

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590276

研究課題名(和文) 不安機構の性差に及ぼす扁桃体GABAトニックシグナルの役割と性ホルモンの関与

研究課題名(英文) The pharmacological properties of tonic currents mediated by GABAA-Rs in BLA neurons

研究代表者

山田 順子 (YAMADA, JUNKO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30334965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：不安のメカニズムと性差のかかわりを解明するため、脳内の主要な抑制性伝達GABAに着目し、遺伝子改変動物(PRIP-1KOマウス)を用い、不安、情動の中枢である扁桃体ニューロンに関して解析を行った。細胞レベルでの解析ではGABA受容体の働きに変異を持つKOマウスではGABAA受容体を介する特殊な伝達(トニック伝達)が野生型と比べ減少していた。薬理的検討でもGABAA受容体サブユニット作用薬に対する応答に差が見られたため、現在細胞膜のシナプス直下と周囲を分けてタンパク解析をする方法を確立中である。

研究成果の概要(英文)：Synaptically released GABA acting on postsynaptic GABAA receptor produce not only phasic inhibition, but also tonic inhibition by persistent activation of extrasynaptic receptors. This study aimed at examining pharmacological properties of tonic currents mediated by GABAA-Rs in BLA neurons of sex differences using the wild type and PRIP-1 KO mice which is known of downregulation of GABAergic transmission. The application of GABAA-R antagonist bicuculline blocked tonic GABAergic current which was significantly larger than those in KO. Bath application of diazepam and zolpidem causes increase tonic conductance in WT. In contrast, PRIP-1 KO mice showed lower sensitivity to these compounds. These data indicate that tonic GABAergic inhibition exist in principal neurons of the basolateral amygdala in WT mice but PRIP-1 KO mice have imperfection of this inhibitory system.

研究分野：医歯薬学

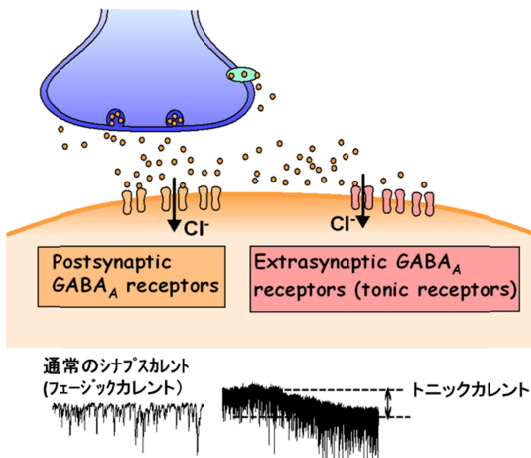
科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：GABA 抑制 トニック抑制 不安 性差

1. 研究開始当初の背景

**\*不安と性差\*** 「不安障害」の一つであるパニック障害の女性の発症頻度は男性の3倍にも及ぶ(日本女性心身医学会雑誌、2002年)。これまで多くの動物実験が性周期によるホルモン変動の少ない雄を用いて行われてきたが、不安障害の一つである月経前症候群をみても心の状態に性ホルモン変動の影響が関係していることは容易に想像できる。

**\*新しい概念のシナプス伝達\*** 神経終末から放出された神経伝達物質はシナプス後膜の受容体に作用しシナプス電位を引き起こすことが一般的に知られている。ところが近年小脳や海馬のニューロンにおいて、シナプス間隙から漏れだして神経細胞周囲に微量に存在するGABAが、シナプス直下でない場所に存在する受容体に作用して“持続的なシナプス電流”すなわち“トニック電流”を引き起こしている事が見出され、これらが細胞の興奮性を調節していることがわかってきた。しかしそれらの意義や調節のメカニズムはよくわかっていない。最近海馬のトニック電流をプロゲステロンが修飾し不安様行動に関与している事が報告され抑制性伝達へのステロイドホルモンの影響が注目されている(Mody, PNAS2007)。



GABAシナプスにおけるフェージックおよびトニックカレントのモデル図:  
シナプス直下にある受容体を介するフェージックカレントと、シナプス外に存在する受容体を介しベースラインを変えるトニックカレントが存在する

一方、不安・情動の中核である扁桃体はGABAによる抑制が多いことで知られているが、トニック抑制に関してはまだ研究されていない。不安に関係していると考えられる扁桃体において、“不安機構の性差にGABA作動性トニックシグナルと性ホルモンがどのように関与しているか?”という観点から行う本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

性ステロイドホルモン変動による気分変動、不安抑うつは脳内の最も主要な抑制性伝達であるGABA系の関与が考えられ、特に不安発作のような急激な情動変化には扁桃体の抑制機構の異常が示唆されるがそのメカニズムは明らかでない。本研究では不安機構

の性差という観点からステロイドホルモンによるGABA系動的变化を扁桃体において検討する。GABA抑制機構の中でも新しい概念の“持続的(トニック)なGABA作動性抑制”に着目し、性ステロイドホルモンが不安の発作頻度と不安感に關与する分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

雄マウスおよび雌マウスの性周期(発情期・非発情期)によるトニック抑制の変動を不安に關与していると考えられている扁桃体で比較検討する。雌マウスに関しては、卵巣切除、卵巣切除+プロゲステロン、エストロゲン投与群により人工的に発情期、非発情期モデルを作成し以下の方法で不安とGABA抑制の雌雄差を解析する。野生型のマウスとGABA<sub>A</sub>受容体機能に変異が見られるPRIP1-KOマウスを用いる。

- (1) 生理学的手法: パッチクランプ法によるトニック・フェージックカレントの測定
- (2) 薬理学的手法: パッチクランプ法によるトニック電流に対するGABA受容体サブユニット特異的アゴニスト、アンタゴニスト効果の検討
- (3) 行動解析: 高架式十字迷路、オープンフィールドテストによる不安様行動解析
- (4) 分子生物学的手法: GABA受容体サブユニットタンパク、mRNA発現の解析

4. 研究成果

(1) 生理学・薬理学的手法による解析  
雄マウスの扁桃体外側核ニューロンにおけるトニック抑制を検討した。PRIP1-KOマウスと野生型マウスを用いてトニック抑制を比較解析した所、KOマウスではGABA作動性トニック電流が減少していた。トニック電流の現象がどのサブユニット由来のものであるのか調べるため薬理学的検討を行ったところ、この減少は1に選択抑制の高いベンゾジアゼピン系アゴニスト zolpidem, 5インバースアゴニスト L655708, 及び 2/3サブユニットアゴニスト etomidate に対して、野生型とKOマウスで優位な差が見られた。この結果よりこれらサブユニットの変異がトニック抑制の変化に關連している可能性が示唆された。(図1)

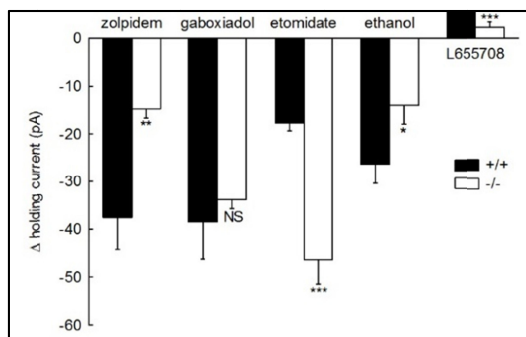


図1 野生型(+/+)PRIP1-KO(-/-)扁桃体ニューロンにおけるトニック電流解析

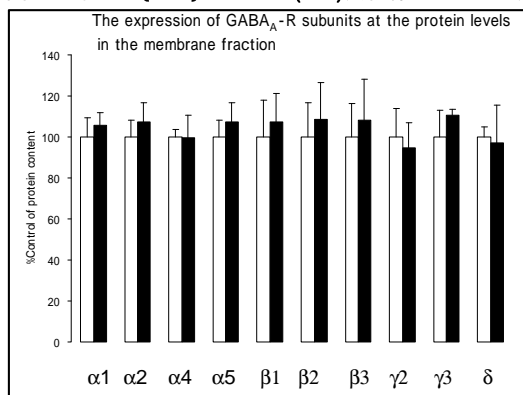
前述の細胞レベルでの解析により、K0 マウスでは抗不安薬 diazepam, zolpidem に対する変異がみられたため、行動解析によりこれら薬物による効果の検討を行った。高架式十字迷路試験を行った結果、野生型マウスでは有意差をもって diazepam による open arm への滞在時間延長、L655708 による滞在時間の短縮が見られたが、K0 マウスではこれら薬物の効果が消失していた。このことにより K0 マウスではこれらの薬物の感受性が低下していると考えられ、細胞レベルでの結果と一致した。

一方、卵巣切除メスマウスでは、野生型に比べ K0 マウスでは優位に open arm 滞在時間の延長が観察された。サブユニット選択的薬物投与による行動解析およびプロゲステロン、エストロゲン投与マウスの解析を引き続き実施している。

#### (2) 分子生物学的手法による検討

ウエスタンブロッティング法により、細胞膜における GABA<sub>A</sub> 受容体各サブユニットタンパク発現を解析した(図2)。

図2 野生型(+/+)PRIP1-K0(-/-)扁桃体ニューロン膜



#### における GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニットタンパク発現

しかし、野生型、K0 マウスで各サブユニットにおける優位な差はみられなかった。細胞レベルでの解析と一致しないのは、フェージック電流を引き起こすシナプス直下の GABA 受容体サブユニットとトニック電流を引き起こすシナプス周囲の GABA 受容体サブユニットの構成が異なっている可能性がある。

電気生理学的手法と行動解析の結果を元に論文準備中。さらに、前述のウエスタンブロッティングの結果の矛盾をを詳しく解析をするため、シナプス部分とシナプス周囲部分に膜を分け、ウエスタンブロッティング法を行う手法を確立中である。

本研究課題をする中で新たにトニック電流、GABA 作動性伝達の変異と神経疾患に関する新しい発見があり、これらをまとめて論文として発表した(発表論文1~10)。また、第90回日本生理学会大会で“抑制性伝達とそれを担う機能分子のダイナミクス”をオーガナイザーとして企画した他、第36回日本神経科学会 Neuro2013(京都)のシンポジウム”

古くて新しい GABA の機能”で、トニック抑制と神経疾患の関係を発表した。

#### 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. Yamada J., Zhu G., Okada M., Hirose S., Yoshida S., Shiba Y., Migita K., Mori F., Sugawara T., Chen L., Liu F., Yoshida S., Ueno S., Kaneko S. (2013) A novel prophylactic effect of furosemide treatment on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE)(2013) *Epi. Res.* 107 (1-2):127-37 doi: 10.1016/j.eplepsyres. (査読有)
2. Egawa K., Yamada J., Furukawa T., Yanagawa Y., Fukuda A. (2013) Cl<sup>-</sup> homeodynamics in gap-junction-coupled astrocytic networks on activation of GABAergic synapses. *J. Physiol.* Aug 15; 591: 3901-3917 doi: 10.1113/jphysiol. (査読有)
3. Ueno T, Yamada J., Nishijima H, Arai A, Migita K., Baba M, Ueno S., Tomiyama M. Morphological and electrophysiological changes in intratelencephalic-type pyramidal neurons in the motor cortex of a rat model of levodopa-induced dyskinesia. *Neurobiology of Disease* . 2014 Apr;64:142-9. doi: 10.1016/j.nbd.2013.12.014. (査読有)
4. Nishijima H, Suzuki S, Kon T, Funamizu Y, Ueno T, Haga R, Miki Y, Suzuki C, Arai A, Kimura T, Suzuki C, Meguro R, Yamada J., Migita K, Ichinohe N, Ueno S, Baba M, Tomiyama M. Morphologic changes of dendritic spines of striatal projection neurons in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Movement Disorders* 2014 Mar;29(3):336-43. doi: 10.1002/mds.25826. (査読有)
5. Migita K., Yamada J., Nikaido Y, Shi X, Kaneko S, Hirose S, Ueno S. (2013) Properties of a Novel GABA(A) Receptor (2) Subunit Mutation Associated With Seizures. *J. Pharmacol. Sci.* 121(1):84-7 (査読有)
6. Nishijima H, Arai A, Kimura T, Mori F, Yamada J., Migita K., Wakabayashi K, Baba M, Ueno S., Tomiyama M. (2013) Drebrin immunoreactivity in the striatum of a rat model of levodopa-induced

dyskinesia. *Neuropathology* 33:  
391-396 doi: 10.1111/neup.12009. Epub  
2012 Dec 13. ( 査読有 )

7. Inoue, K., Furukawa, T., Kumada, T., Yamada J., Wang, TY., Inoue, R., Fukuda, A. (2012) Taurine Inhibits K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporter KCC2 to Regulate Embryonic Cl<sup>-</sup> Homeostasis via With-no-lysine (WNK) Protein Kinase Signaling Pathway. *J. Biol Chem.* 287 (25):20839-20850 . doi: 10.1074/jbc.M111.319418. ( 査読有 )
8. Zhu G., Yoshida S., Migita K., Yamada J., Mori F., Tomiyama M., Wakabayashi K., Kanematsu T., Hirata M., Kaneko S., Ueno S and Okada M. (2012) Dysfunction of extrasynaptic GABAergic transmission in PRIP-1 KO mice is associated with an epilepsy phenotype. *J Pharmacol Exp Ther.* 340 (3):520-8 doi: 10.1124/jpet. 111.182386( 査読有 )
9. Migita K., Tomiyama M., Yamada J., Fukuzawa M., Kanematsu T., Hirata M., Ueno S (2011) Phenotypes of pain behavior in phospholipase C-related but catalytically inactive protein type 1 knockout mice. *Molecular pain* 7:79 doi: 10.1186/1744-8069-7-79. ( 査読有 )
10. 右田啓介、山田順子、上野伸哉 “ 痛み ” 月刊臨床神経科学・中外医学社 (2011) 29, 836-838 ( 査読無 )

[学会発表](計 19 件)

1. 山田順子第 36 回日本神経科学会 Neuro2013 ( 京都 ) シンポジウム “ 古くて新しい GABA の機能 ” The role of GABAergic tonic signal in the pathophysiology (2013.6.21)
2. 山田順子 第 90 回日本生理学会大会( 東京 ) “ 抑制性伝達とそれを担う機能分子のダイナミクス ” ( オーガナイザー ) “ Role of GABAA receptor mediated tonic conductance in physiology and pathology (2013.3.27)
3. Junko Yamada The 10th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences Gyeongju, Korea “ Dysfunction of tonic GABAergic transmission in PRIP-1 KO mice, Korea (2012.2.17)
4. Junko Yamada International symposium "Interaction of nervous and immune systems in health and disease" Saint Petersburg, Russia (2011.6.4)

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山田順子 ( YAMADA Junko )

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 30334965

(2) 研究分担者

富山誠彦 ( TOMIYAMA Masahiko )

弘前大学・大学院医学研究科・kennkyuuin

研究者番号 : 40311542

(3) 連携研究者

上野伸哉 ( UENO Shinya )

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 00312158

右田啓介 ( MIGITA Keisuke )

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 10352262