

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19700318  
 研究課題名（和文）海馬の広域情報処理機構の解明と脳深部刺激法への応用  
 研究課題名（英文）A comprehensive analysis of principles that underlie information processing by the hippocampal formation, with special reference to psychiatric disorders  
 研究代表者  
 神野 尚三（JINNO SHOZO）  
 九州大学 大学院医学研究院・講師  
 研究者番号：10325524

研究成果の概要：本課題の目標は、海馬の神経回路網の解析によって、精神疾患の新たな治療法である脳深部刺激法を導入するための基盤を確立することである。このために、電気痙攣刺激（ECS）を用いてうつ病治療モデルマウスを作成し、うつ病治療機序における海馬の神経回路網の構造と機能の変化について解析を行った。一連の研究から、ECSによって、海馬のミクログリアの突起密度が減少すること、GABA 合成酵素である GAD65 と GAD67 の発現様式が神経回路特異的に変化することを見出した。また、ECSによって、ミクログリアやアストロサイト、GABA ニューロンの空間分布密度は変化しないことを明らかにした。これらの結果は、うつ病の治療機序において、組織学的細胞構築の変化を伴わない海馬の神経回路機能の可塑的な変化が主座にあることを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,800,000	0	2,800,000
20 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学

キーワード：神経回路網，海馬，精神生理学

### 1. 研究開始当初の背景

海馬は学習や記憶の成立に重要な役割を果たしていると考えられる一方で、精神疾患において様々な異常が報告されている部位でもある。歴史的には、てんかん患者における海馬錐体細胞の脱落とグリオシスによるアンモン角硬化が知られている。また、近年の MRI をはじめとする画像診断技術の発展により、統合失調症患者や大うつ病患者における海馬の体積の減少や形態の変化が報告されている。さらに、病因遺伝子についての研究も徐々に進んできており、海馬における分子レベルの異常が統合失調症の発症に関与しているとする報告もある。

近年、精神疾患に対する新たな治療法とし

て、脳深部刺激法が注目を集めている。この治療法は、外科的に埋め込まれた電極を通して、脳の局所にプログラムされた電気刺激を与えることで、精神症状の改善を図るものである。脳深部刺激法の実用化にあたっては、海馬が標的領域となる可能性が高いが、その広域神経回路網や、精神疾患発症・治療機序との関連については、不明な点が多い。

申請者は研修医として、てんかん性精神病の臨床研究に従事した後、中枢神経系の神経回路網の構造と機能についての基礎研究に取り組んできた。さらに、これらの研究を発展させるために、精神疾患治療機序における海馬の広域神経回路網の可塑的な変化を解析する本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

### (1) ECS によるうつ病治療機序と海馬のグリア細胞の形態学的変化についての研究

近年の研究により、かつてはニューロンの補助的な役割を果たしていると考えられてきたグリア細胞が、実際にはニューロンの活動性に大きな影響を与えていることが徐々に明らかにされている。とりわけ、アストロサイトやミクログリアが、glutamate や ATP を介して、シナプスの伝達効率の可塑的な制御に関与している可能性には大きな注目が集まっている。また、グリア細胞と精神疾患の関連も指摘されるようになってきている<sup>2)</sup>。これまでに、アストロサイトやミクログリアから放出される炎症性サイトカインがうつ病患者において増加していたことや、うつ病患者の死後脳でミクログリアの活性化が認められたことなどが報告されている。

その一方で、精神疾患の分子基盤としてのグリア細胞の研究はまだ端緒にすぎたばかりである。このため本研究では、マウスに電気痙攣療法刺激 (ECS; 電気痙攣療法の動物実験モデル) 与え、海馬のグリア細胞に生じる形態学的変化を検討することを計画した。歴史的には、電気痙攣療法 (ECT) は 1930 年代からうつ病や統合失調症の治療のために用いられてきた。再発のリスクはあるものの、その有効率は高く、薬物療法よりも即効性がある。現在も、治療抵抗性のうつ病患者の治療には不可欠の選択肢になっている (The UK-ECT, 2003)。本研究の目的は、ECS によるグリア細胞の形態学的ダイナミクスの解析から、精神疾患におけるグリア細胞の役割についての知見を得ることである。

### (2) ECS によるうつ病治療機序と海馬の GABA ニューロンの機能的変化についての形態学的研究

GABA は中枢神経系の代表的な抑制性神経伝達物質である。GABA を伝達物質とするニューロンは、GABA ニューロンと呼ばれ、学習や記憶、情動行動など、脳の多様な機能において重要な役割を果たしていることが知られている。Ramón y Cajal が 1911 年に、ニューロンの形態学的な多様性を報告して以来、多くの研究によって、GABA ニューロンの形態学的、電気生理学的、神経化学的な多様性が報告されてきた。さらに近年の研究によって、GABA ニューロンの特定のサブタイプが、脳の様々な活動に対して特異的に関与していることが明らかにされつつある。

その一方で、中枢神経系における GABA ニューロンの機能異常は、さまざまな精神疾患や神経変性疾患に関係することが報告されている。これまでに、てんかん、気分障害、統合失調症や、パーキンソン病などについて、

多くの臨床的、基礎的な研究がなされてきた。精神疾患と GABA ニューロンの関係については、主としてうつ病との関連で注目が集まっている。うつ病と GABA ニューロンの機能異常が初めて指摘されたのは 1980 年である。それ以来、気分障害と GABA の関係については、いくつかの報告がなされている。例えば、複数の臨床研究で、うつ病患者の血清や脳脊髄液、脳組織における GABA レベルの低下が示されている。死後脳の研究では、うつ病患者における GABA 合成酵素の活性が低下していることが明らかにされている。その一方で、抗うつ剤の内服は、脳内の GABA レベルを上昇させることも示されている。また、電気痙攣療法を受けたうつ病患者において、皮質の GABA レベルの増加が認められている。これらの報告によって、うつ病についての研究は、従来のモノアミン仮説に基づくものから、GABA を中心とする神経回路の機能的な障害の解析にシフトしつつある。しかしながら、うつ病と GABA ニューロンの機能的な変化については、現在も不明な点が多い。本研究の目的は、海馬の GABA ニューロンに焦点を当て、うつ病治療プロセスにおける GABA 合成酵素 (GAD65 と GAD67) の発現様式の変化と、広域神経回路との関係を解明することである。

## 3. 研究方法

### (1) ECS によるうつ病治療機序と海馬のグリア細胞の形態学的変化についての研究

オスマウス (C57BL/6J) に耳介クリップを装着し、電気痙攣刺激 (100 V, 60 Hz, 2 sec) を与え、約 10 秒間自持続する強直間代痙攣を確認した。マウスは急性 ECS 群 (単回の ECS 施行; n = 18)、慢性 ECS 群 (1 日 1 回、連続 8 日間の ECS 施行; n = 19)、コントロール群の三群に分け、それぞれ 24 時間、1 週間、1 カ月の生存期間において灌流固定を行った。次に、背側海馬と腹側海馬のビブラトーム切片を作成し、免疫蛍光二重染色を行った。ミクログリアの分子マーカーには ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1)、アストロサイトの分子マーカーには S100B を使用した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、海馬の各領域 (CA1, CA3, dentate gyrus) から、光学切片のスタックをランダムに取り込み、以下の解析を行った。

- ① Optical disector 法を用いて、ミクログリアとアストロサイトの空間分布密度の定量を行い、電気痙攣刺激が与える影響を調べた。
- ② 画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて、ミクログリアの突起密度と、アストロサイトの表面積を定量化し、電気痙攣刺激による変化を調べた。

## (2) ECS によるうつ病治療機序と海馬の GABA ニューロンの機能的変化についての形態学的研究

上記と同様の方法で電気痙攣刺激を与えた。マウスは対照群 (n = 5), 一回刺激群 (n = 5), 反復刺激群 (一日一回, 連続 8 日間; n = 6) の三群に分けて解析を行った。対照群はシャム操作を行ってから 24 時間, 一回刺激群は刺激を行って 24 時間, 反復刺激群は最後の刺激を行って 1 週間の生存時間を設けた灌流固定の後, 腹側海馬の 40 μm の連続切片をピプラトームにより作成した。本実験で腹側海馬に焦点を当てたのは, 情動行動への関係が指摘されているためである。

GAD65 と GAD67 に対する免疫蛍光二重染色の後, 共焦点レーザー顕微鏡による観察を行い, 以下の解析を行った。

① 画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて, 電気痙攣刺激によって, GAD65 と GAD67 の免疫強度がどのように変化するかを, 定量的に解析した。

② オプティカルダイセクター法により, GAD65 / GAD67 陽性の細胞体をカウントし, 海馬の領域, 層毎に空間分布密度の測定した。さらに, GABA ニューロンにおける発現率を計算し, ECS による変化を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) ECS によるうつ病治療機序と海馬のグリア細胞の形態学的変化についての研究

#### ① 海馬の Iba1 と S100β の免疫反応性

急性 ECS 施行 24 時間後のマウス海馬では, Iba1 陽性の細かいミクログリアの突起が著しく減少していた (図 1)。細かい突起は, 急性 ECS 施行 1 ヶ月後には回復していた。慢性 ECS を与えた場合, ミクログリアの突起の減少は, 施行後 1 ヶ月経っても持続していた。S100β 陽性のアストロサイトの突起には, ECS による変化は認められなかった。

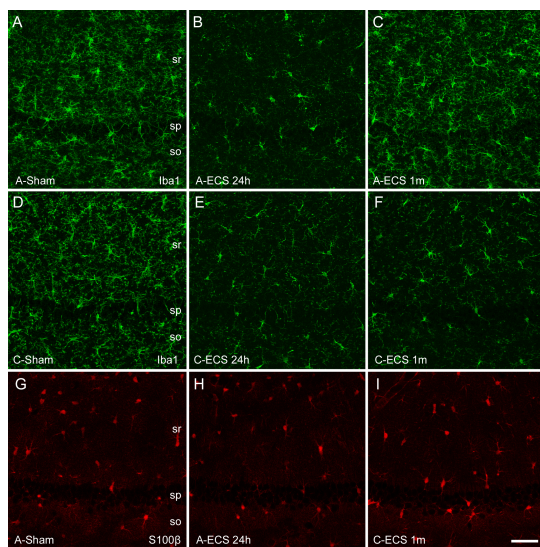


図 1. (海馬 CA1 領域における Iba1 (A-F) と S100β (G-I) の分布様式の変化)

#### ② ECS によるミクログリアの形態学的変化

コントロール群では, ミクログリアは細く高度に分枝した突起と小型の細胞体を示した (図 2)。しかしながら, 急性 ECS 施行 24 時間後のマウスでは, 大部分の細い突起が消失していた。細胞体の大きさや, 一次突起の本数に変化は認められなかった。この変化は慢性 ECS を施行した場合, 1 ヶ月後も持続していた。

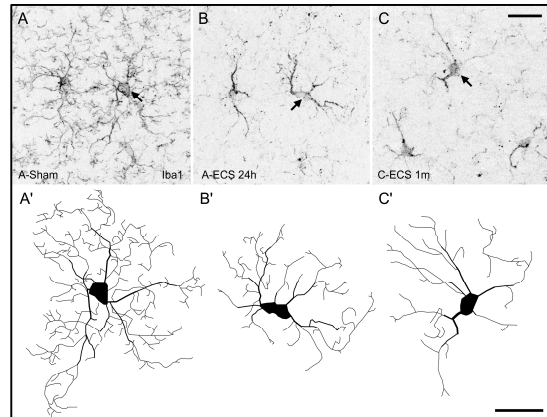


図 2. (ECS によるミクログリアの突起の形態変化)

#### ③ ミクログリアとアストロサイトの形態計測解析

ミクログリアの突起密度は, 急性 ECS 施行 24 時間後に有意に低下していた (図 3A,B)。しかし 1 ヶ月後には有意な差は認められなくなった。慢性 ECS を施行すると, 1 ヶ月後でも突起密度は有意に低下していた。アストロサイトの表面積は, ECS による変化は認められなかった。

#### ④ ミクログリアとアストロサイトの空間分布密度解析

Optical disector 法により, ミクログリアとアストロサイトの空間分布密度の定量を行ったが, いずれも ECS による変化は認められなかった (図 3C,D)。

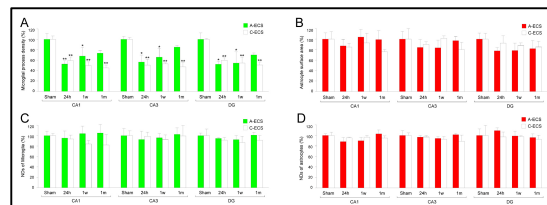


図 3. (ミクログリアとアストロサイトの形態計測解析と空間分布密度解析)

#### ⑤ 考察

本研究で得られた最も重要な結果は, ミクログリアの突起が ECS によって有意に退縮す

ることである。ミクログリアの突起は伸長と退縮を常に繰り返すことで、脳の局所環境のサーベイランス活動を活発に行っている。すなわち、ECSによる突起の退縮はサーベイランス活動性の低下に繋がる可能性がある。

一方、精神疾患とグリア細胞の関連については、これまで主として炎症性サイトカインとの関連で研究が進んできている。例えば、うつ病患者において、interleukin-1 (IL-1), IL-3, IL-6, tumor necrotic factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などのレベルが高いことが示されている。培養系での実験であるが、ミクログリアに抗うつ剤を暴露させると、IL-1 や IL-6 の産生が低下するとの報告もある。これらから、ミクログリアの突起の退縮を伴う形態学的変化が、サイトカイン産生の抑制を介して ECT の抗うつ作用に関与している可能性もある。

最近の報告により、電気痙攣療法によって、NG2 陽性細胞の増殖が起こることが示されていること示されている。しかし、本研究では、ミクログリアとアストロサイトの空間分布密度に変化は認められていない。NG2 陽性細胞の一部はアストロサイトになると考えられており、ECSによるグリア細胞の増殖の問題については、さらなる検討が必要である。

## (2) ECS によるうつ病治療機序と海馬の GABA ニューロンの機能的変化についての形態学的研究

① 海馬の GABA 合成酵素 (GAD) の免疫強度は、電気痙攣刺激によって変化する。

GAD67 の発現強度は、電気痙攣刺激による変化は認められなかったが、GAD65 の強度は、反復刺激群で有意な増強が認められた (図 4A,B)。カーブフィットによって、対照群で認められる GAD65 の発現レベルが低い細胞体のピークが、反復刺激群では消失することが明らかになった (図 4C,D)。

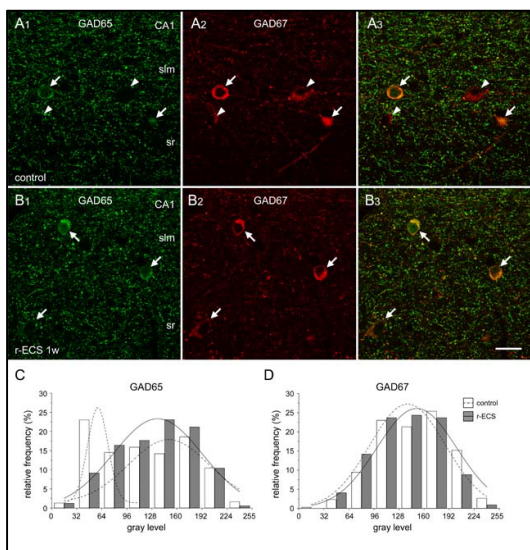


図 4. (ECSによる GAD65/67 に対する免疫反応性の変化)

② 海馬の GABA ニューロンにおける GAD65 と GAD67 の発現率は、ECS により変化する。

オプティカルダイセクター法による解析では、GABA ニューロン全体の空間分布密度 (GAD65 and/or GAD67 陽性) や、GAD67 陽性ニューロンの分布密度には、電気痙攣刺激による変化はほとんど認められなかった。これに対し、GAD65 陽性ニューロンの密度は、反復刺激後に CA1 の網状分子/放線層で有意に増加していた。

これらの結果から、海馬の GABA ニューロンにおける GAD65, GAD67 の発現率を計算した (図 5)。反復刺激によって、嗅内皮質から海馬への主要な興奮性入力を受ける CA1 の網状分子/放線層や歯状回の分子層における GAD65 の発現率が有意に増加していた。その一方で、GAD67 の発現率は一回刺激によって、青斑核からノルアドレナリン性の入力を受ける CA3 の網状分子/放線層で有意に減少していた。GAD の発現率の増減は GABA ニューロンの機能を変化させると考えられる。本研究の結果は、海馬の広域神経回路特異的に生じる GABA ニューロンの機能的な変化が、ECT によるうつ病の治療基盤に関与している可能性を示唆している。

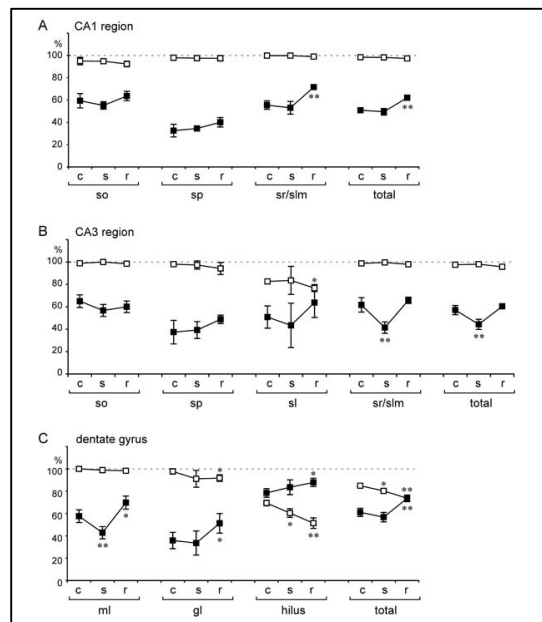


図 5. (ECSによる GAD 発現率の変化。□は GAD67, ■は GAD65)

## 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 10 件)

- (1) JINNO S, Kosaka T, Neuronal circuit-dependent alterations in expression of two isoforms of glutamic acid decarboxylase in the hippocampus following electroconvulsive shock: A stereology-based study. *Hippocampus*, 2009. (in press)
- (2) Wake H, Moorhouse AJ, JINNO S, Kohsaka S, Nabekura J, Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, 29: 3974-3980, 2009.
- (3) JINNO S, Araki K, Matsumoto Y, Suh YH, Yamamoto T, Selective apoptosis induction in the hippocampal mossy fiber pathway by exposure to CT105, the C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein. *Brain Research*, 1249: 68-78, 2009.
- (4) Yamada J, Hayashi Y, JINNO S, Wu Z, Inoue K, Kohsaka S, Nakanishi H, Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. *GLIA*, 56(13): 1448-1462, 2008.
- (5) JINNO S, Kosaka T, Reduction of Iba1-expressing microglial process density in the hippocampus following electroconvulsive shock. *Experimental Neurology*, 212(2): 440-447, 2008.
- (6) Fuentealba P, Begum R, Capogna M, JINNO S, Márton LF, Csicsvari J, Thomson A, Somogyi P, Klausberger T, Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron*, 57(6): 917-929, 2008.
- (7) 神野尚三, 空間解析による中枢神経系の機能的構造の解明. *顕微鏡*, 43(4): 233-237, 2008.
- (8) 神野尚三, Stereology による新たな神経科学研究基盤の確立. *福岡医学雑誌*, 99(8): 169-74, 2008.
- (9) JINNO S, Fleischer F, Eckel S, Schmidt V, Kosaka T, Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *GLIA*, 55(13): 1334-1347, 2007.
- (10) JINNO S, Klausberger T, Marton LF, Dalezios Y, Roberts JD, Fuentealba P, Bushong EA, Henze D, Buzsáki G, Somogyi P, Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J Neurosci*, 27(33): 8790-8804, 2007.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 神野尚三, マウス海馬主細胞の組織学的構築には長軸方向による差異が存在する. 第 114 回日本解剖学会・全国学術集会. 2009. 3. 岡山
- (2) 神野尚三, 電気痙攣刺激による GABA 合成酵素 (GAD65/67) の発現様式の変化: 海馬の構造的可塑性と精神疾患治療機序の解明. 第 64 回日本解剖学会・九州支部学術集会. 2008. 10. 福岡
- (3) 神野尚三, 海馬における 2 つの GAD isoform の発現様式に電気ショックが与える影響についての解剖学的検討. 第 31 回日本神経科学大会. 2008. 7. 東京
- (4) 神野尚三, 中枢神経系における形態学的定量解析の基礎と応用. 第 10 回ブレインサイエンス研究会. 2008. 6. 芦屋
- (5) 神野尚三, 電気痙攣刺激が海馬のグリア細胞に与える影響の形態学的検討. 第 113 回日本解剖学会・全国学術集会. 2008. 3. 大分
- (6) 神野尚三, ステレオロジー法を用いた中枢神経系の構成要素の空間分布解析. 第 51 回日本顕微鏡学会・シンポジウム. 2007. 10. 徳島

[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

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K000949/education.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

神野 尚三 (JINNO SHOZO)

九州大学 大学院医学研究院・講師

研究者番号: 10325524

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし