

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10182

研究課題名(和文) 幼若期ストレスにより誘発する成熟期情動行動異常の分子基盤解析

研究課題名(英文) Molecular basis of emotional behavior abnormalities induced by juvenile stress

研究代表者

吉田 隆行 (Yoshida, Takayuki)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：60374229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期のストレスによる成熟後の不安障害もしくはうつ様行動に関連する新たな分子・神経回路・行動メカニズムについて、げっ歯類を用いて追究した。幼若期ストレスにより本能的な高所/新奇環境不安レベルの低下、経験依存的な恐怖記憶消去の過剰亢進、社会性不安レベルの低下ならびにうつ様行動の増加が認められた。この幼若期ストレス動物の扁桃体では神経細胞の活動電位の発生頻度の亢進とセロトニンの低感受性が認められた。またケタミンの投与によりうつ様行動の改善がみられ、これには内側前頭前皮質の興奮性と抑制性シナプス入力のパランスの回復が関係している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

不安障害や気分障害は脳内のセロトニンなどのモノアミン系神経伝達物質の低下が原因とする仮説が提唱されているが、本研究では、セロトニン作動性神経調節に加え、グルタミン酸作動性調節が情動機能調節に重要であり、その責任脳部位として扁桃体ならびに内側前頭前皮質における神経伝達修飾メカニズムが関与していることを電気生理学的、神経化学的ならびに行動学的に明らかにした。これは思春/青年期のストレス障害の発症機序ならびに神経精神基盤の成熟に与える影響について新規の分子・神経回路・行動メカニズムとして重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using rodents, we investigated novel molecular, neural circuitry, and behavioral mechanisms related to postmaturity anxiety disorders or depressive like behavior caused by juvenile stress. The juvenile stress was associated with a decrease in instinctive elevated/novel environmental anxiety levels, an excess of fear memory extinction, a decrease in social anxiety levels, and an increase in depressive like behavior. In the amygdala of these juvenile stressed animals, an increased frequency of neuronal action potentials and low sensitivity to serotonin were observed. We also found that ketamine treatment improved depressive behavior, which was related to the restoration of the balance between excitatory and inhibitory synaptic inputs in the medial prefrontal cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：幼若期ストレス うつ様行動 シナプス伝達 活動電位

1. 研究開始当初の背景

研究の動向及び位置づけ

「ストレス社会」といわれる現代社会において不安障害や気分障害などの精神疾患の罹患率は依然として高水準であり、長期休職(学)や自殺の主要因となっている。薬物療法での第一選択薬として用いられる選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)、ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬(NaSSa)は中枢神経系の細胞外モノアミン遊離量を増加させることによって、抗不安、抗うつ作用を発揮するとされ、モノアミン遊離低下が病因であるという「モノアミン仮説」を裏付ける解釈とされることが多い。しかしながら、これらの治療薬を複数用いた累積寛解率は67%であり十分な効果が得られない患者も一定数存在する(Rush et al., 2006より試算)。また、6~11歳の若年期のうつ病患者ではかえって自殺関連事象が増大することも知られ(厚生労働省, 2013)、モノアミン仮説に基づく標準治療薬の効果にも限界があることがうかがわれる。すなわち、モノアミン仮説を超えた**情動の制御メカニズムの再検討**と**思春/青年期と壮年期での機能的差異**について探求する必要がある。

これまでの研究成果

背側縫線核から扁桃体および内側前頭前皮質に投射するセロトニン神経は、抗うつ薬・抗不安薬の主要な標的であり、情動の制御に重要な役割を果たしていると考えられている(Inoue et al., 2004; Izumi et al., 2012)。我々は扁桃体において「**不安や恐怖記憶の消去**」に関連する**特異的な抑制性シナプス**を発見している(Yoshida et al., 2011, PNAS)。このシナプスには**内因性大麻類似物質(カンナビノイド)の合成酵素、受容体、分解酵素**が高密度に配置され、特殊な「**陥入型構造**」を形成し、逆行性にシナプス入力を調節していることを報告した。また続報として、この陥入型シナプスには**コレシストキニン(CCK)**が含有するとともに、**小胞性グルタミン酸トランスポーター3型(VGluT3)**が発現することを報告した(Ohmiya, Yoshida et al., 2015, J Neurosci.)。これらの報告は内因性カンナビノイドがGABAやグルタミン酸などのアミノ酸類ならびにCCKなどの神経ペプチド類の細胞外遊離に対してフィードバック抑制する可能性を示すものである。

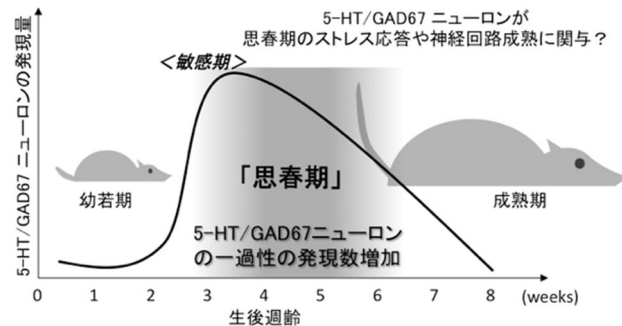
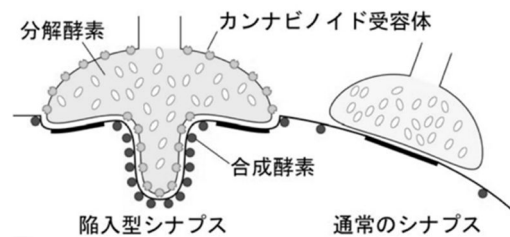
また近年、**GABA合成酵素(GAD67)を有する特殊なセロトニン神経細胞(5-HT/GAD67ニューロン)**がヒトの「**思春期**」に相当するラットの脳内に**一過性に発現し、新奇環境下における軽微な不安ストレスに対して優先的に活動すること**を発見している(Shikanai, *Yoshida et al., J Neuroscience)。これはセロトニンだけでなくGABAが同時に機能している可能性を示すものである。

さらに、本研究の予備的実験検討として、思春期初期に相当する生後3週齢時のげっ歯類に電気ショックを負荷した幼若期ストレスモデル動物を確立し、種々の情動行動異常を見出しつつある。この幼若期ストレスモデル動物は成熟後、本能的な高所/新奇環境不安レベルの低下、経験依存的な恐怖記憶消去の過剰亢進ならびに社会性不安レベルの低下が認められる。生後3週齢時は神経回路の再編に極めて重要である「**敏感期**」であり、この時期のストレスが正常な情動機能発達に影響を与えることを示唆するものであるが詳細なメカニズムは不明である。

以上の研究成果ならびに研究経過をさらに発展させるべく、本研究では不安障害や気分障害の「モノアミン仮説」の論拠となる神経伝達修飾機構を再検討し、カンナビノイド、アミノ酸類および神経ペプチドとの関連を特に扁桃体および内側前頭前皮質にて精査し、思春/青年期ストレスによる不安障害もしくはうつ様行動に関連する新たな分子・神経回路・行動メカニズムを追究することを着想した。

2. 研究の目的

不安障害や気分障害は脳内のセロトニンなどのモノアミン系神経伝達物質の低下が原因とする仮説が提唱されているが、このような精神疾患を有する思春・青年期層にはSSRIなどの抗うつ薬に反応しない患者が一定数存在する。このため、これらの精神疾患の「モノアミン仮説」の範疇を超え、かつ生後発達過程に応じたメカニズム解明が必要である。本研究では、モノアミン/コリン作動性神経系に加え、アミノ酸類および神経ペプチド類に着目し、情動機能調節に重要な脳部位である扁桃体ならびに内側前頭前皮質における神経伝達修飾メカニズムを電気生理学



的、神経化学的ならびに行動学的に検討する。思春/青年期のストレス障害の発症機序ならびに神経精神基盤の成熟に与える影響について新規の分子・神経回路・行動メカニズムを見出すことを目的とする。

思春/青年期における不安や恐怖をコントロールする神経回路基盤は壮年期のそれとは異なる制御機構が存在すると考えられる臨床的傍証は多いものの、その基礎医学研究は少なく、神経科学的メカニズムには不明な点が多い。本研究では、思春/青年期特有のストレス感受性と情動機能発達メカニズムを神経薬理的に理解することを目標とする。また「若年期に内因性カンナビノイドがモノアミン遊離を調節している」という仮説を提唱し、検証を試みる。本計画のように、局所脳部位のモノアミン/コリン遊離を制御する「神経回路メカニズム」ならびに「機能的意義」を若年期の情動機能制御の神経基盤と結びつける研究はこれまでに例が無く、セロトニン遊離の増減と不安の強弱の関係についても解決が期待できる極めて独創的なプロジェクトである。

- (1) 幼若期と壮年期のそれぞれのマウス扁桃体神経細胞におけるセロトニン、神経ペプチド類ならびにカンナビノイド感受性について電気生理学的に解析する。
- (2) 幼若期ストレスモデルにおけるモノアミン作動性神経の変容について免疫組織化学的染色ならびに神経化学的定量によって解析する。
- (3) 幼若期ストレスと壮年期ストレスにおける情動機能変容の差異について前述した不安レベルの評価系を用いて行動学的に解析し、(1)および(2)で述べた手法により定量解析する。

3. 研究の方法

平成28年度の研究計画・方法

平成28年度は上記(1)について取り組むこととした。予備的検討として、幼若期マウスの電気生理学的解析をすでに開始している。一部の結果として、「セロトニンは扁桃体主要錐体細胞に入力する興奮性および抑制性シグナル(それぞれ興奮性シナプス後電流:EPSCと抑制性シナプス後電流:IPSC)を減弱させる」「この抑制性シグナル入力の減弱はセロトニン2受容体を介して生合成される内因性カンナビノイドによって引き起こされる(興奮性シグナル入力が減弱するメカニズムは不明)」「ムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化によっても同様のメカニズムによってシグナル入力が減弱する」の3点を見出している。これらの現象が壮年期マウスにも生じるかどうか検証し、幼若期マウスとの差を比較する。一方、モノアミン/コリンが錐体細胞のアウトプット(活動電位)に与える影響は未検討であるため注力する。現在うつ病を対象とした神経ペプチド受容体をターゲットとする化合物が臨床開発中(phase、phaseまたは承認申請中)である。これらの化合物(コルチコトロピン放出因子1型(CRF1)受容体拮抗薬、オレキシン1および2型受容体拮抗薬、オピオイドμ受容体作動薬)による神経細胞に対する効果を電気生理学的に検証する。扁桃体基底外側核周囲部にはμ受容体を豊富に発現する介在性神経核群が存在し、シグナル伝達を制御する可能性があるため注力する。

平成29年度の研究計画・方法

前述(2)について取り組むこととした。予備的検討として壮年期マウスを実験動物として用いて、モノアミン/コリン作動性神経系の扁桃体における投射パターンを検証している。扁桃体基底外側核の中でも基底核にセロトニン、ドーパミンおよびアセチルコリン神経系の密な神経投射があることを確認している。このことから、まず幼若期マウスのモノアミン/コリンの投射パターンを同様に解析する。また予備的検討として、同じげっ歯類であるラットにおいて、幼若期ストレスによって扁桃体におけるコリントランスポーターの発現レベルが50%程度に半減していることを確認していることから、マウスでも検討する。さらに電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いた脳内微小灌流法による神経化学的定量によって、扁桃体におけるモノアミン/コリン遊離量が幼若期ストレスの有無によって変化している可能性を検討する。

平成30年度の研究計画・方法

前述(3)について取り組むこととした。予備的検討の結果として、幼若期ストレスモデルマウスは本能的な高所/新奇環境不安レベルの低下、経験依存的な恐怖記憶消去の過剰亢進ならびに社会性不安レベルの低下が認められる可能性を見出している。さらにこの幼若期ストレスモデルマウスの扁桃体では神経細胞(錐体細胞)の活動電位の発生頻度が亢進している結果を得ている。このことから平成30年度は、壮年期(生後10週齢)のマウスに電気ショックを負荷し、これを壮年期ストレスモデルとし、不安レベルの評価を高架式十字迷路試験、オープンフィールド試験、恐怖条件付試験ならびに強制水泳試験を行うこととした。

4. 研究成果

平成28年度

幼若期(生後3週齢)と壮年期(生後10週齢)のそれぞれのマウス扁桃体神経細胞におけるセロトニン、神経ペプチドおよびカンナビノイド受容体感受性について電気生理学的に解析することを計画した。幼若期にストレスを負荷されたマウスの壮年期(生後10週齢)における情動機能の行動学的解析と扁桃体神経細胞の活動電位に対するセロトニンの効果について以下のような

結果を得た。幼若期ストレスによって成熟期の扁桃体錐体細胞の活動電位の発生頻度が対照群に比較し有意に増大していた。また、対照群で認められたセロトニン濃度依存的な活動電位発生頻度の増大が幼若期ストレス負荷マウスでは認められず、セロトニンの感受性に差が見られた。

以下の2つの新知見 1)および 2)を得たとともに、計画にはなかった新たな知見として 3)を得た。

- 1) 幼若期ストレスによって成熟期の扁桃体錐体細胞の活動電位の発生頻度が対照群に比較し有意に増大していた。
- 2) 対照群で認められるセロトニン濃度依存的な活動電位発生頻度の増大が幼若期ストレス負荷マウスでは認められず、セロトニンの感受性に差が見られた。
- 3) 幼若期ストレスを受けたラットが成熟期にうつ様行動を示すことを確認し、この症状に対してケタミンの単回投与によって急性に回復効果を発揮した。

幼若期ストレスによって神経細胞の活動電位の発生頻度およびセロトニン感受性に差が見られたことから、今後は興奮性および抑制性シナプス入力強度や棘突起密度や形態変化について解析するとともに、どのようなセロトニン受容体の変容しているのかサブタイプを追求する。また、うつ様行動に対してケタミンが効果的であることを踏まえ、幼若期ストレスによるケタミンの作用機序についても検討することとした。

平成 29 年度

幼若期マウスのモノアミン/コリンの投射パターンを同様に解析するモノアミン/コリン作動性神経系の扁桃体における投射パターンを検証したところ、扁桃体基底外側核の中でも基底核にセロトニン、ドーパミンおよびアセチルコリン神経系の密な神経投射があることを確認した。また、同じげっ歯類であるラットにおいて、幼若期ストレスによって扁桃体におけるコリントランスポーターの発現レベルが 50%程度に半減していることを確認したことから、マウスでも検討したが条件検討に留まった。また、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いた脳内微小灌流法による神経化学的定量によって、扁桃体におけるモノアミン/コリン遊離量が幼若期ストレスの有無によって変化している可能性を検討することを計画していたが、こちらも条件検討に留まった。そのため計画を変更して平成 30 年度計画分の以下の研究を前倒しで行った。幼若期ストレスと成熟期ストレスにおける情動機能変容の差異についてマウスを用いた恐怖・不安レベルの評価系を用いて行動学的に解析することを試み、幼若期ストレスにおける解析を行った。幼若期ストレスモデルマウスは本能的な高所/新奇環境不安レベルの低下、経験依存的な恐怖記憶消去の過剰亢進ならびに社会性不安レベルの低下が認められる可能性を見出し、さらにこの幼若期ストレスモデルマウスの扁桃体錐体細胞の活動電位の発生頻度が亢進している結果を得た。

平成 30 年度

本研究を基課題とする国際共同研究加速基金による課題(幼若期ストレスによって変容する薬物依存性と共感性行動の脳内分子メカニズム解析)について、アメリカ国立衛生研究所に1年間滞在し研究に従事した。本研究の計画実験を高精度に追究できる新規の実験手法ならびに研究材料を得られたことから、平成 31 年度は本補助事業の目的をより精緻に達成するため、以下の研究を計画した。マウスの脳定位固定による標的脳部位への逆行性標識物質およびアデノ随伴ウイルスの局所注入技術を習得し、

- 1) 幼若期ストレスによる内側前頭前皮質(mPFC)背側部に出力する扁桃体基底核ニューロンの電気生理学的特徴の変化とセロトニンによる同ニューロンの活動変化の解析
- 2) 光刺激によって扁桃体基底核内のセロトニン放出を調節することによる条件付恐怖行動の変化
- 3) オキシトシン作動性ニューロンおよびその投射部位とオキシトシン受容体発現ニューロンの分布解析
- 4) オキシトシン作動性神経終末の光刺激抑制による恐怖学習行動の変化と幼若期ストレスによる影響

以上の内容について解析することにより、幼若期ストレスによる情動機能変容の神経回路と関連分子について追究できると考えた。

平成 31/令和元年度

従来麻酔薬として用いられてきたケタミンが有望な抗うつ薬となりうることが近年注目を集めている。グルタミン酸は興奮性シナプス伝達を担うアミノ酸性シグナル伝達物質であり、ケタミンはイオン透過型グルタミン酸受容体の1つである N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の阻害剤として機能する。この NMDA 受容体阻害とケタミン代謝物による作用による抗うつ効果が報告されているものの、その作用機序については不明な点が多かった。そこで幼若期ストレスに起因する成熟期のうつ様行動および神経学的変化をケタミンが回復させる可能性について検討した。生後3週齢にフットショックストレス(幼若期ストレス)を負荷された10週齢の成熟ラットに麻酔域下用量(10 mg/kg)のラセミ体ケタミンを腹腔内投与し、その翌日に各実験を行った。

行動学的研究として行った強制水泳試験の結果、幼若期ストレスに起因する無動時間の増大

をケタミンは有意に減少させた。うつ様行動に関連する脳領域として mPFC に焦点を当て、第 5 層錐体細胞からパッチクランプ記録を行いシナプス電流の解析を行ったところ、ケタミンは幼若期ストレスによって減弱する自発性および微小興奮性シナプス後電流入力回復させた。一方、ケタミンは mPFC の前辺縁 (prelimbic: PL) 領域の 5 層錐体細胞の活動電位頻度を対照群および幼若期ストレス群ともに増大させたが、mPFC の下辺縁 (infralimbic: IL) 領域ではどちらの群にも変化が認められなかった。また、同じ錐体細胞から自発性興奮性シナプス後電流と同抑制性シナプス電流を記録し、興奮性と抑制性の入力バランス (Excitatory/Inhibitory ratio : E/I 比) を解析したところ、ケタミンは幼若期ストレスによって減弱する E/I 比を回復させた。神経形態学的研究として、同錐体細胞の棘突起について解析したところ、ケタミンは幼若期ストレスによって減少する先端樹状突起の棘突起密度を有意に回復した。

以上のことから、麻酔域下用量のケタミンは幼若期ストレスに起因する成熟期のうつ様行動に対して有効であり、これには mPFC PL 領域の 5 層錐体細胞のシナプス入力バランスの回復が関与する可能性が示された。一方で、幼若期にストレスを負荷しなかったラット (対照群) に対してケタミンがうつ様変化を惹起したと IL 領域における役割については現時点では不明であり、今後の研究課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉田隆行
2. 発表標題 幼若期ストレスによる成熟期の情動伝染の変容とマウス脳神経細胞の膜特性変化
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会 幕張メッセ（千葉県・千葉市）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Yoshida
2. 発表標題 Juvenile stress-induced alteration of emotional contagion and intrinsic neuronal membrane plasticity in the mouse brain
3. 学会等名 Neuroscience 2017 ウォルター-Eワシントン国際会議場（ワシントンDC・USA）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田隆行
2. 発表標題 幼若期ストレスによって生じる扁桃体錐体細胞の膜興奮特性の変化
3. 学会等名 第39回日本神経科学学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小冷碧
2. 発表標題 扁桃体基底核錐体細胞に与える幼若期ストレスの影響
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院医学研究院薬理学分野神経薬理学教室
<http://hokudaineuropharmacol.com>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----