一過性に増加し、亜鉛濃度が持続的に減少した。Tail suspension ストレスを与えたラットから作製した海馬スライスでは、LTPは有意に減弱した。ストレス負荷後の海馬細胞への亜鉛取込みがLTP減弱に関与する可能性がある。そこで、ストレス負荷の代わりに海馬スライスに塩化亜鉛（100 μ M）を一時的に灌流し、LTPを誘導したところ、LTPは有意に減弱した。さらに、膜透過型亜鉛キレート試薬であるClioquinolを用い、Tail suspension ストレス後の亜鉛の作用をキレート化することにより阻害することを試みた。Clioquinolを腹腔内投与すると、Tail suspension を負荷してもLTPは減弱しなかった。以上より、急性ストレス負荷により海馬苔状線維LTPが減弱すること、ストレスによる海馬細胞への亜鉛イオンの取込み促進が、LTP減弱に関与することが示唆された。

うつ病患者は現代社会で増加しており、その予防・改善が望まれている。ラットに低亜鉛食を与えると、血清グルココルチコイドレベルが上昇し、うつ・不安様行動が増加した。血清グルココルチコイドレベルは摂食量低下によっても上昇する。亜鉛不足は摂食量を低下させることから、低亜鉛食ラットの摂取量と同量の通常食を与えたラット (pair-fed) のうつ様行動を調べた。うつ状態の指標となる強制水泳試験での無動時間は、低亜鉛食ラットと異なり、pair-fed ラットでは有意に増加しなかった。低亜鉛食ラットのうつ様行動の増加には亜鉛摂取量の低下が関与することが明らかになった。一方、グルココルチコイドは海馬においてグルタミン酸作動性神経活動を亢進させることが知られている。そこで、亜鉛不足時のうつ様行動と海馬グルタミン酸作動性神経活動との関係を検討した。低亜鉛食ラットの海馬を高カリウム溶液で刺激すると、細胞外グルタミン酸濃度は通常食ラットと比べて有意に増加した。海馬スライスを用いて、苔状線維終末における FM4-64 蛍光の減弱 (開口放出) を測定したところ、開口放出は低亜鉛食ラットで有意に増加した。一方、細胞外に放出されたグルタミン酸の再取込を担う GLT-1 の海馬での発現量は、低亜鉛食ラットで増加していた。ストレス負荷に伴い海馬細胞外グルタミン酸濃度が増加することが知られている。強制水泳試験において、海馬グルタミン酸作動性神経活動は亜鉛摂取不足により亢進し、うつ様行動の増加と関係すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 30 件)

原著論文: すべて査読有り

1. Atsushi Takeda, Haruna Tamano, Sachie Imano, Naoto Oku: Increases in Extracellular Zinc in the Amygdala in Acquisition and Recall of Fear Experience and their Roles in Response to Fear. *Neuroscience*, in press.
2. Atsushi Takeda, Haruka Iwaki, Masaki Ando, Kosuke Itagaki, Miki Suzuki and Naoto Oku: Zinc Differentially Acts on Components of Long-term Potentiation at Hippocampal CA1 Synapse. *Brain Res.*, 1323, 59-64 (2010).
3. Mitsugu Watanabe, Haruna Tamano, Toshinori Kikuchi and Atsushi Takeda: Susceptibility to Stress in Young Rats after 2-week Zinc Deprivation. *Neurochem. Int.*, 56, 410-416 (2010).
4. Tomoko Hibino, Mitsutoshi Yuzurihara, Yoshio Kasa and Atsushi Takeda: Synephrine, a Component of *Evodiae Fructus*, Constricts Isolated Rat Aorta via Adrenergic and Serotonergic Receptors. *J. Pharmacol. Sci.*, 111, 73-81 (2009).
5. Sang Won Suh, Seok Joon Won, Aaron M. Hamby, Yang Fan, Christian T. Sheline, Haruna Tamano, Atsushi Takeda and Jialing Liu: Decreased brain zinc availability reduces hippocampal neurogenesis in mice and rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 29, 1579-1588 (2009).
6. Atsushi Takeda, Masaki Ando, Shingo Kanno, Naoto Oku: Unique response of zinc in the hippocampus to behavioral stress and attenuation of subsequent mossy fiber long-term potentiation. *NeuroToxicology*, 30, 712-717 (2009).
7. Haruna Tamano, Fumika Kan, Mika Kawamura, Naoto Oku and Atsushi Takeda: Behavior in the forced swim test and neurochemical changes in the hippocampus in young rats after 2-week zinc deprivation. *Neurochem. Int.*, 55, 536-541 (2009).
8. Atsushi Takeda, Naomi Sakurada, Masaki Ando, Shingo Kanno and Naoto Oku: Facilitation of zinc influx via AMPA/kainate receptor activation in the hippocampus. *Neurochem. Int.*, 55, 376-382 (2009).
9. Atsushi Takeda, Hiromasa Itoh, Haruna Tamano and Naoto Oku: High K^+ -induced increase in extracellular glutamate in zinc deficiency and endogenous zinc action. *J. Health Sci.*, 55, 405-412 (2009).
10. Tomoko Hibino, Mitsutoshi Yuzurihara, Hitomi Kanno, Yoshio Kasa and Atsushi Takeda: Goshuyuto, a Japanese traditional medicine, and aqueous extracts of *Evodiae Fructus* constrict isolated rat aorta via adrenergic and/or serotonergic receptors. *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 237-241 (2009).
11. Atsushi Takeda, Sayuri Fuke, Masaki Ando, and Naoto Oku: Positive Modulation of Long-term Potentiation at Hippocampal CA1 Synapses by Low Micromolar Concentrations of Zinc. *Neuroscience*, 158, 585-591 (2009).
12. Atsushi Takeda, Hiromasa Itoh, Akito Nagayoshi and Naoto Oku: Abnormal calcium mobilization in hippocampal slices of epileptic animals fed a zinc-deficient diet. *Epilepsy Res.*, 83, 73-80 (2009).
13. Tomoko Hibino, Mitsutoshi Yuzurihara, Kiyoshi Terawaki, Hitomi Kanno, Yoshio Kasa and Atsushi Takeda: Goshuyuto, a traditional Japanese medicine for migraine,

- inhibits platelet aggregation in guinea-pig whole blood. *J. Pharmacol. Sci.*, 108, 89-94 (2008).
14. Atsushi Takeda, Haruna Tamano, Hiromasa Itoh and Naoto Oku: Attenuation of abnormal glutamate release in zinc deficiency by zinc and Yokukansan. *Neurochem. Int.*, 53, 230-235 (2008).
 15. Atsushi Takeda, Shingo Kanno, Naomi Sakurada, Masaki Ando and Naoto Oku: Attenuation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by low micromolar concentrations of zinc. *J. Neurosci. Res.*, 86, 2909-2911 (2008).
 16. Atsushi Takeda, Haruna Tamano, Fumika Kan, Tomoyuki Hanajima, Kohei Yamada, and Naoto Oku: Enhancement of social isolation-induced aggressive behavior of young mice by zinc deficiency. *Life Sci.*, 82, 909-914 (2008).
 17. Atsushi Takeda, Hiromasa Itoh, Haruna Tamano, Mitsutoshi Yuzurihara and Naoto Oku: Suppressive effect of Yokukansan on excessive release of glutamate and aspartate in the hippocampus of zinc-deficient rats. *Nutr. Neurosci.*, 11, 41-46 (2008).
 18. Atsushi Takeda, Hiromasa Itoh, Kohei Yamada, Haruna Tamano, and Naoto Oku: Enhanced basal activity of hippocampal mossy fibers in zinc deficiency. *BioMetals*, 21, 545-552 (2008).
 19. Atsushi Takeda, Naomi Sakurada, Shingo Kanno, Masaki Ando, and Naoto Oku: Vulnerability to seizures induced by potassium dyshomeostasis in the hippocampus in aged rats. *J. Health Sci.*, 54, 37-42 (2008).
 20. Atsushi Takeda, Kohei Yamada, Haruna Tamano, Sayuri Fuke, Mika Kawamura and Naoto Oku: Hippocampal calcium dyshomeostasis and long-term potentiation in 2-week zinc deficiency. *Neurochem. Int.*, 52, 241-246 (2008).
 21. Atsushi Takeda, Sayuri Fuke, Wataru Tsutsumi and Naoto Oku: Negative modulation of presynaptic activity by zinc released from Schaffer collaterals. *J. Neurosci. Res.*, 85, 3666-3672 (2007).
 22. Atsushi Takeda, Sayuri Fuke, Akira Minami and Naoto Oku: Role of zinc influx via AMPA/kainate receptor activation in metabotropic glutamate receptor-mediated calcium release. *J. Neurosci. Res.*, 85, 1310-1317 (2007).
 23. Atsushi Takeda, Haruna Tamano, Fumika Kan, Hiromasa Itoh and Naoto Oku: Anxiety-like behavior of young rats after 2-week zinc deprivation. *Behav. Brain Res.*, 177, 1-6 (2007).
 24. Atsushi Takeda, Akira Minami, Naomi Sakurada, Satoko Nakajima, and Naoto Oku: Response of hippocampal mossy fiber zinc to excessive glutamate release. *Neurochem. Int.*, 50, 322-327 (2007).
- 総説論文
1. Atsushi Takeda and Haruna Tamano: Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency. *Brain Res. Rev.*, 62, 33-44 (2009). 査読有り
 2. 武田厚司, 奥 直人: NMDA 受容体アンタゴニストとしての亜鉛と海馬 LTP. *生体の科学*, 60, 356-357 (2009). 査読なし
 3. 武田厚司: 海馬グルタミン酸作動性神経に対する抑肝散の作用. *脳* 21, 12, 20-23 (2009). 査読なし
 4. 武田厚司: 亜鉛と脳機能. *臨床検査*, 53, 197-201 (2009). 査読なし
 5. Atsushi Takeda: Involvement of zinc in neuronal death in the hippocampus. *Biomed. Res. Trace Elements*, 18, 204-210 (2007). 査読有り
 6. 武田厚司: 脳機能と微量元素. *Clinical Neuroscience*, 25, 868-869 (2007). 査読なし
- [学会発表] (計 58 件)
国内一般講演
掲載省略
- 国際学会一般講演
1. Miki Suzuki, Atsushi Takeda, Haruna Tamano, Naoto Oku, Kazuhiro Sakamoto, Naoto Inui and Hidehiko Yokogoshi: Protective effect of theanine on attenuation of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses after acute behavioral stress. The 2nd International Conference on Health and Longevity Sciences (Shizuoka, Japan) Program and Abstracts, p.42, October 1, 2009.
 2. Atsushi Takeda, Hidehiko Yokogoshi, Naoto Oku: Attenuation of mossy fiber long-term potentiation by acute behavioral stress and effects of zinc and theanine. 1st International Conference on Health and Longevity Sciences (Shizuoka, Japan) Program and Abstracts, p.34, December 18, 2008.
 3. Atsushi Takeda, Masaki Ando, Shingo Kanno, Naomi Sakurada, Naoto Oku: Region-dependent Responses of Extracellular Zinc in the Hippocampus to

- Acute Behavioral Stress. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting (Washington, DC, USA) Program No. 195.7, November 16, 2008.
4. Masaki Ando, Atsushi Takeda, Shingo Kanno, Naomi Sakurada, Naoto Oku: Attenuation of Hippocampal Mossy Fiber Long-term Potentiation by Low Micromolar Concentrations of Zinc. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting (Washington, DC, USA) Program No. 39.12, November 15, 2008.
 5. Haruna Tamano, Atsushi Takeda, Mika Kawamura, Naoto Oku: Increase in depression-like behavior and hippocampal dysfunction in zinc-deficient rats via glucocorticoid hypersecretion. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting (Washington, DC, USA) Program No. 96.2, November 15, 2008.
 6. Hiromasa Itoh, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Involvement of Enhanced Mossy Fiber Exocytosis in Seizure Susceptibility in Zinc Deficiency. Society for Zinc Biology Meeting (Banff, Canada) Abstract Booklet, p.20, February 13, 2008.
 7. Haruna Tamano, Fumika Kan, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Enhancement of aggressive behavior of young mice induced with social isolation in zinc deficiency. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity (Crete, Greece) Final Program 9.S05, Oct. 25, 2007.
 8. Atsushi Takeda, Sayuri Fuke, Naomi Sakurada, Akira Minami, and Naoto Oku: Involvement of zinc in synaptic plasticity and neurodegeneration in the hippocampus via crosstalk with calcium. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity (Crete, Greece) Final Program 9.S03, Oct. 25, 2007.
 9. Shingo Kanno, Naomi Sakurada, Akira Minami, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Unique Response of Extracellular Zinc in the Ventral Hippocampus against Novelty Stress. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity (Crete, Greece) Final Program 9.S01, Oct. 25, 2007.
 10. Mika Kawamura, Haruna Tamano, Hiromasa Itoh, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Increase in depression-like behavior of young rats in zinc deficiency. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity (Crete, Greece) Final Program P-69, Oct. 25, 2007.
 11. Fumika Kan, Haruna Tamano, Hiromasa Itoh, Atsushi Takeda, and Naoto Oku: Preferential dysfunction in the hippocampus in zinc deficiency. A Joint Conference on Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health: Essentiality and Toxicity (Crete, Greece) Final Program P-59, Oct. 25, 2007.
- 招待講演
1. 武田厚司, 不安・恐怖ストレスと亜鉛シグナリング. シンポジウム: 「ニューロメタル研究の最前線」～脳高次機能および脳疾患における金属の役割～. 日本薬学会第130年会(岡山) S30-1, 2010年3月28日.
 2. Atsushi Takeda, Zinc-mediated modulation and disturbance of long-term potentiation in the hippocampus. International Society for Zinc Biology 2009 Meeting (Jerusalem, Israel) December 5, 2009.
 3. 武田厚司, 脳機能発現における金属の役割. 「微量元素と生理機能: メタロミクス研究の新展開」 第20回日本微量元素学会(東京) Biomed. Res. Trace Elements 20, p.154, 2009年7月3日.
 4. 武田厚司, 亜鉛による海馬長期増強のユニークな調節. シンポジウム: 金属による生体制御のニューフロンティア. 日本薬学会第129年会(京都) 要旨集1, p.184 (S26-3), 2009年3月27日.
 5. 武田厚司, 海馬シナプス可塑性における亜鉛の役割. 第1回メタロミクス研究フォーラム(東京) 2008年11月28日.
 6. 武田厚司, 亜鉛イオンによる海馬グルタミン酸作動性神経活動の調節. シンポジウム: 金属の関与する生命科学 -メタロミクス研究の新時代- 最新分析法の開発から創薬、診断、治療へのアプローチ, 日本薬学会第128年会(横浜) 要旨集1, p.171, 2008年3月27日.
 7. Atsushi Takeda, Dynamic zinc movement at the hippocampal synapses and its significance via crosstalk to calcium. International Society for Zinc Biology 2008 Meeting (Banff, Canada) February 11, 2008.
 8. 武田厚司, ジンクシグナリング: 記憶・学習ならびに脳疾患への関与. 京都薬科大学講演会(京都) 2008年1月22日.
 9. 武田厚司, 亜鉛シグナルによる興奮性グルタミン酸作動性神経の調節. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会2007(徳島)講演要旨集, p.33, 2007年9月29日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 厚司

(静岡県立大学・薬学部・准教授)

研究者番号：90145714