

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 9 月 24 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21591484

研究課題名（和文） 発達早期の社会的ストレスが辺縁系 GABA 性神経系機能に及ぼす影響に関する研究

研究課題名（英文） The effects of early maternal separation followed by social deprivation on the development and function of GABAergic system in the limbic structures.

研究代表者

鳥取大学・医学部・教授 兼子 幸一（KANEKO KOICHI）

研究者番号：50194907

研究成果の概要（和文）：発達早期の社会的ストレスが辺縁系 GABA 系の機能や社会行動に及ぼす影響をラットで検討した。特定サブタイプの GABA 性細胞の増加が辺縁系で認められた。社会行動では ano-genital sniffing が増加傾向を示した。他方、辺縁系領域で記録した自発性抑制性シナプス後電流には変化がなかった。以上より、発達早期の社会的ストレスは、GABA 系以外のメカニズムによって社会行動に影響する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To test the hypothesis that social stress of neonatal maternal deprivation followed by social isolation affects social behavior-relevant physiological functions of specific subclasses of GABAergic interneurons in the limbic structures, early stress-related changes in the expression levels of calcium binding proteins, social behaviors and the activity of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) were investigated for Wistar rats. Early social stress was found to elevate the expression levels of parvalbumin (PV) in basolateral amygdala and II/III layers of medial prefrontal cortex, whereas those of calretinin (CR) and calbindin (CB) showed no changes in the limbic structures. Ano-genital sniffing behavior, one test for social interaction test, tended to increase in the neonatally stressed animals. Electrophysiological measurements of GABAergic interneurons assessed by the mean amplitude and the frequency of sIPSCs recorded from principal neurons in the limbic regions, however, did not show any difference between the stressed group and control non-stressed group. These results suggest that early social stress produces altered social behavior via mechanisms other than those involving GABAergic interneurons

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神生理学

## 1. 研究開始当初の背景

対人関係をはじめとする社会的ストレスは、ストレス関連疾患の病因として重要であるばかりでなく、統合失調症、気分障害においても、これらの疾患に起因するストレス脆弱性のために病状増悪の誘因になりうる。近年、発達早期に個体が経験する多様なストレスが、ストレスを受ける時期よりも時間的には後である思春期以降に発症する、広汎な精神疾患に対する脆弱性を高める可能性が特に注目されている。

社会的ストレスの一種である、発達早期の母子分離は、成熟後の内側前頭前皮質(以下 mPFC と略記)で、モノアミン系投射線維の密度減少、GABA 細胞の特定サブタイプの密度上昇を起こす。このような辺縁系に生じる長期的な構造変化はストレス脆弱性の生物学的基盤として想定されている。しかし、こうした形態的变化に比べて、社会的ストレスが脳機能に及ぼす影響は殆ど知られていない。特に、精神疾患に対する脆弱性に関係するとされる辺縁系の局所神経回路に対して、ストレスがもたらす生物学的効果に関する研究は少ない。社会的ストレスを受けた動物では脳構造が変化するため、辺縁系で GABA 細胞系機能が変化する可能性がある。近年、統合失調症、双極性気分障害、ストレス関連障害等の病態で GABA 性神経系の機能異常が想定されており(Benes and Beretta, 2000; Lewis et al, 2005)、サブタイプ毎に異なる機能をもつ多様な抑制系に対する社会的ストレスの影響はストレス脆弱性と関係する可能性があり、その研究は臨床的意義をもちうる。

## 2. 研究の目的

「発達早期の社会的ストレス(母子分離と社会的隔離の組合せ)は、成熟ラット脳の前頭前皮質、扁桃体の GABA 作動性抑制性神経系の神経活動に機能変化をもたらす」という仮説を立て、発達早期の社会的ストレスが、社会的行動および GABA 性神経系に与える影響を検討することが本研究の主目的である。

具体的には、GABA 作動性神経細胞(以下 GABA 細胞と略記)の機能の生理学的指標及び神経化学的マーカーを測定、解析する。また、social interaction test (Cirulli et al., 1996)を用いて、社会的行動の変化を検討する。特に本研究では、神経修飾因子に対する感受性の変化が起こる GABA 細胞サブタイプを特定し、その結

果から辺縁系神経回路の機能変化の意味を考察することを目的としている。

## 3. 研究の方法

鳥取大学動物実験規則を遵守して実験を行った。

### ①使用動物

本研究には妊娠した Wistar 系雌性ラットを用い、雄性仔ラットに対して、発達早期および離乳期以降の2時期に、下記の通りの異なる社会的ストレスを加えた。

### ②社会的ストレス

Braunらの方法(Braun et al., 2000)に若干の修正を加え、生まれた雄性仔ラットを、生後 3~21 日目まで、1日3回、各1時間ずつ母から分離する。離乳後は生後 22 日~40 日まで、それぞれを単独飼育し、社会的隔離を行う。これに対して、対照群には、社会的ストレスを与えず、通常の養育環境で飼育する。

### ③行動実験

social interaction test (Cirulli et al., 1996): 生後 45 日に飼育ケージと同型のケージに、社会的ストレスを加えた雄性ラット、あるいは対照群の雄性ラット、および、これと同週齢で実験的操作を全く経験していない別腹の雄性ラットの合せて2匹を30分間入れて行動観察を行う。この間の行動をビデオ記録し、探索行動(非社会的行動)及び ano-genital sniffing, mutual circle(いずれも社会的行動)にの頻度を各々測定し、2群の群間比較を行った(Spear, 2000)。

### ④電気生理学的実験

生後 41 日目に、社会的ストレスを加えた雄性ラットおよび対照群ラットに対して、エーテルを用いて深麻酔を加え、痛覚刺激が完全に消失したことを確認した後に断頭する。迅速に脳を取り出し、4°Cの人工脳脊髄液(ACSF: 組成  $\text{Na}^+$  125 mM,  $\text{K}^+$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  26 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  2.5 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  1.2 mM, glucose 10 mM;これを通常 ACSF とする)で冷却後、扁桃体 BLA あるいは mPFC を含んだブロックを、両側について作成する。この脳ブロックから、ヴィブラトームで厚さ 300  $\mu\text{m}$  の冠状断スライスを作成する。作成したスライスは濾紙に載せ、通常 ACSF を浸し、95% $\text{O}_2$ -5% $\text{CO}_2$  の混合ガスで満たしたガラス濾過器に入れ、最低 90 分間回復させ、スライスパッチクランプ法を用いて単一細胞からの電気記録を行った。

記録電気生理的記録にはアンプリファイアー EPC-9 (HEKA 社, 独)を用い, 電位固定あるいは電流固定の各モードで記録を行い, アンプの制御はソフトウェア Pulse(HEKA 社, 独)で行った。データを 3 kHz のフィルターにかけ, サンプリング時間は, 目的に応じて, 250  $\mu$ s (4 kHz)または 50  $\mu$ s(20 kHz)とした。全細胞記録で得たデータはパソコンのハードディスクに記録した。

#### 1) 解析対象とする電気生理学的指標

a. グルタミン作動性錐体細胞からの記録による GABA 性神経伝達に対する社会的ストレスの影響の間接的検討

社会的ストレスとの関係が想定されている辺縁系 BLA あるいは mPFC で, グルタミン酸作動性の錐体細胞から電位固定モードで全細胞記録を行い, 自発性抑制性シナプス後電流 (spontaneous post-synaptic inhibitory currents, sIPSCs)を, 膜電位を  $-30$ mV に固定して記録した。社会的ストレスの生理学的効果の指標は,

a. ベースラインでの sIPSCs の平均振幅(pA)および頻度(Hz)

b. 3 種類の神経修飾因子, ドーパミン (DA), ノルアドレナリン (NA), セロトニン (5-HT) で活性化される GABA 性細胞の活動を反映する sIPSCs の平均振幅および頻度を, 各々の神経修飾因子を投与する前のベースラインに対する割合で求めた変化率を計算し 2 群間で比較した: ベースラインに対する変化率=(神経修飾因子投与後の値-ベースライン値)/ベースライン値 $\times 100$ 。なお, 3 種類の神経修飾因子については, 最終濃度が各 10  $\mu$ M で灌流液中に 5 分間投与し, 投与開始 5 分後~7 分後の 2 分間について sIPSCs を記録し, ベースラインに対する平均振幅と頻度の変化率を求めた。

錐体細胞と GABA 細胞は, 顕微鏡下の形態, および, 150~300 pA の脱分極性通電時のスパイク発火パターンや発火頻度(GABA 細胞が 20 Hz 以上の高頻度で発火するのに対して, 錐体細胞は高々 15Hz 程度),  $-100$  pA の過分極性通電時に測定した入力抵抗(GABA 細胞は 150 M $\Omega$ 以上の高抵抗である)という電気生理学的特性によって識別される。GABA 細胞のサブタイプは, 形態, 発火パターン(fast-spiking は PV,

burst-firing は CR, regular-spiking は SST ないし CCK にそれぞれ陽性)で識別される。mPFC の場合, 第 V 層を解析するのは, 先行研究の結果, この層でモノアミン性投射線維の密度変化が顕著に認められたためである<sup>1)</sup>。

b. GABA 作動性非錐体細胞からの直接記録による GABA 性抑制系に対する社会的ストレスの影響の検討

研究の効率化を図るため, a. のグルタミン酸作動性細胞で記録した sIPSCs (平均振幅と頻度)に関して, 社会的ストレスが 2 群間で差のある神経修飾因子のみを検討した。GABA 作動性抑制性神経細胞のサブタイプ毎に神経修飾因子(DA, NA, 5-HT)の膜電位に対する効果を 2 群間で比較する。

#### ⑤免疫組織学的研究

生後 45 日に 4% paraformaldehyde で灌流固定したラットから脳を取り出し, 厚さ 50  $\mu$ m のスライスを作成する。グルタミン酸脱炭酸酵素 65 と 67(以下 GAD65 及び同 67 と略記), GABA 細胞サブタイプに特異的なマーカーである PV, calretinin, calbindin, (以下それぞれ CR, CB と略記)に対する抗体(Sigma)を用い, 0.05% DAB で発色させた。使用した抗体はウサギ anti-PV (1:15,000), マウス anti-CR (1:5,000), マウス anti-CB (1:1,500)であり, 組織切片とは 4 $^{\circ}$ C で 48 時間インキュベートした。なお, 使用した抗体の希釈には, 0.5% Triton X-100 を含む 0.01 M PBS, pH7.4 を使用した。

次に, 組織画像を PC に取り込み, NIH イメージを用いて, BLA および mPFC において発現細胞数(1 mm<sup>2</sup> 当りの細胞数)を測定し, ストレス群と対照群の比較を行った。

#### ⑥ 統計

電気生理, 免疫組織, 行動実験のいずれにおいても 2 群間の比較を Student's *t* test を用いて検討した (SPSS 19)。

#### 4. 研究成果

①社会的行動に関する行動学的検討: social interaction test の解析

30 分間, 社会的ストレス群と同一週齢(生後 45 日)で, 社会的ストレスを受けた経験がなく, 通常に養育された Wistar 系雄性ラットと社会的

ストレスラットを各1匹ずつ、30分間同一ケージに入れる social interaction test を行い、個体の行動をビデオ記録して解析を行った。探索行動(非社会的行動), ano-genital sniffing, mutual circle(いずれも社会的行動)の3つの行動について、個体ごとの頻度は下記の通りであり、両群間の差はなく、いずれの行動に対しても社会的ストレスの影響は認められなかった。ただし、ano-genital sniffing は社会的ストレス群で頻度が高い傾向を示した(Student' *t* test,  $p=0.07$ ):

1) 探索行動

社会的ストレス群  $52.3 \pm 4.3$  (n=8), 対照群  $49.7 \pm 3.9$  (n=7; Student' *t* test,  $p=0.73$ )

2) ano-genital sniffing

社会的ストレス群  $13.1 \pm 3.3$  (n=8), 対照群  $8.1 \pm 3.0$  (n=7; Student' *t* test,  $p=0.07$ )

3) mutual circle

社会的ストレス群  $1.6 \pm 0.2$  (n=8), 対照群  $1.0 \pm 0.2$  (n=7; Student' *t* test,  $p=0.56$ )

③ GABA性神経細胞サブタイプに関する免疫組織学的検討

生後45日目に作成した組織切片を用いて、PV, CB, CRの3つのGABA性細胞のマーカに関して免疫組織学的検討を行った。その結果、社会的ストレス(+)群では、対照群に比べて、BLA, およびmPFCのうち、前帯状皮質のII/III層で、PV発現細胞数の有意な増加を認めた: 社会的ストレス(+)群  $57.3 \pm 3.8$  (n=9); 対照群  $49.8 \pm 3.4$  (n=8, Student' *t* test,  $p=0.56$ ,  $p<0.05$ ). 他方、この2領域以外でのPVには群間差は認められなかった。

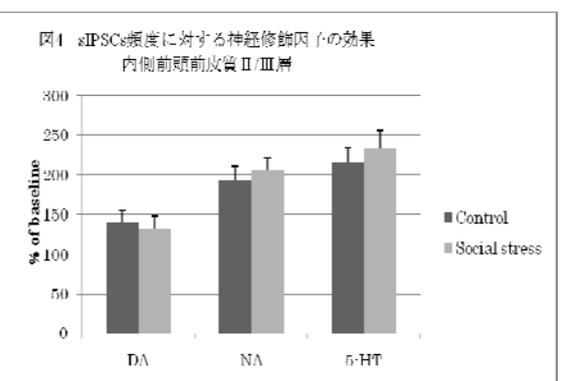
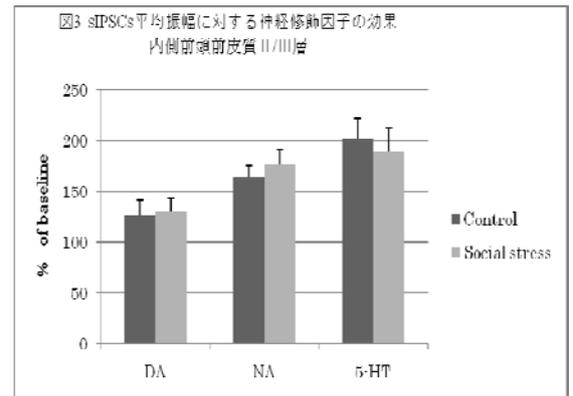
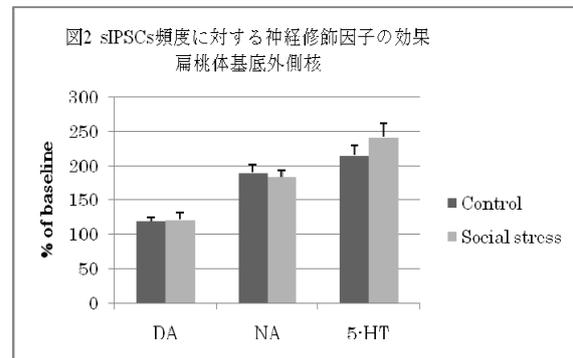
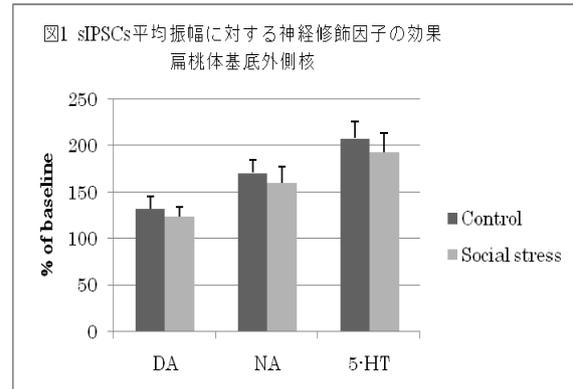
CBおよびCRに関しては、mPFCの2領域、BLAの何れの脳領域においても社会的ストレス群と対照群の間の差は認められなかった。

④ 電気生理学的解析の結果

スライスパッチクランプ法を用いて、mPFCのII/III層およびV層の錐体細胞や、BLAの主細胞から全細胞記録を行った。

記録条件は、ベースラインおよび、いずれもGABA作動性神経系を活性化することが報告されている(Kawaguchi and Shindou, 1998) 3種類の神経修飾因子、すなわち、DA, NA, 5-HTを、各々10  $\mu$ Mの最終濃度で5分間、灌流液中に投

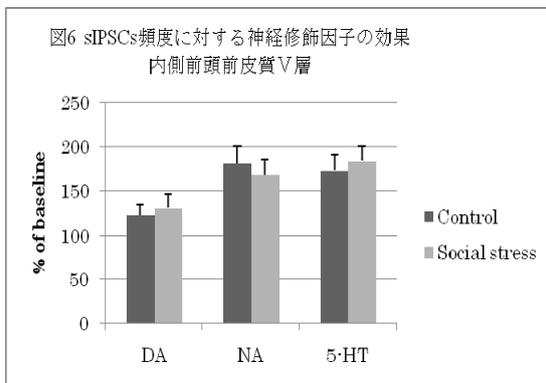
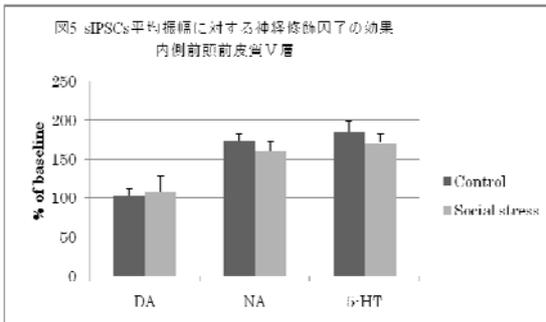
与する活性化条件の2つの条件下とした。自発性抑制性シナプス後電流(sIPSCs)を記録した。



下記の通り、これら3種類のいずれの神経修飾因子に対しても、2群間でsIPSCの平均振幅、頻度の差を認めなかった。

### 図1～図6

3種類の神経修飾因子(DA, NA, 5-HT)で生じたsIPSCsの平均振幅(図1, 3, 5)および頻度(図2, 4, 6)の変化. 図1, 2:BLA, 図3, 4:mPFC II/III層, 図5, 6:mPFC V層での結果(すべて, % baselineで表示).



### 〔考察〕

Wistar系ラットにおいて、生後3～21日に行う1日3時間の母子分離と、生後22～40日に実施する単独飼育による社会的隔離を組合せた発達早期の社会的ストレスは、ストレスに感受性を示す辺縁系脳領域であるBLAおよびmPFC II/III層において、GABA性抑制性神経細胞のサブタイプのマーカータンパクであるカルシウム結合タンパクの一種であるPVの発現細胞数を増加させた。mV層ではPVは変化せず、PVの発現細胞数に対する社会的ストレスの影響には脳領域特異性が認められた。また、異なるサブタイプのGABA性細胞を標識するカルシウム結合タンパクであるCBおよびCRの発現細胞数は変化せず、社会的ストレスに対して感受性を示すGABA系細胞は普遍的ではなく、サブタイプ特異性を示した。これらの結果より、社会的ストレスが脳に及ぼす影響は、辺縁系の特定領域の構成要素となっているPV陽性GABA性細胞に特異的である可能性が示唆さ

れた。しかし、本研究の電気生理学的実験結果においてGABA性神経系の電気的活動性の指標とした自発性抑制性シナプス後電流sIPSCsの平均振幅や頻度はベースラインにおいても、特定サブタイプのGABA系細胞を興奮させるDA, NA, 5-HTという3種類の神経修飾因子を投与した際の何れにおいても変化しなかった。そのため、社会的ストレスで生じるBLAやmPFC II/III層

カルシウム結合タンパクは細胞内で免疫組織学的検討では、扁桃体の外側核および腹mPFCのII/III層で特定のGABA細胞のマーカータンパクであるPV発現細胞数が有意に増加したが、異なるGABA細胞のマーカータンパクCR, CBの発現細胞数は変化しなかった。PVの発現細胞数が変化した上記2脳領域で、DA, NA, 5-HTを各10μMで投与し、スライスパッチクランプ法で自発性シナプス後電流(sIPSCs)を記録したが、何れの場合も、sIPSCsの平均振幅、頻度には両群間の差を認めなかった。

発達早期に母子関係を障害するようなストレスに曝露されると、辺縁系のグルタミン酸性シナプスの分布に変化が生じる(Helmeke et al., 2001)。本研究では、特定サブタイプのGABA性細胞に対する神経修飾因子の作用に対する社会的ストレスの影響は見出せなかった。この事実は、各サブタイプに発現しているモノアミン受容体には社会的ストレスの影響が弱いことを意味している。しかし、social interaction testのうち、ano-genital sniffingは社会的ストレス群で高い傾向が認められた。すなわち、発達早期の社会的ストレス負荷は、成熟期の社会的状況での不安を軽減する可能性を意味する。こうした社会行動の変化はBLAやmPFC II/III層でのPV発現細胞数増加の結果生じた可能性がある。

PV陽性GABA性細胞は、バスケット細胞とシャンデリア細胞に分類される。バスケット細胞は前頭前皮質やBLAの出力系である錐体細胞の細胞体や近位樹状突起(proximal dendrites)に、シャンデリア細胞は錐体細胞の軸索起始部にそれぞれ抑制性シナプスを形成する。辺縁系領域でのPV発現細胞数の増加は社会的行動を変える可能性が指摘されている

(Giachino et al., 2007)が、その神経生理学的な理由は明らかでない。PV 発現量が低下すると GABA の放出量が増加することが示されているため(Vreugdenhil et al., 2003), 本研究の結果は、BLA および mPFC II/III層での PV 陽性細胞による錐体細胞への抑制の減弱が生じている可能性が示唆される。DA は前頭前皮質で、PV 陽性細胞に対して興奮性の作用を有しており (Gorelova et al, 2002), DA 投与に対する PV 陽性細胞の反応性低下が予想されるが、錐体細胞で記録した DA で誘発される sIPSCs に関しては社会的ストレスの影響が認められなかった。今後は、より精密な実験系での検討、すなわち、PV 陽性細胞であるバスケット細胞やシャンデリア細胞とその GABA 性入力を受ける錐体細胞からのペア記録を行い、社会的ストレスの電気生理学的な影響を検討する必要がある。

〔引用文献〕

Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: Implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacol* 25:1-27, 2000.

Braun K, Lange E, Metzger M et al. Maternal separation followed by early social deprivation affects development of monoaminergic fiber systems in the medial prefrontal cortex of Octodon degus. *Neuroscience* 95:309-318, 2000.

Cirulli F, Terranova ML, Laviola G. Affiliation in periadolescent rats: behavioral and corticosterone response to social reunion with familiar or unfamiliar partners. *Pharmacol Biochem Behav* 54:99-105, 1996.

Ferezou I, Cauli, B, Hill EL et al. 5-HT3 receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide /cholecystokinin interneurons. *J. Neurosci.* 22:7389-7397, 2002.

Giachino C, Canalia N, Capone F et al. Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. *Neuroscience* 145:568-578, 2007.

Gorelova N, Seamans JK, Yang CR. Mechanisms of dopamine activation of fast-spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 88:3150-3166, 2002.

Helmeke C, Ovtsharoff W, Poeggel G et al. Juvenile emotional experience alters synaptic inputs on

pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex. *Cereb Cortex* 11:717-727, 2001.

Kaneko K, Tamamaki N, Owada H et al. Noradrenergic excitation of a subpopulation of GABAergic cells in the basolateral amygdala via both activation of nonselective cationic conductance and suppression of resting K<sup>+</sup> conductance: a study using glutamate decarboxylase 67-green fluorescent protein knock-in mice. *Neuroscience* 157:781-797, 2008.

Kawaguchi Y, Shindou T. Noradrenergic excitation and inhibition of GABAergic cell types in the rat frontal cortex. *J Neurosci* 18:6963-6976, 1998.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk D. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312-324, 2005.

Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417-463, 2000.

Vreugdenhil M, Jefferys JG, Celio MR et al. Parvalbumin-deficiency facilitates repetitive IPSCs and gamma oscillations in the hippocampus. *J Neurophysiol* 89:1414-1422, 2003.

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼子 幸一 (KANEKO KOICHI)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50194907

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：