

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07972

研究課題名(和文) グリア型グルタミン酸トランスポーター発現減少に起因するうつ症状の神経基盤の解明

研究課題名(英文) Investigating the neural mechanisms underlying depressive symptoms associated with the reduced expression of the astrocytic glutamate transporter.

研究代表者

高橋 弘 (Takahashi, Kou)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：20415582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ストレス負荷が特定の脳領域の神経活動に影響するかを明らかにすることを目的とする。急性ストレス負荷と慢性ストレス負荷したマウスの全脳領域のc-fos発現を解析し、うつ症状の神経基盤を解明する。

急性ストレス負荷により脳全体的に神経活動の亢進が観察された。特に視床下部室傍核、手綱核、扁桃体などの領域で神経活動が変化していた。慢性ストレス負荷は、EAAT2減少が認められる前帯状皮質、内側前頭前野などの領域で興奮性ニューロンの神経活動を変化させた。これらの研究は、うつ症状の発症に関わる脳内機序の一端を明らかにし、新しい抗うつ薬の開発につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病は、社会経済の損失が大きい疾患である。また、うつ病は、抑うつ気分・興味の消失・焦燥感・遂行能力低下・不安などの様々な症状で構成されており、病態を正確に捉えることが困難な疾患である。うつ病の発症にはストレスが関与しており、本研究ではストレスによる脳内の神経活動を明らかにすることを目的としている。

本研究では、マウス脳内での急性ストレスと慢性ストレスの神経活動を全脳を対象に解析を行った。ストレスに関連する脳領域の同定や脳内連関の変化などを明らかにした。これらは、うつ症状の発症に関与すると考えられ、新しい抗うつ薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to determine whether stress affects neural activity in specific brain regions. To elucidate the neural basis of depressive symptoms through the analysis of c-fos expression in the entire brain of mice subjected to acute and chronic stress.

Acute stress increased neural activity in multiple brain regions throughout the brain. Neural activity was particularly altered in areas such as the hypothalamic paraventricular nucleus, habenular nucleus, and amygdala. Chronic stress induced changes in the activity of excitatory neurons in regions such as the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex, where a decrease in EAAT2 has been observed. These studies are expected to clarify a part of the brain mechanism involved in the development of depressive symptoms and lead to the development of novel antidepressants.

研究分野：ストレス

キーワード：ストレス 神経活動

1. 研究開始当初の背景

うつ病は、DALY (障害調整生命年: 障害のため失われた健康的な生活年数) で3位に位置し、2030年には1位になると予想されており、社会経済の損失が大きい疾患である。また、うつ病は、抑うつ気分・興味の消失・焦燥感・遂行能力低下・不安などの様々な症状で構成されており、病態を正確に捉えることが困難な疾患である。うつ病の発症は、双生児研究から遺伝的要因より環境的要因が深く関与しており、この環境要因として特にストレスが重要である。

一方、脳内で神経活動を高める興奮性の神経伝達物質は、主にグルタミン酸である。神経終末から放出されたグルタミン酸は、シナプス間隙に代謝酵素がないため、グリブ型グルタミン酸トランスポーター(EAAT2: Excitatory amino acid transporter 2)の取込により、濃度を厳密に制御されている¹。このEAAT2は、急性ストレスで発現が上昇し、うつ病患者及び慢性ストレスモデル動物で発現が減少することが報告されている²⁻³。従って、急性ストレスでは、過剰のグルタミン酸を発現上昇したEAAT2により効率的に減少させて、シグナルを調節している。しかし、慢性ストレスでは、EAAT2発現が低下し、シナプス間隙のグルタミン酸濃度を上昇させ、興奮毒性による神経可塑的变化(シナプス減少など)を引き起こし、通常とは異なる神経活動により、うつ病を発症させると考えられる。

そこで、急性ストレス負荷と慢性ストレス負荷でどのような脳内の神経活動を示すかを明らかにすることで、うつ病の病態解明につながると考える。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス負荷が特定の脳領域の神経活動に影響するかを明らかにすることを目的とする。1) EAAT2が発現上昇する急性ストレス負荷時の神経活動を明らかにする。2) EAAT2発現減少が認められる慢性ストレス負荷時の神経活動を明らかにする。また、神経活動は、興奮性ニューロンと非興奮性ニューロンに分けて解析する。これらにより、ストレス負荷が脳全体にどのように影響しているかを明らかにし、うつ症状の神経基盤を解明する。

3. 研究の方法

1) ストレス負荷モデル動物の作成

急性ストレスマウスモデルは、環境に馴化させたマウスに1時間の拘束ストレスを負荷して作成した。慢性ストレスマウスモデルは、表面妥当性、構成概念妥当性、薬効予測妥当性に優れた、慢性社会的敗北うつ病モデルマウスを用いた。攻撃性の高いマウス(ICR)と通常のマウス(C57BL)を一つのケージに、一定時間(5-10分間)入れると、喧嘩してC57BLマウスは敗北する(直接刺激)。次に、喧嘩しないように、穴の空いた透明な仕切り板で、別のICRマウスとC57BLマウスを分けて飼育し、攻撃は出来ないが音や匂いなどの感覚刺激を与える(間接刺激)。この2つの刺激を10日間繰り返すことでC57BLマウスは、うつ症状を呈するようになる。

2) 神経活動の解析

脳内の神経活動を明らかにするため、最初期遺伝子であるc-fosの発現について全脳領域にわたって免疫染色法により解析を行なった。さらに、慢性ストレス負荷群は、神経活動を興奮性ニューロンと非興奮性ニューロンに分けて検討した。具体的には、慢性社会的敗北うつ病モデルマウスを作成し、神経活動の指標であるc-fosとグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーであるGls(Glutaminase)について多重染色を行った。Gls陽性ニューロンを興奮性ニューロンの活動として解析した。

4. 研究成果

1) 急性ストレス負荷後の脳内神経活動:

急性ストレス負荷後の神経活動について全脳領域を対象に検討した。具体的には、1時間の拘束ストレス後に神経活動の指標である c-fos の発現を免疫染色法により検討した。ストレス負荷により脳全体的に c-fos の陽性細胞の増加が認められ、多くの脳領域で神経活動の亢進が観察された(図1)。特に視床下部室傍核、手綱核、扁桃体などの領域で神経活動が変化していた。これらの脳部位は、3時間の拘束ストレス負荷モデルでも c-fos の上昇が報告されている⁴。従って、これらの領域は急性ストレス負荷において重要であると考えられる。実際、視床下部室傍核は、コルチコトロピン放出ホルモンを分泌する神経が存在し、ストレス応答である HPA 系(視床下部-下垂体-副腎系)の中心である。また、扁桃体は、恐怖や不安などに関連する脳部位で、急性ストレスで EAAT2 の発現上昇が認められている。EAAT2 発現上昇により、扁桃体の神経に対して興奮性のグルタミン酸刺激が過剰にならないような機構が作動していることが推察される。

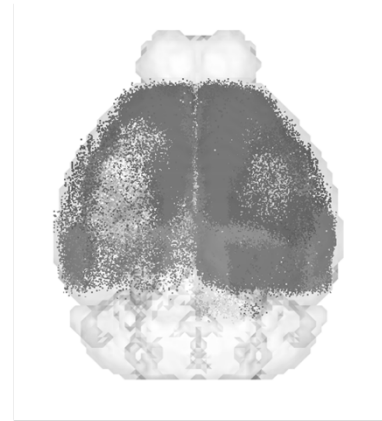


図1 急性ストレス後のc-fos発現
拘束ストレス後のc-fos発現をコントロール(左脳)と拘束ストレス負荷(右脳)に分けてプロットした。

2) 慢性ストレス負荷後の脳内神経活動:

慢性ストレス後の神経活動について全脳領域を対象に検討した。具体的には、慢性社会的敗北うつ病モデルマウスを作成し、c-fos とグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである Glu について多重染色を行った。各脳領域で認められる c-fos 陽性細胞を興奮性ニューロンと非興奮性ニューロンに分類して解析した(図2)。その結果、運動野、味覚野、嗅結節、前帯状皮質、側坐核、尾状核・被殻、内側前頭前野の前辺縁皮質、下辺縁皮質、背側脚皮質、蓋紐などの領域で慢性ストレスによる興奮性ニューロンの神経活動の変化が認められた。これらの領域は、以前に行われた慢性ストレスモデルマウスでの c-fos 発現を検討した研究結果と類似していた^{5,6}。今回は、その神経活動が認められたニューロンが興奮性を示すことが明らかとなった。また、慢性ストレスで前帯状皮質や内側前頭前野は EAAT2 の減少が認められている。非興奮性ニューロンの神経活動が、興奮性ニューロンと同様の挙動を示す・逆の挙動を示す・ストレスで影響を受けないなど領域ごとで異なる特徴が認められた。このことは、c-fos 発現変化が興奮性や抑制性などの様々な性質の神経活動を検出しており、細胞の特徴付けをすることで、より正確な脳内活動を知ることが可能になることを示唆している。さらに、大脳皮質は異なる役割を持つ6つの層から構成されているが、慢性ストレス

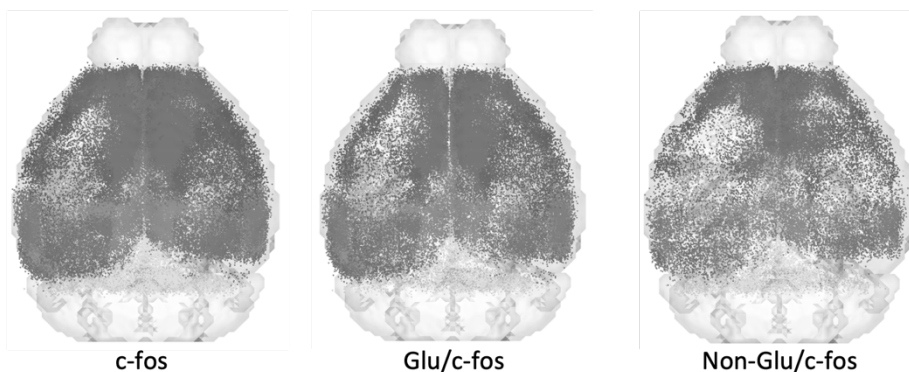


図2 慢性ストレス後のc-fos発現

コントロールマウス(左脳)と慢性社会的敗北うつ病モデルマウス(右脳)のc-fos発現をプロットした。さらに、グルタミン酸作動性ニューロンと非グルタミン酸作動性ニューロンを分けてプロットした。

負荷により脳の領域ごとに異なる層の神経活動が認められた。次に、各脳領域で認められるc-fos陽性細胞数に関して相関解析を行い脳領域間のパターンを解析した。その結果、大脳領域内での神経活動の連関がストレスにより低下し、脳幹領域内の神経活動連関が亢進した(図3)。これにより、高次の脳と低次の脳との機能スイッチがストレス応答に重要であることが示唆された。

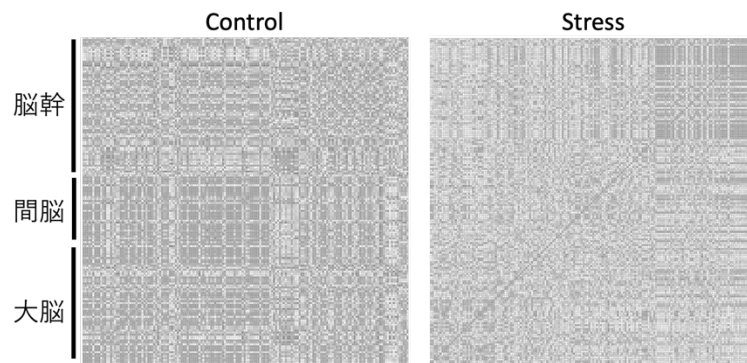


図3 慢性ストレス負荷後の神経活動における脳領域間の相関解析
コントロールマウスと慢性社会的敗北うつ病モデルマウスについて、各脳領域のc-fos陽性細胞数の相関を解析した。コントロールでは大脳・間脳の領域で強い相関があるが、ストレスでは脳幹の領域で相関が認められた。

本研究により、うつ症状の発症に関わるストレス応答の脳内機序の一端を明らかにした。今後、より高空間分解能の解析を行うことで、うつ病発症の脳内分子機序が解明され、新しい抗うつ薬の開発につながることを期待される。

1. Takahashi K, Foster JB, Lin CL. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell Mol Life Sci.* 2015, 72(18):3489-506.
2. Rajkowska G, Stockmeier CA. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets.* 2013, 14(11):1225-36.
3. Sanacora G, Banasr M. From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2013, 73(12):1172-9.
4. Kim W, Chung C. Brain-wide cellular mapping of acute stress-induced activation in male and female mice. *FASEB J.* 2021, 35(12): e22041.
5. Laine MA, Sokolowska E, Dudek M, Callan SA, Hyttiä P, Hovatta I. S Brain activation induced by chronic psychosocial stress in mice. *Sci Rep.* 2017, 7(1):15061.
6. Numa C, Nagai H, Taniguchi M, Nagai M, Shinohara R, Furuyashiki T. Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex. *Sci Rep.* 2019, 9(1):16670.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	由利 和也 (Yuri Kazunari) (10220534)	高知大学・医学部・名誉教授 (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関