

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791192

研究課題名(和文)扁桃体陥入型シナプスにおける不安および恐怖記憶調節機構の分子基盤解析

研究課題名(英文)The interaction between serotonergic and cannabinoidergic neurotransmissions in the basolateral amygdala

研究代表者

吉田 隆行(Yoshida, Takayuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60374229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：陥入型シナプスを有する扁桃体基底外側核は不安や恐怖の情動を制御する重要な脳部位であり、うつ病の発症とも密接に関連すると考えられている。in vitroならびにin vivoにおいて扁桃体からのセロトニン(5-HT)およびドパミン(DA)の細胞外遊離をHPLC-ECDにより測定したところ、5-HTの遊離はカンナビノイドCB1受容体作動薬の扁桃体投与によって有意に減少した。DAの遊離は影響を受けなかった。また5-HT2受容体活性化により内因性カンナビノイド(eCB)が生合成される結果を得た。これらの結果は、扁桃体における5-HTの遊離とeCBの合成は協調し、相互調節していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found predominant neuronal projections of serotonergic, dopaminergic and cholinergic fibers in the basolateral amygdala (BLA), and CB1 receptor was frequently localized on serotonergic axon but not dopaminergic, noradrenergic or cholinergic fibers. Furthermore, extracellular release of serotonin was significantly reduced by WIN55212-2, CB agonist, whereas dopamine concentration was not altered, indicating presynaptic serotonin release is modulated by CB1 receptors. On the other hand, alpha-methyl-5-HT, 5-HT2 receptor agonist triggered postsynaptic endocannabinoid synthesis and induced the reduction of presynaptic GABA release. This suppression was completely blocked by MDL100907, 5-HT2A antagonist, or AM251, CB1 antagonist. These findings suggest that endocannabinoid is synthesized via activation of postsynaptic 5-HT2A receptors, and regulates on-demand local serotonergic transmission in the BLA, as well as neuronal activation of dorsal raphe nucleus.

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：扁桃体 セロトニン カンナビノイド 恐怖記憶

1. 研究開始当初の背景

近年、人々を取り巻く社会環境の極端な変化によって、うつ病、心的外傷後ストレス障害(PTSD)、不安障害などの神経精神疾患による「こころ」の破綻が問題化している。また一方では、麻薬および向精神薬の乱用により、「こころ」を自ら崩壊させてしまうことも大きな社会問題となっている。2010年の日本国内の自殺者は31,690人であり、13年連続で3万人を超えている。最近、厚生労働省はこれまでの「4大疾病」に、新たに精神疾患を加えて「5大疾病」とする方針を決めた。「こころ」の一部を形成する本能的な感情、すなわち情動は視床下部-下垂体-副腎皮質系による制御だけでなく、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリンなどのモノアミンによっても調節されている。情動は外界からの感覚刺激が内側前頭皮質、海馬および扁桃体で制御・統合されて出力される。特に扁桃体は最終的な情動表出を決定する重要な脳領域であり、モノアミン作動性投射を強く受けていることから、ストレス、不安、うつ症状と密接に関わると考えられている。

中枢のセロトニン作動性神経系は情動制御に重要な役割を果たしていると考えられ、抗うつ薬・抗不安薬の主要な標的である。これらの疾患に対してはSSRIが第一選択薬となっているが、うつ病の20%、双極性障害の60%はSSRIが効かない難治性であることから、セロトニンだけでなくその他のモノアミンやコリンおよび神経ペプチド作動性のメカニズムも重要である可能性が示唆される。一方、扁桃体では恐怖記憶や不安の制御に内因性大麻類似物質(カンナビノイド)の関与が示唆されている。しかしながら、扁桃体におけるカンナビノイドの役割や作用機序には不明な点が多かった。

2. 研究の目的

うつ病やPTSDは過度のストレスに伴う不安や恐怖記憶により心身の病的反応が長く持続する精神疾患である。薬物療法ではSSRIが第一選択薬とされるが、SSRIが効かない難治性の不安障害も知られている。我々は不安や恐怖に関与する扁桃体基底核に特異的な陥入型抑制性シナプスを世界で初めて発見し(Yoshida et al., Proc Natl Acad Sci USA. 108, 3059; 2011)、このシナプスにおける抑制解除(脱抑制)が不安や恐怖の除去に関わる可能性がある知見を得た。この成果を発展させるため、本研究では、この陥入型シナプスにおけるモノアミン、アセチルコリンおよび神経ペプチドを介した神経伝達修飾機構を検討し、不安障害に関連する分子・神経回路・行動メカニズムを追究することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)不安や恐怖は生体防御機構の1つである一方、「過度な」不安や恐怖がこころの破

綻を生じさせると考えられる。すなわち、不安や恐怖が過度にならないよう調節する必要がある。内因性カンナビノイドは $G_{q/11}$ タンパク質共役型受容体の活性化によって生合成が増強されることが小脳、海馬および線条体にて知られていることから、扁桃体においてもこの可能性を検証する。 $G_{q/11}$ 共役受容体としてムスカリン性アセチルコリンタイプ1(M1)受容体、コレシストキニンB(CCK-B)受容体、セロトニンタイプ2(5-HT₂)受容体、代謝型グルタミン酸受容体タイプ5(mGluR5)を候補とし、各受容体の選択的活性化による内因性カンナビノイド(2-AG)合成について、GABAによるシナプス後電流をホールセルパッチクランプ法によりモニターすることにより解析した。

(2)セロトニンを含むモノアミン系の神経伝達物質は、明確なシナプスを形成せず、細胞外スペースを長距離、広範囲に伝播・拡散し、その範囲内にある受容体に結合する「ボリューム伝達」と呼ばれる神経調節様式をとると考えられている。一方、グルタミン酸やGABAなどのアミノ酸系神経伝達物質は、放出部位と結合部位が明確であり、点と点で密に結合する「ワイヤリング伝達」を行うシナプスを形成する。我々は内因性カンナビノイドが「ワイヤリング伝達」を抑制的に制御することをこれまでに報告しているが、「ボリューム伝達」の制御機構については未だ明らかではない。本研究のマウスを用いた予備検討の結果として以下2つの知見を既に得ていた。

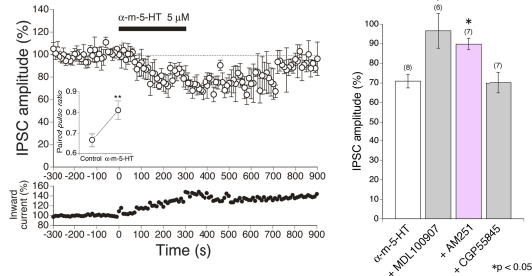
セロトニン作動性神経が扁桃体に顕著に投射している。

セロトニン作動性神経軸索上に1型カンナビノイド(CB₁)受容体が共局在する。これは、縫線核の活動によって遊離するセロトニンを一方向的かつ受動的に受けとる一般的概念に加え、受け手側である扁桃体が内因性カンナビノイドを介してセロトニン遊離を能動的にコントロールし、局所的かつ即時的なセロトニン放出抑制機構を可能にする全く新しい概念である可能性がある。本研究ではこの仮説を検証すべく、*in vitro*および*in vivo*実験系により、カンナビノイド受容体作動薬または阻害薬をマウス扁桃体に局所投与し、細胞外セロトニン遊離量を測定した。

4. 研究成果

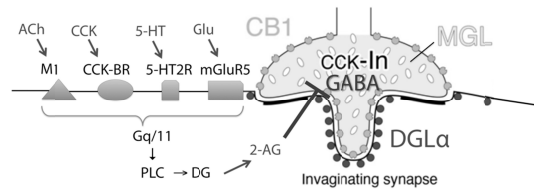
(1)陥入型シナプスを形成する錐体細胞からパッチクランプ記録を行い、GABA作動性の抑制性シナプス電流(IPSC)を記録し、5-HT_{2A, 2C}受容体の作動薬である-methyl-5-HTを灌流投与した。その結果、記録ニューロンに内向きの電流が40%程度増大し、IPSCの振幅が減弱した。このIPSCの減弱にはシナプス前性の効果を示唆するパラメーターであるPaired-pulse ratioの増大を伴った。さらに

この効果は 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬である MDL100907 によって阻害されるとともに、CB₁ 受容体拮抗薬においても阻害された。

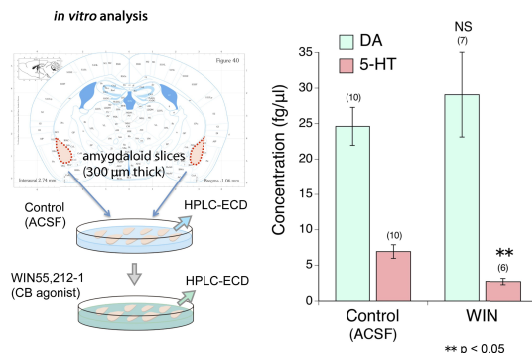


これらの結果は、シナプス後部の 5-HT_{2A} 受容体が活性化すると、内因性カンナビノイドが合成され、これがシナプスを逆行性に伝達し、GABA 作動性抑制性シナプス前終末の CB₁ 受容体に結合し、GABA 放出を抑制するメカニズムが機能していることを示唆する。

同様に、M1 受容体、CCK-B 受容体、mGluR5 の活性化においても、IPSC 振幅が減弱する効果を認めたことから、これらの受容を介しても内因性カンナビノイドの生合成がトリガーされることが示唆された。

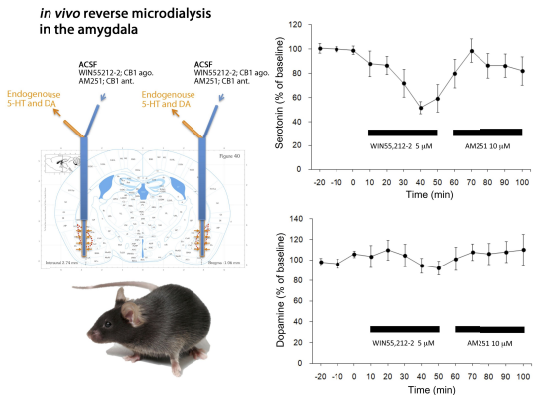


(2) 【in vitro 実験】扁桃体基底外側核(BA)部分をトリミングして抽出した後、人工脳脊髄液(aCSF)中にてインキュベートした。sCSF中に放出される細胞外セロトニン濃度の変化を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)にて定量解析した。aCSF中にCB₁受容体作動薬であるWIN55212-2を溶解してインキュベートすると、コントロール群に比較して細胞外セロトニン遊離量が有意に減少した。この時、細胞外ドーパミン遊離量には変化がなかった。

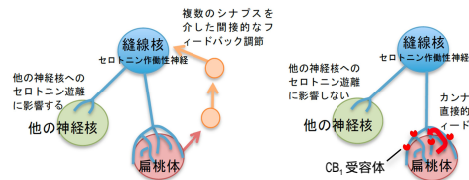


【in vivo 実験】マウス扁桃体に透析膜プローブを留置し、脳内微小灌流法によりセロトニンおよびドーパミンを回収し、HPLC-ECDによってその濃度変化を解析した。透析膜プローブを介してWIN55212-2を扁桃体に局所投与すると、セロトニン回収量が減弱し、CB₁

受容体拮抗薬(AM251)によってこれが回復した。一方、ドーパミン回収量は変化しなかった。これらの結果から、セロトニン作動性神経終末のCB₁受容体が活性化するとセロトニンの細胞外遊離が減弱することが示唆された。



以上の本研究結果から、陥入型シナプスを有する扁桃体基底外側核では、セロトニン遊離とカンナビノイド生合成が互いに協調して制御されていることが示唆された。特に、セロトニン遊離においては、その起始核である背側縫線核の活動に依存せず、扁桃体錐体細胞がカンナビノイドを介して直接的かつ即時的に能動制御する新しいモノアミン調節メカニズムであると考えられる。



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)

吉田隆行, 吉岡充弘: 扁桃体-up to date 扁桃体の恐怖記憶の分子機構, *Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学*, 2014, 32(6):印刷中. 査読無

吉田隆行: 分子から迫る神経薬理学 セロトニン関連分子をターゲットとした臨床応用, *Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学*, 2014, 32(6):印刷中. 査読無

吉田隆行: 分子から迫る神経薬理学 セロトニンの生理的および薬理的作用(2), *Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学*, 2014, 32(5):476-477. 査読無

吉田隆行: 分子から迫る神経薬理学 セロトニンの生理的および薬理的作用(1), *Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学*, 2014, 32(4):356-357. 査読無

吉田隆行: 分子から迫る神経薬理学 セ

ロトニンとは 受容体の種類, Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学, 2014, 32(3):246-247. 査読無
Ohmura Y, Kumamoto H, Tsutsui-Kimura I, Minami M, Izumi T, Yoshida T, Yoshioka M.: Tandospirone suppresses impulsive action by possible blockade of 5-HT1A receptor. J Pharmacol Sci. 2013; 122:84-92. 査読有, <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.12264FP>.

Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Kumamoto H, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M.: Milnacipran enhances the control of impulsive action by activating D(1)-like receptors in the infralimbic cortex. Psychopharmacology (Berl). 2013; 225:495-504. 査読有, DOI: 10.1007/s00213-012-2835-5

Izumi T, Ohmura Y, Futami Y, Matsuzaki H, Kubo Y, Yoshida T, Yoshioka M.: Effects of serotonergic terminal lesion in the amygdala on conditioned fear and innate fear in rats. Eur J Pharmacol. 2012; 696:89-95. 査読有, DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.09.028.
Shikanai H, Yoshida T, Konno K, Yamasaki M, Izumi T, Ohmura Y, Watanabe M, Yoshioka M.: Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. J Neurosci. 2012; 32:14415-14426. 査読有, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5929-11.2012.
Yamaguchi T, Tsujimatsu A, Kumamoto H, Izumi T, Ohmura Y, Yoshida T, Yoshioka M.: Anxiolytic effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, via serotonin 5-HT(1A) receptors on anxiety-related behaviors in rats experienced aversive stress. J Ethnopharmacol. 2012; 43:533-539. 査読有, DOI: 10.1016/j.jep.2012.07.007.

〔学会発表〕(計6件)

吉田隆行:恐怖や不安を制御する新たな神経機能と分子基盤, 第87回日本薬理学会年会(招待口演), 2014年3月19日~2014年3月21日, 仙台国際センター(仙台市)

吉田隆行:ラット背側縫線核のセロトニン/GAD67陽性ニューロンは離乳期に一過性発現し、新奇環境ストレス下において優先的に活性化する, 第91回日本生理学会大会(招待口演), 2014年3月16日~3月18日, 鹿児島大学(鹿児島県)

吉田隆行:扁桃体におけるカンナビノイド受容体を介したセロトニン遊離調節機構, 第43回日本神経精神薬理学会, 2013年10月24日~2013年10月26日, 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

吉田隆行:扁桃体におけるセロトニンおよびカンナビノイドシグナル伝達系の相互調節機構, 第36回日本神経科学大会, 2013年6月20日~2013年6月23日, 国立京都国際会館(京都市)

吉田隆行:恐怖記憶消去に關与するカンナビノイドとセロトニンの相互調節機構, 第42回日本神経精神薬理学会(招待講演), 2012年10月18日~2012年10月20日, 栃木県総合文化センター(宇都宮市)

吉田隆行:扁桃体基底核において内因性カンナビノイドは抑制性シナプス伝達とセロトニン遊離を調節する, 第36回日本神経科学大会, 2012年9月18日~2012年9月21日, 名古屋国際会議場(名古屋市)

〔図書〕(計1件)

Izumi T, Yoshida T, Watanabe M, Yoshioka M.: Role of the amygdalar serotonergic system in emotional regulation and disorders. In: Insights into the Amygdala, chapter 2, 25-62, 2012, Nova Science Publishers, Inc.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://hokudaineuropharmacol.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 隆行(YOSHIDA, takayuki)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号: 60374229

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

渡辺 雅彦(WATANABE, masahiko)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号: 24220007

田中 謙二(TANAKA, kenji)

慶応大学・医学部・准教授

研究者番号: 30329700