

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390309

研究課題名(和文) 縫線核 5-HT/GABA 共存ニューロンの発現・発達におよぼす幼若期 ストレスの影響

研究課題名(英文) Effects of early postnatal stress on the development of 5-HT/GABA co-localized neuron in the raphe nuclei.

研究代表者：

吉岡 充弘 (YOSHIOKA Mitsuhiro)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40182729

研究成果の概要(和文)：

情動に関わっている背側縫線核(DRN)におけるセロトニン(5-HT)含有神経細胞の多くが GABA を含有している。これら古典的な神経伝達物質が共存する意義やその役割・機能は全く明らかになっていない。そこでこの共存神経細胞の機能解析と、発達、幼若期におけるストレスの影響を検討した。DRN には 5-HT 合成酵素 TPH2 mRNA と GABA 合成酵素 GAD67 mRNA の共存ニューロンが存在することを single-cell RT-PCR 法によって明らかにした。5-HT/GAD67 ニューロンでは同時に 2 つの神経伝達物質を遊離しておらず、活動電位の振幅が 5-HT 単独含有細胞より小さく、発射頻度も低い特性を有していることや幼若期のストレスはこの共存細胞の発達を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We characterized 5-HTergic neurons that also contained GAD67 compared to neurons containing only 5-HT through electrophysiological, molecular biological and neuroanatomical methods. We confirmed tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) mRNA and GAD67 mRNA co-expression in the DRN via in situ hybridization and single-cell RT-PCR methods. We also demonstrated that GABA is not released into the synaptic cleft of these neurons. In the electrophysiological experiment, we found that the action potential amplitude, membrane resistance and firing frequency of both TPH2 and GAD67 mRNA-positive neurons were all significantly lower than in neurons that were positive for TPH2 mRNA only. An early postnatal stress disturbed the development of TPH2 and GAD67 mRNA-positive neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：精神薬理学

1. 研究開始当初の背景

ニューロンはそのすべてではないが、ひとつ以上の神経伝達物質/神経調節因子を遊離するものが知られている。その多くはいわゆる classical な神経伝達物質（グルタミン酸、GABA、ACh、noradrenalin、dopamine、serotonin など）とニューロペプチド、成長因子などの神経調節因子を産生し、遊離する。これらの共伝達（co-transmission）システムを有するニューロンに加えて、複数の classical な神経伝達物質が軸索終末で共存するニューロン（グルタミン酸/GABA）が報告されている。しかしながら、神経伝達物質遊離の negative/positive feedback システムとしての機能が想定されているが、その発生学的意義や本質的機能については不明である。最近、我々もセロトニン（5-HT）と GABA について、それらが共存する知見を得た。中枢神経系に存在する 5-HT 作動性神経はその多くが「縫線核」と呼ばれる正中線上に位置する核群から、ほぼ脳内全域にその軸索を投射している。主な機能としては投射部位における脳機能の円滑な処理および調節と自律神経系反応の情動的性格づけを担っている。そのような縫線核のうち最大の組織学的構造をなす背側縫線核（dorsal raphe nucleus: DRN）における 5-HT 含有ニューロンのほとんどが GABA を共存していることを免疫組織学的に明らかにしている。

しかし、投射先での複数の vesicle の存在は確認できていない。そもそも、セロトニン作動性神経や GABA 作動性神経というように <作動性> という名称がそのニューロンの phenotype を表現していた。複数の物質の遊離を行うニューロンにおいても、主従関係が存在するとの仮定から、classical な神経伝達物質がそのニューロンの phenotype と考えられてきた。しかし、これまで、複数の classical な神経伝達物質が軸索終末で共存するニューロンが存在することが示され、主従関係を越えた機能の可能性を推察させている。また、グルタミン酸/GABA 共存ニューロンは発達の過程で活動依存性にそのニューロンの phenotype が変化する、可塑的な能力を有する可能性が示唆されている。複数の神経伝達物質は何のために存在しているのか？そこで本研究では、縫線核に存在する GABAergic phenotype を有する 5-HT ニューロンに焦点をあて、その発生・発達学的変化と機能的役割について追究する。5-HT と GABA の共存ニューロンは、抗不安薬の作用機序にも深く関係すると考えられる。すなわち、

GABA 作動性神経系に作用する benzodiazepine 類、5-HT_{1A} 受容体に作用する tandospirone はいずれも不安障害に有効とされる。これらのことから、GABA および 5-HT の機能的な関連が推定される。また、申請者はこれまでストレスと 5-HT 作動性神経系の発達への影響を報告してきた。ストレスと情動障害との関連性を発達期の縫線核の 5-HT 陽性細胞の変化として捉えている。すなわち、ストレスにより、縫線核のニューロン脱落が生じるのである。これは 5-HT 系にとどまらず、GABA 系の変化が情動障害の背景に存在することを推測させる。

2. 研究の目的

情動に深く関わっている背側縫線核（DRN）におけるセロトニン（5-HT）含有神経細胞の多くが GABA を含有している。これら古典的な神経伝達物質が共存する意義やその役割・機能は全く明らかになっていない。そこで、この共存神経細胞の機能解析と、発達、幼若期におけるストレスの影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) Fluorescent in situ hybridization (FISH) 法による mRNA 発現解析

生後 3-4 週齢の雄性 Wistar ラットを pentobarbital (60 mg/kg, i. p.) で深麻酔し、断首により放血させ、脱脳後、即座にドライアイスで凍結させ、-80°C で保存した。保存した脳から、厚さ 20 μm の凍結切片を作製し、300 ng/mL の fluorescein または digoxigenin で標識した glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) および tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) cDNA に対する antisense riboprobe を加え、組織内 mRNA とハイブリダイズさせた。検出方法には一段階目に peroxidase-conjugated 抗 fluorescein 抗体および FITC-TSA plus amplification 抗体を、2 段階目に peroxidase-conjugated 抗 DIG 抗体および Cy5-TSA plus amplification kit を用いた。Peroxidase の残存活性は 0.6 %H₂O₂ に 30 分間 incubation することで取り除いた。FISH の特異性は sense probe を用いて確認した。

(2) 免疫組織化学的解析

生後 3-4 週齢の雄性 Wistar ラットを、pentobarbital (60 mg/kg, i. p.) で深麻酔し、4% paraformaldehyde 含有 0.1M リン酸緩衝

液で左心室から灌流後、即座に脱脳した。取り出した脳を30% sucrose 含有0.1Mリン酸緩衝液で置換し-80°Cで凍結させ、厚さ30 μ mの凍結切片を作製した。作成した切片は、10% ロバ血清でblockingした後、1次抗体として、モルモット抗5-HT transporter (HTT) 抗体、およびヤギ抗 vesicular inhibitory amino acid transporter (VIAAT) 抗体を24時間反応させ、翌日ロバ抗モルモット Cy3-conjugated 抗体、またはロバ抗モルモット Alexa 488-conjugated 抗体を2次抗体として用いて標識し、共焦点レーザー顕微鏡による免疫蛍光顕微鏡解析を行った。

(3) 電気生理学的ならびに分子生物学的解析

生後3-4週齢の雄性 Wistar rat を diethylether 吸入麻酔し、外科用ハサミですばやく断頭した。即座に頭蓋を剥離し、脳から縫線核を含む脳領域を外科用メスでトリミングして、氷冷および95% O₂ 5%CO₂の混合ガスでバブリングした cutting solution (in mM: 215 Sucrose, 2.5 KCl, 4 MgCl₂, 4 MgSO₄, 1 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 1.6 NaH₂PO₄, 20 glucose) で還流しながら、厚さ300 μ mの急性冠状断スライスを作製した。作成したスライスは、スポイトで回収し、cutting solutionと人工脳脊髄液 (aCSF; in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 20 glucose, pH 7.4) を1:1に混合した液体に、37°Cで30分間 incubation した。30分後、cutting solution と aCSF を1:9に混合した液体に37°Cで1時間 incubation した。Incubation 後、whole-cell patch clamp 法を用いて、背側縫線核ニューロンの膜電位を測定し、電気生理学的特性を解析した。実験に使用した記録電極は3~6 M Ω の電極抵抗のものを用いた。また電極内液の組成は次のものを使用した (in mM: 6 KCl, 130 KD-gluconate, 10 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 0.16 CaCl₂, 2MgCl₂, 4Na-ATP, 0.4 Na-GTP, pH 7.3)。Whole-cell recording に成功後、膜電位を-70 mV に固定し、current-clamp mode に変更して capacitance compensation および bridge balance の調整後、細胞膜電位を測定した。電極内液と aCSF との間の liquid junction potential は10mVであった。電気生理学的記録後、ガラス管電極内を陰圧にし、記録ニューロンの細胞質を回収した。この回収液中に含まれる mRNA を鋳型として、単一細胞 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を行い、TPH2, GAD67 および VIAAT の mRNA 発現解析を行った。PCR コントロールとして、neuron specific enolase (NSE) の mRNA を用いた。この結果をもとに、記録ニューロンを「5-HT ニューロン」と「5-HT/GAD67 ニューロン」に分類して、得られた電気生理学的データを統計学的に解

析した。

(4) 幼若期ストレス負荷

脳内で5-HT神経系が完成する3週齢時に電撃ショックを負荷し、幼若期ストレスモデルを作製し、上記と同様の免疫組織学的実験を行った。

4. 研究成果

5-HT合成酵素であるTPH2とGABA合成酵素であるGAD67のそれぞれのmRNAの発現解析を行った。TPH2 mRNAはDRNのlateral wing, dorsal parts, ventral partsに強く発現しており、また正中縫線核 (median raphe nucleus: MRN)、線状核 (B9 parts) にも発現していた。GAD67 mRNAはDRNのmidline, dorsal parts および ventral parts には発現しておらず、lateral wing および、縫線核外につよく発現していた。TPH2 mRNA および GAD67 mRNA は細胞核の周辺に発現しており、細胞質に存在している。一部、TPH2 mRNA と GAD67 mRNA は同一の1つの細胞に存在していた、つまりDRNのlateral wingには、TPH2 mRNA と GAD67 mRNA の共存ニューロンが存在することが確認された。

またこの初見は、single-cell RT-PCR 法によっても確認された。解析した全ニューロンに対する割合はそれぞれ TPH2 単独陽性ニューロンが55.3% (21/38 cells), TPH2 および GAD67 両陽性ニューロンが21.1% (8/28 cells)であった。加えて、5-HT/GAD67 ニューロンは、神経伝達物質 GABA のシナプス間隙への遊離に必要な VIAAT の mRNA が検出されなかった。また、DRNからの5-HTergic neuronの投射先である、内側前頭前野、後内側腹側核およびDRN内での5-HTnegic neuron 終末では、HTT と VIAAT のタンパク共発現は認められなかった。

電気生理学的解析では、5-HT/GAD67 ニューロン、5-HT ニューロンのそれぞれにおいて、action potential (AP) amplitude, AP duration, afterhyperpolarization, resting membrane potential を測定した。AP amplitudeの数値はそれぞれ、5-HT/GAD67 ニューロン: 73.21 \pm 3.45 mV, 5-HT ニューロン: 84.51 \pm 2.13 mV であり、5-HT/GAD67 ニューロンの AP amplitude が有意に小さい値を示した (Student's t-test, F 1, 27 = 0.22, P<0.05)。他のパラメーターには差は認められなかった。さらに、current を段階的に injection した時の membrane resistance および firing frequency を測定した。5-HT/GAD67 ニューロン、5-HT ニューロンの膜抵抗値はそれぞれ、9.86 \pm 1.32 M Ω , 16.10 \pm 1.99 M Ω であり、5-HT/GAD67 ニューロンの膜抵抗値が有意に低い値を示した。

(two-way ANOVA, $F_{1,27} = 42.21$, $P < 0.05$). またそれぞれのニューロンの firing frequency は、いずれの強度の injection current においても、5-HT/GAD67 ニューロンが 5-HT ニューロンに比較して、有意に低い値を示した (two-way ANOVA, $F_{1,27} = 24.33$, $P < 0.05$).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Tsutsui-Kimura I, Yoshida T, Yoshioka M.: The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the ventral hippocampus is involved in the retrieval of fear memory through the corticotropin-releasing factor type 2 receptor. *Neuropsychopharmacology*. (査読有) 2010; 35(6):1271-8.

2. Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M.: Nicotine provokes impulsive-like action by stimulating alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in the infralimbic, but not in the prelimbic cortex. *Psychopharmacology (Berl)*. (査読有) 2010; 209(4):351-9.

3. Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M.: Endogenous acetylcholine modulates impulsive action via alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in rats. *Eur J Pharmacol*. (査読有) 2010; 641(2-3):148-53.

4. Ohmura Y, Yamaguchi T, Futami Y, Togashi H, Izumi T, Matsumoto M, Yoshida T, Yoshioka M.: Corticotropin releasing factor enhances attentional function as assessed by the five-choice serial reaction time task in rats. *Behav Brain Res*. (査読有) 2009; 198(2):429-33.

5. Matsuzaki H, Izumi T, Matsumoto M, Togashi H, Yamaguchi T, Yoshida T, Watanabe M, Yoshioka M.: Early postnatal stress affects 5-HT(1A) receptor function in the medial prefrontal cortex in adult rats.

Eur J Pharmacol. (査読有) 2009; 615(1-3):76-82.

6. Koseki H, Matsumoto M, Togashi H, Miura Y, Fukushima K, Yoshioka M.: Alteration of synaptic transmission in the hippocampal-mPFC pathway during extinction trial of context-dependent fear memory in juvenile rat stress models: Simultaneous electrophysiological and

behavioral analysis. *Synapse*, (査読有) 2009; 63(9):805-13.

7. Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M.: The effects of serotonin and/or noradrenaline reuptake inhibitors on impulsive-like action assessed by the three-choice serial reaction time task: a simple and valid model of impulsive action using rats. *Behav Pharmacol*. (査読有) 2009; 20(5-6):474-83.

[学会発表] (計 3 件)

1. 今野幸太郎, 松本真知子, 泉剛, 富樫廣子, 吉田隆行, 山口拓, 長谷川宏幸, 渡辺雅彦, 吉岡充弘: 成熟ラットにおける正中縫線核 5-HT 神経および GABA 神経機能に及ぼす幼若期ストレスの影響, 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同年会 神戸コンベンションセンター (9. 2-4, 2010)

2. 鹿内浩樹, 吉田隆行, 今野幸太郎, 泉剛, 山口拓, 吉岡充弘: 縫線核 5-HT/GAD67 共発現ニューロンの細胞学的特性, 第 24 回北海道薬物作用談話会 北海道大学学術交流会館 (7. 24, 2010)

3. M. Yoshioka, Early postnatal stress disturbs normal development of the serotonergic neurons in the raphe nuclei, 9th World Congress of Biological Psychiatry, Paris (6. 28-7. 2, 2009).

[その他]

ホームページ等

<http://hokudaineuropharmacol.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡充弘 (YOSHIOKA Mitsuhiro)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 40182729

(2) 研究分担者

山口拓 (YAMAGUCHI Taku)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 80325563

泉剛 (Izumi Takeshi)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 60312360

吉田 隆行 (YOSHIDA Takayuki)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60312360

(3) 連携研究者
()

研究者番号：