

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670534

研究課題名(和文)モノアミン/コリン遊離を能動的に制御する新規の神経回路調節機構の探索

研究課題名(英文)Novel neural mechanisms of active control for the monoaminergic/cholinergic release

## 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：扁桃体ではセロトニン(5-HT)により内因性カンナビノイド(CB)が生成されるとともに、CB1受容体の活性化により5-HT遊離が減少する効果について検証した。カルシウム依存的で神経細胞を由来とする5-HT遊離であることが示された。また、5-HTならびに幼若期のストレスによって扁桃体の錐体細胞は興奮性が亢進することが明らかとなった。恐怖記憶の想起には海馬CA3錐体細胞の5-HT7受容体が関与し過分極活性化陽イオン電流(I<sub>h</sub>)を介することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Endocannabinoids were produced by activation of postsynaptic serotonin (5-HT) receptor as well as decreased presynaptic 5-HT release by the activation of the CB1 receptor in the amygdala. We demonstrated that it was caused by calcium- and neuronal activity-dependent manner. In addition, it was revealed that excitability of the pyramidal neuron in the adult amygdala was enhanced by aversive stress at juvenile periods and by activations of 5-HT<sub>7</sub> receptors. We also revealed that the 5-HT<sub>7</sub> receptor of CA3 pyramidal cell in the ventral hippocampus participated in recalls of the fear memory through the activation of I<sub>h</sub> current.

研究分野：神経科学

キーワード：扁桃体 セロトニン カンナビノイド ドーパミン ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

「ストレス社会」といわれる昨今、気分障害(うつ病や双極性障害)や不安障害などの精神疾患の罹患率が増加しつつある。うつ病は長期休職(学)や自殺の主要因であり、大きな社会問題として報告されるとともに経済的損失として 1.3~2.7 兆円が試算されている。うつ病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、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)は中枢神経系のセロトニン遊離量を増加させることによって、抗うつ、抗不安作用を発揮するとされ、気分障害の第一選択薬として用いられる。しかしながら、うつ病患者のおよそ 20%程度は SSRI が効かない難治性の精神疾患であることも知られる。厚生労働省は、SSRI など抗うつ薬 6 種類が 6 ~ 11 歳のうつ病患者で有効性が確認できないとの報告をまとめ、小児等への投与における「使用上の注意」を改訂するよう平成 25 年 3 月 29 日付けで関連団体に要請した。これより我々は、『若年期と成人期では情動の制御メカニズムが異なる』という可能性を着想した。

我々はうつ病に関連する扁桃体において「不安や恐怖記憶を消去」する可能性のあるシナプスを発見しており(Yoshida et al., 2011, PNAS, 5-Year Impact Factor 10.583, 被引用回数 17 回)、さらに近年、幼児-若年期に相当するラットの脳内にごく軽微な不安環境に対して優先的に活動する特殊なセロトニン神経細胞を発見している(Shikanai, \*Yoshida et al., J Neuroscience, 5-Year Impact Factor 7.869, \* Corresponding author, 被引用回数 2 回)。

## 2. 研究の目的

モノアミン系の神経伝達物質の放出は、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「ポリウム伝達」と呼ばれる神経調節様式をとると考えられている。セロトニンは脳内の縫線核という局所脳領域において「限定生産」され、脳内の隅々に送られる。我々は、「ポリウム伝達」によるセロトニン神経系に新規調節機構を見出し、情動機能に与える影響を明らかにすることを試みるとともに、前述した研究成果をさらに発展させるべく、本研究では、セロトニンなどのモノアミン系神経伝達修飾機構を再検討し、若年期の不安障害に関連する新たな分子・神経回路・行動メカニズムを追究した。

## 3. 研究の方法

(1) 局所神経回路におけるセロトニン遊離調節機構を解析する。マウス扁桃体にカンナビノイド受容体作動薬または阻害薬を局所投与し、細胞外セロトニン遊離量を測定する(スライス標本による in vitro 解析および

扁桃体に透析プローブを留置した脳内微小還流法による in vivo 解析)

(2) 扁桃体錐体細胞のセロトニン感受性について急性脳スライス標本を用いたホールセルパッチクランプ記録により電気生理学的に解析する。

(3) 幼若期にストレスを受けた齧歯類(マウスおよびラット)の不安および恐怖様行動と関与する脳領域の神経活動特異性について電気生理学的に解析する。

## 4. 研究成果

(1) 扁桃体基底外側核(BLA)部分をトリミングして摘出した後、人工脳脊髄液(aCSF)中にてインキュベート、または生体マウス扁桃体に透析膜プローブを留置した脳内微小還流法によって、aCSF 中に放出されるセロトニンの濃度変化を電気化学検出器月高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)にて定量解析した。aCSF を介してカンナビノイド受容体作動薬を扁桃体内に灌流すると、セロトニン濃度が減少した。高 K<sup>+</sup>溶液刺激によって細胞外セロトニン濃度は顕著に増大するが Ca<sup>2+</sup>除外 aCSF 中では変化しなかった。これより、測定したセロトニンは脱分極による Ca<sup>2+</sup>依存的なメカニズムによって遊離する性質を有し、神経細胞を由来とすることが示唆され、脳血流内の血小板中にも存在するセロトニンによる効果ではないことが示された。

(2) BLA においてセロトニン 2 型(5-HT<sub>2</sub>)受容体が関与する神経伝達物質放出機構についてグルタミン酸およびガンマアミノ酪酸(GABA)によるシナプス後電流(それぞれ EPSC および IPSC)を電気生理学的に記録し、解析した。その結果、5-HT<sub>2</sub> 受容体作動薬によって微小 EPSC の頻度が増大し、微小 IPSC の頻度が減少する効果が確認された。また、記録中の錐体細胞には内向き電流が確認された。中枢神経系における 5-HT<sub>2</sub> 受容体には 5-HT<sub>2A</sub> 受容体と 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の 2 つサブタイプが報告されている。このことから、どちらのタイプの受容体が関与しているのかを調べるため、それぞれの受容体の選択的拮抗薬を用いて実験を行った。その結果、5-HT<sub>2</sub> 受容体作動薬によって生じる 2 発刺激促進比(Paired-pulse ratio)の増大(シナプス前性の効果であることを示唆するパラメーター)を伴う誘発 IPSC 振幅の減少が、5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗薬によって阻害された。以上のことから、BLA の錐体細胞では内因性カンナビノイドがセロトニンの遊離を抑制的に制御するとともに、セロトニンはシナプス後部の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の活性化によって内因性カンナビノイドを生合成し、逆行性シナプス伝達によりシナプス前終末からの GABA 放出を抑制的に制御している可能性が示唆された。一方、グルタミン酸放出が増大するメカニズムに

については明らかにできなかった。

(3) 離乳期である生後 3 週齢のマウスに対して電気ショックによる恐怖条件付けを行い、成熟期(生後 10 週齢時)に恐怖と関連付けた手がかり刺激に暴露したところ、恐怖様行動が認められた。生後 3 週齢時に学習した恐怖記憶を生後 10 週齢で想起可能であることを確認した。これを幼若期ストレスモデルマウスとし、2 種類の情動行動評価実験を行った。高架式十字迷路(EPM)試験において、幼若期ストレス群は対照群に比べて Open arm 滞在時間が長い傾向が認められたが有意差は検出できなかった。一方、EPM 上での自発運動量は幼若期ストレス群において有意に減少していた。また、オープンフィールド(OF)試験において、幼若期ストレスモデル群の自発運動量は有意に減少していたが、セントラルゾーン滞在時間は対照群と比較し、変化していなかった。これらの結果から、幼若期ストレス群では、新奇環境における不安レベルが亢進している可能性が示唆された。この中枢神経メカニズムについて、恐怖や不安などの情動の統合と出力に深く関与する扁桃体基底核(BA)錐体細胞の膜電位特性を電気生理学的に解析した。電流固定法にて神経細胞に電流注入を行い、膜電位変化を記録した結果、幼若期ストレス群では対照群と比較し、活動電位の発火頻度が有意に高いことが判った。一方、静止膜電位、発火閾値、脱分極後の後過分極振幅には群間差が認められなかった。薬理的検討として、電気記録中の BA 錐体細胞にセロトニンを含む aCSF を灌流投与したところ、対照群ではセロトニン濃度依存的に活動電位の発火頻度が上昇したが、幼若期ストレス群ではセロトニン灌流投与の前後で発火頻度に変化は認められなかった。これらのことから、幼若期ストレス群の BA 錐体細胞は内在的な興奮性が亢進しており、その背景としてセロトニンに対する感受性の低下が関与している可能性が示唆された。

恐怖記憶を制御する脳部位として海馬も重要な役割を担っていることが知られている。恐怖条件付けされたラットの腹側海馬 CA3 錐体細胞からスライスパッチクランプ記録を行い、膜電位特性を対照群と比較した。その結果、恐怖条件付け群では活動電位の発火頻度が有意に増大しており、この頻度の増大は 5-HT7 受容体の拮抗薬で有意に抑制された(Ohmura, Yoshida et al., 2015)。

近年、情動機能の制御にドーパミン作動性神経系の関与が報告されており、本研究でも母仔分離による幼若期ストレスと成熟期慢性ストレスを組み合わせたラットを用いて腹側被蓋野に局在するドーパミン作動性神経からスライスパッチクランプ記録を行い、膜電位特性を解析した。活動電位の発火頻度および閾値、静止膜電位などのパラメーターを対照群と比較したが有意差は認められな

かった。

## 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 4 件)

Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Matsushima T, Amita H, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M.: Neuronal codes for the inhibitory control of impulsive actions in the rat infralimbic cortex. Behavioural Brain Research, 2016 Jan 1;296:361-72. doi:10.1016/j.bbr.2015.08.025.

Ohmura Y, Yoshida T, Konno K, Minami M, Watanabe M, Yoshioka M.: Serotonin 5-HT7 receptor in the ventral hippocampus modulates the retrieval of fear memory and stress-induced defecation. Int J Neuropsychopharmacol. 2015 Dec 8. doi: 10.1093/ijnp/pyv131. Lyttle K, Ohmura Y, Konno K, Yoshida T, Izumi T, Watanabe M, Yoshioka M.: Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. Brain Res., 2015 Aug;1616:88-100. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.058.

Tsutsui-Kimura I, Yoshida T, Ohmura Y, Izumi T, Yoshioka M.: Milnacipran remediates impulsive deficits in rats with lesions of the ventromedial prefrontal cortex. Int J Neuropsychopharmacol., 2014;18(5). pii: pyu083. doi: 10.1093/ijnp/pyu083.

### [学会発表](計 13 件)

泉 剛、王 冊、大村 優、吉田隆行、吉岡充弘 「SSRI の抗不安効果は 5-HT1A 受容体を介する」 第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 11 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

吉田隆行、藤田幸大、小冷 碧、大村 優、泉 剛、吉岡充弘 「幼若期ストレスによる扁桃体錐体細胞の神経機能特性変化」 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 9 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

泉 剛、ゲブレレル ロベル、王 冊、大村 優、吉田隆行、吉岡充弘 「うつ病の動物モデルにおける扁桃体の機能亢進」 第 45 回 日本神経精神薬理学会 2015 年 9 月 26 日 タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

泉 剛、ゲブレレル ロベル、王 冊、大村 優、吉田隆行、吉岡充弘 「うつ病モデルラットの扁桃体における FKBP5 の変化」 第 66 回日本薬理学会北部会 2015 年 9 月 18 日 富山国際会議場(富山県・富山市)

吉田隆行、大村 優、泉 剛、渡辺雅彦、吉岡充弘 「扁桃体における内因性カンナビノイドを介したセロトニン遊離調節」 第 66 回日本薬理学会北部会 2015 年 9 月 18 日 富山国際会議場(富山県・富山市)

吉田隆行、大村 優、内ヶ島基政、泉 剛、渡辺雅彦、吉岡充弘 「扁桃体におけるカンナビノイドを介したセロトニン遊離調節機構」 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月 28 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

木村 生、大村 優、泉 剛、吉田隆行、吉岡充弘 「ミルナシプランの衝動性、攻撃性、抑うつ性に対する効果」 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 20 日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

泉 剛、ゲブリエ プロベル、王 冊、大村 優、吉田隆行、吉岡充弘 「うつ病モデルにおける扁桃体グルココルチコイド受容体系の変化」 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 20 日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

吉田隆行、大村 優、泉 剛、渡辺雅彦、吉岡充弘 「カンナビノイドによる扁桃体セロトニン遊離調節機構」 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 19 日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Takeshi Izumi, Yu Ohmura, Takayuki Yoshida, Mitsuhiro Yoshioka: The role of amygdalar serotonergic neural system in fear memory, Neuroscience 2014, 2014 年 11 月 15 日 ワシントン D.C.(アメリカ合衆国)

隈元晴子、山口 拓、今野幸太郎、大村 優、吉田隆行、泉 剛、吉岡充弘 「幼若期ストレスによるラットの社会行動障害と fluvoxamine 反復投与の効果」 第 65 回日本薬理学会北部会 2014 年 9 月 27 日 コラッセふくしま(福島県・福島市)

泉 剛、大村 優、吉田隆行、吉岡充弘 「SSRI の抗不安効果は扁桃体 5-HT1A 受容体を介する」 2014 年 9 月 27 日 コラッセふくしま(福島県・福島市)

隈元晴子、山口 拓、大村 優、吉田隆行、泉 剛、吉岡充弘 「幼若期ストレスによる成熟後の social interaction 行動障害に対する fluvoxamine 反復投与の効果」 第 130 回日本薬理学会関東部会 2014 年 7 月 5 日 星薬科大学百年記念館 (東京都・品川区)

[図書](計 5 件)

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 32(3):246 2014 年

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 32(4):356 2014 年

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 32(5):476 2014 年

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 32(6):604 2014 年

吉田隆行、吉岡充弘 「扁桃体-up to date 扁桃体の構造と分子機構 扁桃体の恐怖記憶の分子機構」 Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学 32(6):618 2014 年

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

大村 優 (OHMURA, yu)  
北海道大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 80597659