

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16614

研究課題名（和文）GABAアンタゴニスト投与による抗不安作用の検証

研究課題名（英文）Pentylentetrazole kindling induces dynamic changes in anxiety-like behaviors

研究代表者

梶田 裕貴 (Kajita, Yuki)

東北大学・医学系研究科・助手

研究者番号：00791849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ペンチレンテトラゾール（PTZ）を用いたキンドリングは、短期間で、一過性に痙攣抵抗性を誘導したが、長期間投与すると痙攣抵抗性は消失した。痙攣抵抗性を示したラットの海馬CA1では、ソマトスタチン陽性細胞においてGAD65が増加した一方で、GAD67、GABA受容体やトランスポーターには顕著な変化は見られなかった。長期間投与ではGAD65発現はコントロール群と同程度まで戻った。行動実験では短期間のPTZ投与で不安様行動が減少していることが、オープンフィールド試験、明暗箱試験、高架式十字迷路試験で、明らかになった。この抗不安効果は長期投与後では見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本来てんかん原生の獲得や不安様行動の増加に働くと思われるPTZキンドリング刺激が短期間では寧ろ、痙攣抵抗性や抗不安効果をもたらすことが明らかになった。これは臨床でうつ病治療などに用いられる電気痙攣療法に似た現象と考えられる。電気痙攣療法は抗うつ薬などで効かない重篤なうつ病患者に用いられる有効な治療法ではあるが、その作用機序は分かっていない。今回、我々が見つけたソマトスタチン陽性細胞におけるGAD65発現の増加はその機序解明の足掛かりになると考えられる。また、同療法によるてんかん事故などを防ぐためにも有用である。

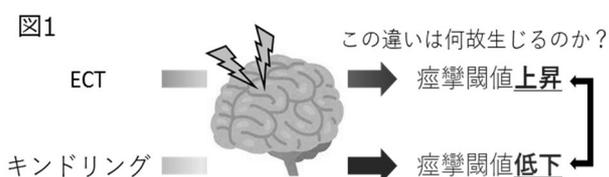
研究成果の概要（英文）：Pentylentetrazole (PTZ) induced kindling led to transient seizure resistance states after short-term, but the seizure resistance disappeared after long-term administration. In the hippocampal CA1 region of rats after short-term kindling (with seizure resistance states), GAD65 expression increased in somatostatin-positive inhibitory neurons, whereas GAD67 and GABA receptors and transporters did not significantly change. After long-term kindling, GAD65 expression returned to the same level as in the control group. Behavioral experiments revealed that short-term PTZ kindling reduced anxiety-like behaviors in the open field, light/dark box, and elevated cross maze tests. This anxiolytic effect was not detected after long-term kindling.

研究分野：神経科学

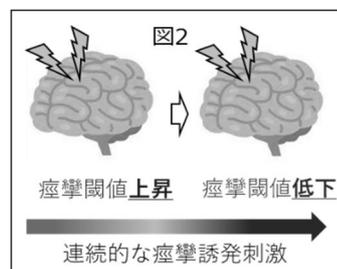
キーワード：GABA てんかん ソマトスタチン キンドリング 不安 行動実験 ラット

### 1. 研究開始当初の背景

投薬による治療効果が乏しい難治性精神疾患の患者に対する治療として電気痙攣療法 (ECT) が存在する。ECT とは経皮的に頭部に通電を行い、脳に人工的な痙攣を誘発、これを数日間繰り返すことで抗うつや抗不安効果を得る治療である。日本では、九州大学の安河内と向笠により開始された後急速に広まり、現在でも修正型 ECT として、臨床で一般に用いられている治療法である (安河内、向笠. 福岡医大誌. 1939; 本橋ら. 精神神経学雑誌. 2013)。一方でキンドリング現象と呼ばれる癲癇の動物モデル作成のため確立された実験手法がある (Goddard et al., *Exp Neurol*. 1969)。キンドリングは数日間、脳に人工的な (電気、薬物、光遺伝学など) 痙攣閾値以下の刺激を繰り返す手続きを行う。しかしながら、ECT では刺激を繰り返していくと痙攣抵抗性が上がる (痙攣誘発閾値の上昇) ことが報告されているが (Bajbouj et al., *J Psychiatr Res*. 2006)、キンドリングでは刺激を繰り返していくと痙攣抵抗性が下がり (痙攣誘発閾値の低下) 次第に重篤な痙攣を起こすようになることが報告されている。以上のように ECT とキンドリングはそれぞれ、痙攣閾値の上昇と低下を引き起こすが、何故そのような違いが生まれるかは不明である (図 1)。



ECT とキンドリングの刺激回数の違いから、申請者は、刺激を繰り返していく過程で「痙攣閾値増加 (抗痙攣状態) 痙攣閾値低下 (易痙攣状態)」のような連続的な双方向の変化が起こるのではないかと仮説を立てた (図 2)。ECT 後の自発痙攣発作が国内で (山本ら、電撃療法後における自発てんかん発作の臨床的研究. 1961)、海外で (Walter, *The British Journal of Psychiatry*, 2018) 報告されていることも、ECT とキンドリングが引き起こす現象が連続した脳内変化であることを示唆している。

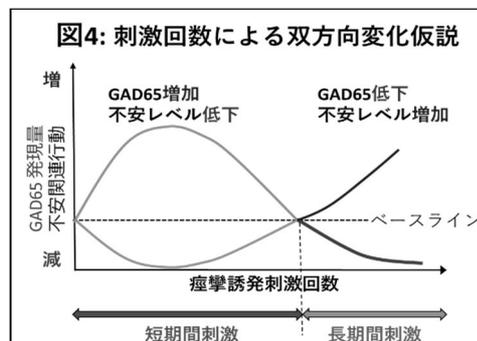


GABA による抑制性神経調節はうつ、不安などの精神疾患や癲癇発作と関係していることから、ECT やキンドリングによる脳内変化の一因であることが予想される。ECT を短期間の刺激、キンドリングを長期間の刺激に置き換えて考えてみると、短期間の刺激では GABA 合成が増加し、逆に長期間の刺激後では GABA 合成が減少していると予想される。実際に、うつ病患者の大脳皮質で減少した GABA が、ECT 後に増加することや (Sanacora et al., *Am J Psychiatry*. 2003)、マウスで数日間の電気刺激後に海馬において GABA 合成酵素 (GAD65) が増加することが分かっている (Jinno and Kosaka, *HIPPOCAMPUS*. 2009)。一方でキンドリングマウスの海馬では GAD65 が減少することが報告されている (Hao et al., *Med Sci Monit*, 2016)。また、GABA は不安様行動と深く関係しているため、不安レベルは短期間の刺激後に減少し、長期間の刺激後では増加していることが予想される (図 3)。こちらも実際に ECT により、不安障害モデルマウスの不安関連行動が低下し (Jonckheere et al., *Brain Stimulation*, 2018)、キンドリングマウスでは増加していることが報告されている (Albertini et al., *Epilepsia*, 2018)。



### 2. 研究の目的

本計画では同一の刺激方法、強度、頻度を用いることで、刺激回数による違いのみで GABA 関連タンパク (特に GAD65) と不安レベルを双方向へ変化させることが出来るか検証する (図 4)。具体的には、短期間の刺激で GABA 関連タンパクが増加し、不安レベルが下がるのか、また長期間の刺激で GABA 関連タンパクが減少し、不安レベルが上がるかを、組織学的解析、及び行動学的解析から検証する。



ECT とキンドリングはどちらも広く研究されているテーマであるが、それぞれを切り離して考えた先行研究が多く、その連続性の可能性に着目した研究はない。申請者の目的は痙攣誘発刺激が回数依存的に GABA 抑制系や不安行動への双方向の変化を引き起こすのかを検証することである。具体的には以下の 2 点の解明を動物実験により目指

す。

実験 1：短期と長期の痙攣誘発刺激が引き起こす抑制性細胞に与える影響の違い

実験 2：短期と長期の痙攣誘発刺激が引き起こす不安関連行動の違い

### 3. 研究の方法

痙攣誘発剤 [ペンチレンテトラゾール(PTZ)：GABA アンタゴニスト] を 48 時間間隔で投与していき、各注射後の痙攣の強度を Racine の分類に基づき、分類した。短期刺激で痙攣ステージが抑制され、長期刺激で重篤な痙攣が誘発されるのかを検証した。

実験 1：短期と長期の刺激から 24 時間後の脳を取り出し、GABA 関連タンパク発現量の変化を免疫組織化学的手法で測定した。

実験 2：実験 1 と同様の処置を行い、それぞれの刺激から 1 週間後に不安関連行動を測定した。<ラット痙攣誘発> PTZ を 40 mg/kg で腹腔内投与した。対象群には生理食塩水を同量投与した。痙攣ステージの判断のため投与後 1-2 時間、行動を観察した。

<発現量計測> 免疫組織化学染色により海馬 CA1 領域の GABA 関連タンパク (GABA、GAD65、GAD67、VGAT、GABA<sub>A</sub> 受容体、GABA<sub>B</sub> 受容体) の発現を調べた。また有意な変化が見られたタンパクを抑制性細胞のサブタイプ別 (パルプアルブミン陽性細胞、ソマトスタチン陽性細胞、カルレチニン陽性細胞、コレシストキニン陽性細胞) で計測した。

<不安関連行動測定> 痙攣による短期的な記憶障害の影響を避けるため最終投与から 1 週間後に行動実験を行った。オープンフィールド試験、明暗箱試験、高架式十字迷路試験を用いて不安関連行動を計測した。

### 4. 研究成果

実験 1：PTZ 刺激回数に伴い、二峰性の痙攣ステージの変化が確認された。6 回目の刺激で最初の痙攣ステージのピークが見られたが、その後徐々にステージは減少した。この減少は 10 から 14 回目の刺激後で顕著であった。15 回目の刺激以降、再び痙攣ステージの増加が始まり、20 回の時点で、刺激を終了した。以上から、10 回で痙攣誘発刺激に対して抵抗性を獲得したことが分かった (図 5)。20 回ではステージが 3 までしか上がらず一般的な癲癇原生の獲得の定義には至らなかった。

PTZ 刺激 10 回と 20 回後の 24 時間後に脳の海馬 CA1 領域における GABA 関連タンパクの発現を調べた。その結果、GAD65 発現が刺激 10 回後で一過性に上昇していることが分かった。この GAD65 発現の上昇はソマトスタチン陽性細胞でのみ確認された。また、各 GABA サブタイプの細胞数に変化は無かった。

実験 2：PTZ 刺激 10 回と 20 回のそれぞれ 1 週間後に不安関連行動を測定した。オープンフィールド試験では中心滞在時間、明暗箱試験では明箱への滞在時間、高架式十字迷路試験ではオープンアームへの滞在時間を測定した。その結果、10 回では不安関連行動はコントロール群に比べて、有意に増加しており、不安関連行動が減少していることが分かった。一方 20 回では、この不安関連行動の低下はコントロール群と同程度まで戻っていた。

10 回刺激後における各ラットのデータを Zスコアへ変換し、痙攣ステージと相関を調べたところ有意な負の相関が見られ、痙攣が抑制された個体では不安関連行動も減少していることが、明らかになった (図 7)。

本研究に置いて、PTZ 刺激は回数依存的に、痙攣抵抗性を増減させることが分かった。また、それは海馬のソマトスタチン陽性細胞における GAD65 発現増加を介した抑制入力の増強が関与している可能性が示唆された。今後、この経路の詳細を更に明らかにするには、GABA 細胞以外の役割も検証していく必要がある。

図5: 10回の刺激で、一過性の痙攣抵抗性が確認された

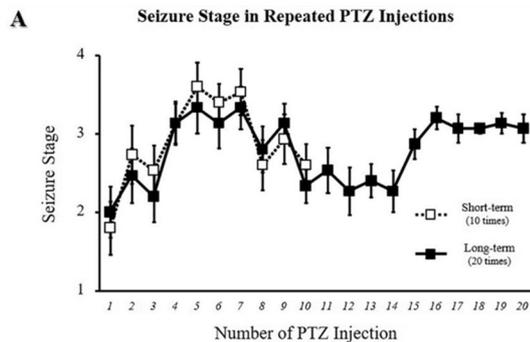


図6: PTZ10回の刺激後に、ソマトスタチン陽性細胞において一過性のGAD65増加が確認された

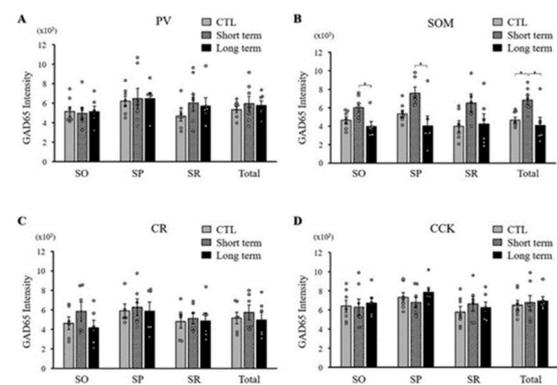
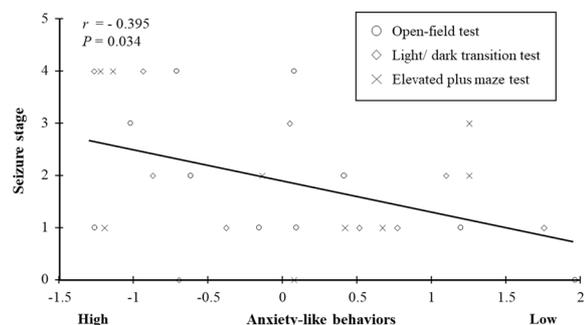


図7: 痙攣ステージと不安レベルに負の相関が確認された



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kajita Yuki, Mushiake Hajime	4. 巻 15
2. 論文標題 Heterogeneous GAD65 Expression in Subtypes of GABAergic Neurons Across Layers of the Cerebral Cortex and Hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 750869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2021.750869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Kajita, Yuki Fukuda, Riho Kawamatsu, Takanori Oyanagi, Hajime Mushiake	4. 巻 239
2. 論文標題 Pentylentetrazole kindling induces dynamic changes in GAD65 expression in hippocampal somatostatin interneurons	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pharmacology Biochemistry and Behavior	6. 最初と最後の頁 173755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbb.2024.173755.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kent Takabayashi, Yuki Kajita, Hajime Mushiake
2. 発表標題 幼児期ストレスの時期特異性という新たなリスク因子の解明
3. 学会等名 第93回日本動物学会 早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Kajita, Yuki Fukuda, Riho Kawamatsu, Takanori Oyanagi, Hajime Mushiake
2. 発表標題 The increase of GAD65 expression by PTZ stimulations occurs specifically in SOM-positive interneurons.
3. 学会等名 第99回日本生理学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Kajita, Yuki Fukuda, Takanori Oyanagi, Riho Kawamatsu, Hajime Mushiake
2. 発表標題 Dynamic changes in GAD65 expression in somatostatin-positive interneurons during the acquisition of generalized epileptic seizures
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Fukuda, Yuki Kajita, Takanori Oyanagi, Riho Kawamatsu, Hajime Mushiake
2. 発表標題 Dynamic changes in GAD65 expression in PTZ kindling rats
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Kajita, Kent Takabayashi, Hajime Mushiake
2. 発表標題 Temporal and sex-specific effects of childhood stress on depression-like behavior in adolescence
3. 学会等名 第46回日本神経科学会
4. 発表年 2023年

〔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

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
---------	---------