

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650193

研究課題名（和文） 不安障害に関わる脳内機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of neuronal basis of anxiety behavior

## 研究代表者

高橋 正身 (TAKAHASHI MASAMI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10318826

## 研究成果の概要（和文）：

てんかん発作の多発後に出現するマウスの不安様行動の発症機序とストレス反応との関連を調べた。不安様行動の発現にはカテコールアミンは関与せず、てんかん発作の多発後の数日間に引き起こされる脳内変化に関わることが明らかとなった。イムノブロットで解析した結果、不安様行動の発症と平行して BDNF の発現が増加することが明らかとなった。不安様行動を示すマウスでは慢性ストレス応答に異常が認められた。

## 研究成果の概要（英文）：

Neuronal mechanism of anxiety behavior observed after having repeated epileptic seizures are investigated using two mouse models. Catecholamine was not involved, but some changes in brain structure that appear within three days after repeated epileptic seizures are responsible for the development of anxiety-related behavior. From immunoblot analysis of brain homogenate, expression of BDNF was paralleled with the expression of anxiety behavior.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学・神経薬理学

キーワード：SNAP-25、ピロカルピン、てんかん、不安様行動、モノアミン、BDNF

## 1. 研究開始当初の背景

恐怖や不安は、外的および内的脅威に適切に対処するために不可欠な機能であるが、それらの発現が不適切に起こると様々な不安障害が引き起こされる。不安障害は生涯の罹患率が15-20%と、最も多い精神疾患の一つであり、その予防方や治療法の開発が急務となっている。不安や恐怖はストレス反応と密接に関係しており、一般に恐怖はストレスラーによって引き起こされるストレス反応として現れる。健全な人は学習を通じてストレス反応を制御することが出来るが、不安障害の患者ではその制御機能に何らかの異常が生

じて不適切なストレス反応が引き起こされていると考えられる。しかし実際にストレス反応系にどのような異常が生じると不安障害が引き起こされるのかについては殆ど明らかにはなっていないかった。

## 2. 研究の目的

強い不安様行動を示す2種類のモデルマウス（SNAP-25 ノックインマウスおよびピロカルピンマウス）を用い、不安様行動の発症機序を探ると共に、ストレス反応との関連を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ノックインマウスの繁殖

ノックインマウスは体外受精を用いて計画的に同腹の野生型およびホモ変異体を出生させ実験に使用した。動物実験および動物の取り扱いについては、北里大学医学部動物実験委員会の審査と学長の承認の下、北里大学動物実験指針を遵守して行った。

#### (2) 行動解析

行動解析は防音室内で 11:00~18:00 の間に行った。ハンドリングは 1 日 1 回 5 分間行い、行動解析までに 3 回行った。明暗選択テストはビーム式小動物行動解析システム (室町機械) を用いて、1 回あたり 30 分間測定を行った。不安様行動の指標として明所移動比率を主要なパラメータとして解析した。オープンフィールドテストは 50 cm x 50 cm の塩化ビニル製の箱内で行った。マウスの行動はオープンフィールド真上に固定されたビデオカメラで撮影し、解析ソフト Lime Light を用いて解析した。不安様行動の指標としては中央移動比率とフリージング時間を主要なパラメータとして解析した。

#### (3) 脳波測定

セボフルランの吸入麻酔下で、皮質脳波記録用ビス電極を頭骨上に、深部電極を海馬に刺入留置し、コネクタに接続後、頭骨に固定した。脳波記録は防音暗箱内 (明期: 午前 8 時~午後 8 時) に設置した直径 30 cm の円形の脳波測定用ゲージでマウスを飼育し、手術直後から約 14 日間連続で行った。マウスの行動は動画と脳波を同時に記録し、発作波や痙攣について解析した。暗期の動画撮影には赤外線光源を用いた。

#### (4) 急性および慢性ストレス反応の測定

急性ストレスとしては、呼吸用の穴を開けた 50 ml のプラスチック遠心管にマウスを閉じ込め 30 分間室温で放置した。慢性ストレス負荷は、急性ストレス負荷を 8 日間連続して行った。急性ストレスをかける前後に日静脈から採血を行い、血中コルチコステロン量を市販の ELISA キットで測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) SNAP-25 ノックインマウスの不安様行動発症機序の解明

SNAP-25 ノックインマウスは不安様行動の他にも、新奇環境下での自発運動や扁桃体でのモノアミンの放出にも異常が生じている。これらの異常行動の発現にモノアミン放出の低下が関わっているかを明らかにするため、シナプス間隙へのカテコールアミン遊離

を引き起こすメタンフェタミンの影響を調べた。

メタンフェタミンを投与すると、野生型マウスでは、新奇環境下での行動時間や行動時の平均速度を顕著に増加させた。それに対して、SNAP-25 ノックインマウスにメタンフェタミンを投与すると、新奇環境下での自発運動の急速な低下や行動時の平均速度の低下が見られなくなるが、不安様行動には有意な影響が見られないことが明らかとなった。さらに同様の作用は、ドーパミン D2/D3 受容体のアゴニストであるキンピロールの投与によっても引き起こされることが分かった。以上のことから SNAP-25 ノックインマウスで見られる自発運動の低下はドーパミンあるいはノルアドレナリンの遊離の低下に起因するが、不安様行動の発現にはこれらのモノアミンが関与する可能性は少ないと考えられた。

SNAP-25 ノックインマウスでは、不安様行動の発症と自発性のてんかん発作が始まる時期がほぼ同時期であったことから、両者の間には何らかの因果関係が存在することが考えられた。この問題を明らかにするため、慢性埋め込み電極を用いた脳波の連続測定とビデオによる行動観察を行った。その結果海馬や皮質でのてんかん発作波は生後 3 週間後に出現したが、全身発作波が多発した 2 日以内に不安様行動が出現することが明らかとなった (図 1)。抗てんかん薬であるバルプロ酸を投与しておくとな不安様行動の発症が著しく抑制されることから、不安様行動の発現には生後発達期でのてんかん発作の多発が関わっていると結論された。

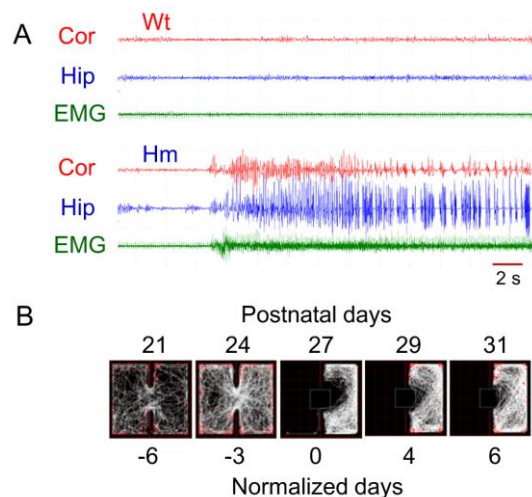


図 1 (A) 野生型マウス (Wt) および SNAP-25 ノックインマウスの脳波。皮質 (Cor) および海馬 (Hip) の脳波と筋電図 (EMG)。 (B) 明暗選択試験の行動軌跡。全身発作が多発した日 (P25) の 2 日後に強い不安様行動が突如出現した。

(2) 不安様行動発症に伴う脳内変化の解明

我々はこれまでにピロカルピン処理条件を変えることで、マウスに可逆的および不可逆的に不安様行動を発症させることができることを明らかにしてきた。不安様行動の発症や消失に伴い、脳内にどのような変化が生じているかを明らかにするため、てんかん重積後様々な日数の海馬のタンパク質量をイムノブロット解析で調べた。グルタミン酸レセプターを始めとする多くのタンパク質の量はてんかん重積後減少したが、調べたタンパク質の中ではGFAPとBDNFのみが増大していた。BDNFの量は不安様行動が見られなくなったマウスでも高いままであったが、BDNFの量は不安様行動を示す時期のみに高いことが明らかとなった。不安様行動の発現にBDNFが関与する可能性が得られたので、BDNFの脳内発現を免疫組織化学によって調べるために不可欠な抗BDNF抗体の作成を行いproBDNF、matureBDNF、panBDNFに対するモノクローナル抗体の作成に成功した。

(3) 不安様行動の発症がストレス反応へ及ぼす影響の解明

強固な不安行動を示す2つのモデルマウス(SNAP-25ノックインマウスおよびピロカルピンマウス)で、ストレス反応に異常が生じているかを明らかにするため、血中コルチコステロンの変動を調べた。正常マウスとSNAP-25ノックインマウスでは平常時や急性拘束ストレスを加えた直後の血中コルチコステロン濃度には有意な差は認められなかった。1日30分間の拘束ストレスを毎日加えた場合、正常マウスでは2週以降に急性ストレス応答が減少したが、SNAP-25ノックインマウスでは1週間後に急性ストレス応答が見られなくなることが明らかとなった。一方不可逆的な不安様行動を生じさせたピロカルピンマウスでは、一部のマウスで急性ストレス反応が消失していることを見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Iida Y, Yamamori S, Itakura M, Miyaoka H, Takahashi M (2013) Protein phosphatase 2A dephosphorylates SNAP-25 through two distinct mechanisms in mouse brain synaptosomes. *Neurosci Res*, 75, 184-189. (査読あり)
- ② Ohira K, Kobayashi K, Toyama K, Nakamura HK, Shoji H, Takao K, Takeuchi R, Yamaguchi S, Kataoka M, Otsuka S, Takahashi M, Miyakawa T.

(2013) Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Mol Brain* 6, 12. (査読あり)

- ③ Nakata Y, Yasuda T, Fukaya M, Yamamori S, Itakura M, Nihira T, Hayakawa H, Kawanami A, Kataoka M, Nagai M, Sakagami H, Takahashi M, Mizuno Y, and Mochizuki H (2012) Accumulation of  $\alpha$ -synuclein triggered by presynaptic dysfunction. *J Neurosci* 32:17186-17196. (査読あり)
- ④ Kataoka M, Yamamori S, Suzuki E, Watanabe S, Sato T, Miyaoka H, Azuma S, Ikegami S, Kuwahara R, Suzuki-Migishima R, Nakahara Y, Nihonmatsu I, Inokuchi K, Katoh-Fukui Y, Yokoyama M, Takahashi M (2011) A Single Amino Acid Mutation in SNAP-25 Induces Anxiety-Related Behavior in Mouse. *PLoS ONE*, 6(9): e25158, 2011. (査読あり)

[学会発表] (計9件)

- ① Yamamori S, Sugaya D, Iida Y, Kokubo H, Itakura M, Suzuki E, Kataoka M, Miyaoka H, Takahashi M, Stress induced phosphorylation of SNAP-25. 北米神経科学学会大会、2012年10月17日、ニューオリンズ(米国)
- ② Ohkido T, Itakura M, Yamamori S, Watanabe S, Miyaoka H, Takahashi M, Calcium-binding protein calretinin is highly expressed in CA3 neurons of epileptized brain in pilocarpine model. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Sep. 30, 2012 Kobe
- ③ 飯田諭宜、小久保宏俊、山森早織、板倉誠、渡辺滋、宮岡等、高橋正身 SNAP-25リン酸化部位変異マウスが示す異常行動の一部には、カテコールアミンが関与する。第35回日本神経科学大会 2012年9月19日 名古屋
- ④ 板倉誠、大城戸太朗、菅谷津貴子、山森早織、深谷昌弘、阪上洋行、高橋正身 ピロカルピンによって誘発されたてんかん重積後に、NMDA型受容体はサブユニット特異的に減少する。第35回日本神経科学大会 2012年9月18日 名古屋

- ⑤ 熊ノ郷晴子、永井利幸、清末和之、高橋正身、小島正己げっ歯類 Bdnf アンチセンス RNA の同定と機能. 第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月 18 日 名古屋
- ⑥ 小島正己、熊ノ郷晴子、永井利幸、高橋正身、清末和之 神経栄養因子プロセッシング障害マウスの解析. 第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月 18 日 名古屋
- ⑦ 飯田諭宜、山森早織、中屋千恵美、板倉誠、宮岡等、高橋正身 SNARE タンパク質 SNAP-25 の脱リン酸化の機構. 第 54 回日本神経化学会大会 2011 年 9 月 27 日 山代温泉
- ⑧ 大城戸太郎、飯塚健、板倉誠、大塚新太郎、渡邊崇嗣、飯田諭宜、高橋正身 不安様行動発現における、BDNF 関与の可能性. 第 54 回日本神経化学会大会 2011 年 9 月 27 日 山代温泉
- ⑨ 大塚新太郎、山森早織、渡辺滋、鈴木映二、斉藤正範、宮岡等、高橋正身 SNAP-25 のリン酸化は生後発達期のてんかんと不安様行動の発症の抑制に關与する. 第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 16 日 横浜

[その他]

<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/edures/biochem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 正身 (TAKAHASHI MASAMI)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号：10318826

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

宮岡 等 (MIYAOKA HITOSHI)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号：40209862

板倉 誠 (ITAKURA MAKOTO)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号：30398581

東 貞宏 (AZUMA SADAHIRO)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：80348507

山森 早織 (YAMAMORI SAORI)

北里大学・医学部・助教  
研究者番号：30464803