

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手)報告書

急性ストレス時に帯状回で起こるシナプス変化とその分子メカニズムの解明

研究代表者 北條 泰嗣 (医学部 生化学)

緒言

長期間にわたる慢性ストレスは、神経細胞を萎縮させ、樹状突起の分岐を減らす。重篤化すると神経細胞の脱落も生じる。このような慢性ストレスの作用メカニズムは、以下のようによく知られている。すなわち、ストレスホルモン(ヒトではコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロン)が受容体(GR: glucocorticoid receptor)に結合し、GRが核に移行してDNAに結合し、遺伝子転写を制御するというメカニズムである¹⁾。

これに対して、一時間程度の急性ストレスでは、樹状突起の分岐の減少などの劇的な変化は起こらない。海馬を用いた先行研究において、コルチコステロン(corticosterone, 以下CORT) 1 μ Mを1時間作用させると、頭部の大きなスパイン(シナプス後部)が増加する現象を我々は発見した²⁾。これは遺伝子転写を伴わない、ステロイドの新しい分子メカニズムに基づくものであることも我々は証明した^{3,4)}。

前部帯状回(anterior cingulate cortex: ACC)は、注意・共感・意思決定といった高次の機能を司り、海馬と並んでストレスに対して脆弱な部位である^{5,6)}。しかし、この部位に対する急性ストレス作用については全く分かっていない。そこで、本研究では、ストレスホルモンであるCORTが前部帯状回に急性的に作用したときに、どのように応答するのか、(1)神経回路レベル(2)細胞・シナプスレベルで解析することを試みた。神経回路レベルでは前部帯状回が活動する時に発する、神経回路の発振現象(oscillation)に着目し、これがCORT作用時にどう変化するかを解析した。次に、そのような発振現象に必要な神経回路の構成要素のうち、どこにCORTが作用するのか、その作用サイトの特定を、GRに対する免疫組織染色を用いて解析した。

材料と方法

すべての実験は埼玉医科大学動物実験指針に従い、埼玉医科大学動物実験委員会の承認を得たうえで行われた。実験動物の使用数を減らすように努めた。実験動物にはC57/BL6J系統のマウス(両性)またはWistar系統のラット(両性)を用いた。

(1) 電気生理学的測定

スライス標本作成およびグルココルチコイド処理

イソフルランを気化させた麻酔によりマウスを深麻酔した後、断頭して脳を取り出した。取り出した脳は直ちに95% O₂/5% CO₂混合ガスで飽和した氷冷Na-Choline Chloride置換液(組成: 120 mM 塩化コリン, 3 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 28 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 22 mM グルコース)中で冷却したのち、ろ紙上に移して小脳よりも後ろの部分を冠状断で除いた。続いてスライサー(Leica VT1000S, Germany)のチャンバー上に脳を固定し、チャンバー内を95% O₂/5% CO₂混合ガスにて飽和した氷冷Na-Choline Chloride置換液で満たし、前部帯状回を含む冠状断脳スライス(厚さ450 μ m)標本作成した。脳スライス標本は人工脳脊髄液(aCSF: artificial cerebrospinal fluid; 組成: 120 mM NaCl, 3 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 15 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂)を回復液として、95% O₂/5% CO₂混合ガスで満たされたチャンバー内にて室温で1時間以上静置した。

急性ストレスを再現するために、脳スライス標本に1 μ MのCORT溶液を作用させ、さらに1時間静置した。対照群として、CORT溶液の代わりにaCSFを作用させ、1時間静置した脳スライス標本を用いた。

細胞外集合電位の記録

作成したスライス標本を、正立型顕微鏡ステージ上の記録用サブマージ型チャンバーに移し、前部帯状回(Cg1領域)における皮質表層(II/III層)を確認しながら記録を行った。記録中、スライス標本は、95% O₂/5% CO₂混合ガスで飽和したaCSF(32~33 $^{\circ}$ C)を灌流し(流速6 mL/分)、十分に酸素を供給した。記録電極はホウケイ酸ガラスキャピラリーを電極プレーで加熱して作成し、電極内部は0.5 M NaClで満たした。電極は抵抗が2~4 M Ω のものを使用した。

前部帯状回の神経回路が発する発振現象(network oscillation)を再現するために、3 μ Mカイニン酸(kainite: KA)/aCSF溶液を1分間灌流し、前部帯状回の神経細胞を興奮させ、神経ネットワークを活動させた。ここからアンブ(WPI, DAM80, USA)を用いて細胞外集合電位を測定し、ADコンバータとソフトウェア(Axon Instruments,

Digidata1440A, USA) を介してコンピュータに取り込んだ。
データ解析

解析領域 (60 秒間) は、KA 投与による細胞外集合電位が最大となる点を含むように設定した。本研究では、通常、KA 灌流開始から 40 ~ 60 秒後にこの最大点が現れた。記録した細胞外集合電位は高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform: FFT) を用いて、パワースペクトル密度 (power spectral density: PSD) を計算し、各周波数帯域 (θ : 3-8 Hz, α : 8-12 Hz, β : 13-30 Hz, low γ : 30-50 Hz, high γ : 50-80 Hz) のパワーを CORT 投与群と対照群で比較した。

(2) 免疫組織染色

灌流固定から凍結切片作成

実験動物 (マウスまたはラット) を深麻酔し、胸部を開いて心臓を露出させた。血液中に含まれるペルオキシダーゼを除去するために、ペリスタポンプを用いて心臓から PBS (組成: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , 0.02 % EDTA · 4Na (w/v)) を血管内に送り込んだ (灌流)。灌流液は、全て水冷した状態で送り込んだ。実験動物体内の血液が PBS に置き換わった時点で、灌流液を PBS から 4 % パラホルムアルデヒド / PBS 溶液に切り替えて、約 30 分間灌流し、臓器を固定した。固定が終了した実験動物から脳を取り出し、4 % パラホルムアルデヒド / PBS 溶液に浸し、4 °C で 24 から 48 時間、後固定 (postfixation) した。後固定した脳を、凍結による組織の破壊を防ぐために、30 % ショ糖溶液 (30 % sucrose in PBS (w/v)) に浸し、脳が完全にショ糖溶液に沈むまで 4 °C で静置した (cryoprotection)。cryoprotection 処理した脳の前部帯状回を含む領域を、冠状 (coronal) に約 2 mm の厚さに切断し、コルク板の上に置き、水性包埋液 (O.C.T. Compound; SAKURA, Japan) を用いて包埋した後、液体窒素で冷やしたイソペンタンに浸して急速凍結した。凍結・包埋した前部帯状回を含む脳組織は、使用直前まで -80 °C で保存し、使用時にクリオスタット (CM1900; Leica, Germany) を用いて、-15 °C において 20 ~ 30 μm の厚さに切断し前部帯状回を含む脳切片を作成した。

免疫組織染色: ABC (Avidin-Biotin Complex) 法

前部帯状回切片を過酸化水素-メタノール溶液 (0.3 % H_2O_2 , in absolute methanol) に 30 分間浸し、切片内の内因性ペルオキシダーゼを失活させた。切片を PBS で洗浄した後、非特異的な抗体結合を防ぐために、ブロッキング溶液 (5 % 正常ヤギ血清, 3 % スキムミルク, 0.5 % Triton X-100 in PBS) 中に移し、室温で 2 時間浸透させた。

一次抗体溶液 (anti-glucocorticoid receptor antibody – ChIP grade ab3579, abcam, USA) に脳切片を浸して 4 °C で抗原抗体反応させた。希釈率は 1: 1000, 反応時間は 18 時間とした。

一次抗体との抗原抗体反応後、脳切片を PBST (0.5 % Tween 20 in PBS) に 5 分間浸し、余分な一次抗体を洗浄した。洗浄は 3 回行なった。次にビオチン標識抗ウサギ

IgG 抗体 (Vector Lab.) を 0.5 % スキムミルク (0.5 % skim milk in PBS) で希釈し (希釈率 1: 200), ここに洗浄済みの脳切片を移して、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体を一次抗体に結合させた。反応は、室温で 30 分間行なった。

ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体との反応後、PBST を用いて脳切片を 5 分間 3 回洗浄した。次に、アビジン・西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体 (Vector Lab., USA) を 0.5 % スキムミルクで希釈し (希釈率 1: 100), ここに洗浄済みの脳切片を移して、アビジン・西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体をビオチンに結合させた。反応は、室温で 30 分間行なった。

アビジン・西洋わさびペルオキシダーゼ複合体との反応後、PBST を用いて脳切片を 5 分間 3 回洗浄した。洗浄後の切片を発色液 (0.05 % diaminobenzidine: DAB, 0.1 % H_2O_2 , 0.3 % ammonium nickel sulfate in Tris-HCl buffer (pH 7.2)) に 2 ~ 20 分浸し、GR を検出した。

発色した脳切片は、エタノール希釈列 (20 %, 40 %, 80 %, 100 % のエタノール溶液) に 5 分間ずつ順次浸した後、キシレンに 5 分間浸して、脱水・透徹を行った。脱水・透徹した脳切片は、キシレン系封入剤 (エンテランニュー) を用いてカバーガラス内に封入し、顕微鏡で観察した。

免疫組織染色: 蛍光二重染色法

ABC 法で用いた抗 GR 抗体と、パルブアルブミン (parvalbumin: PV) に対する抗体を一次抗体として用いて、二重染色を行った。希釈率は抗 GR 抗体が 1: 500, 抗 PV 抗体が 1: 1000 とし、反応時間は 18 時間とした。

染色は ABC 法に述べた方法と同じ手順で行った。ただし、一次抗体処理ののち、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体処理の代わりに Alexa Fluor[®] 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ThermoFisher Scientific, USA) を用いて GR の一次抗体に結合させて蛍光標識した。PV は Alexa Fluor[®] 555 標識抗マウス IgG 抗体 (ThermoFisher Scientific, USA) を一次抗体に結合させて蛍光標識した。二次抗体の希釈率はともに 1: 1000 であり、反応時間は 1 時間である。蛍光標識した脳切片は、FluorSave を用いてカバーガラス内に封入した。Alexa Fluor[®] 488 および Alexa Fluor[®] 555 から発する蛍光は、蛍光顕微鏡 (BZ 9000 または BZ X710, Keyence, Japan) を用いて観察した。

結果

(1) 電気生理学的手法による前部帯状回神経回路発振

3 μM KA を 1 分間灌流し、前部帯状回の神経回路に発振を誘導したところ、対照群、CORT 処理群ともに細胞外集合電位の発振活動が記録された (図 1)。FFT を用いて、図 1 で記録された信号のパワースペクトル密度 (PSD) を計算したところ、CORT 処理群ではパワーが減少する傾向が観察された (図 2)。各周波数帯域 (θ : 3-8 Hz, α : 8-12 Hz, β : 13-30 Hz, low γ : 30-50 Hz, high γ : 50-80 Hz) に分割して解析した結果、ピークを示す帯域は対照群、CORT 処理群ともに 13-30 Hz の β 帯域で変わらなかった。パワーの減

少はβ帯域が最も大きかった。

(2) 前部帯状回におけるGRの局在解析

方法に述べたABC法に従い、ラット、マウスの前部帯状回を含む脳切片でGRの局在を検討した(図3)。DABを用いて発色させた結果、ラット、マウスともに前部帯状回に染色が確認された(図3左、マウスのみ)。染色された細

胞種を特定するために、抗PV抗体と抗GR抗体を用いて、蛍光二重染色を行った。その結果、ラットの前部帯状回において、PVを発現する細胞とGRを発現する細胞の一部が重なった(図3右)。マウスに関しては、この方法ではGRが染色されなかった。

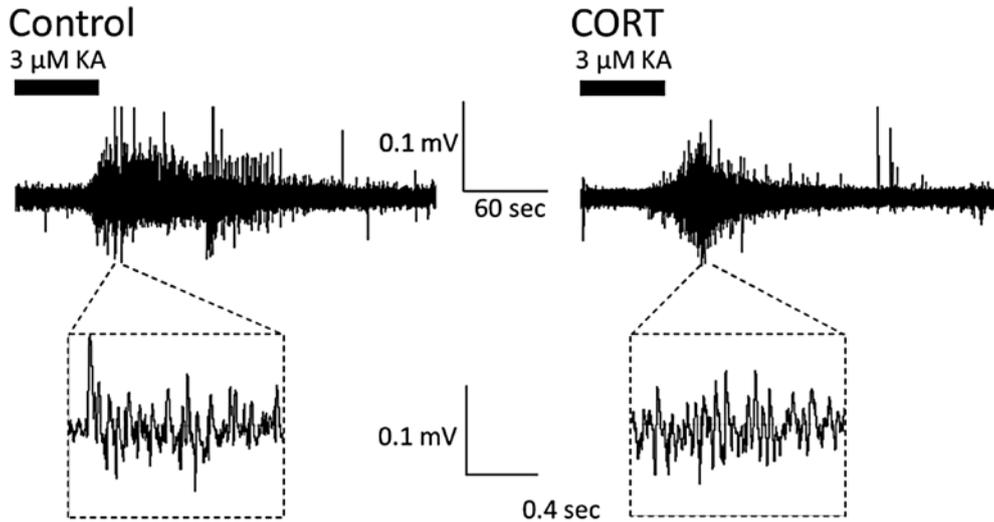


図1. 前部帯状回における細胞外集合電位の発振活動の例。前部帯状回スライスに3 μM KAを1分間灌流し(黒横棒)、誘発される発振活動を解析した。Control: 対照群, CORT: CORT処理群。

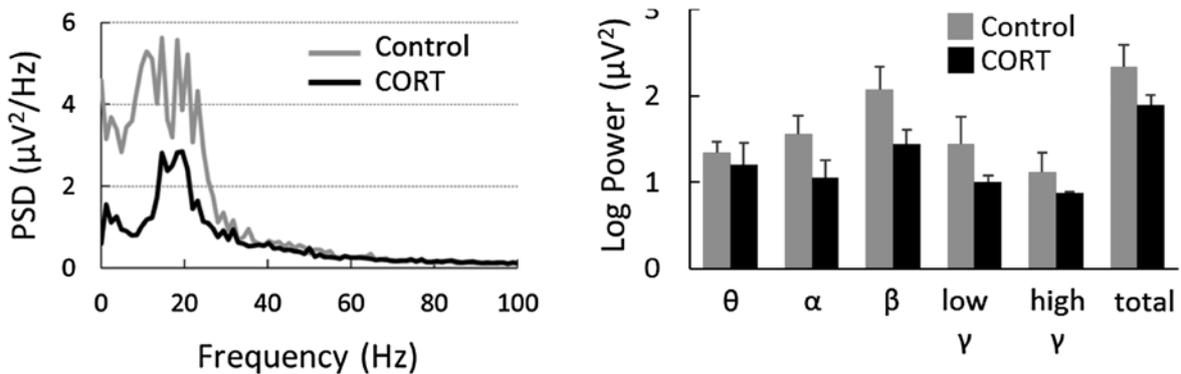


図2. (左) 前部帯状回細胞外集合電位の発振活動のパワースペクトル密度(PSD)の例。(右) 各周波数帯域におけるパワーの比較(対照群, CORT処理群ともにn=3)。CORT処理群でパワーの減少傾向がみられるが、有意差はなかった。

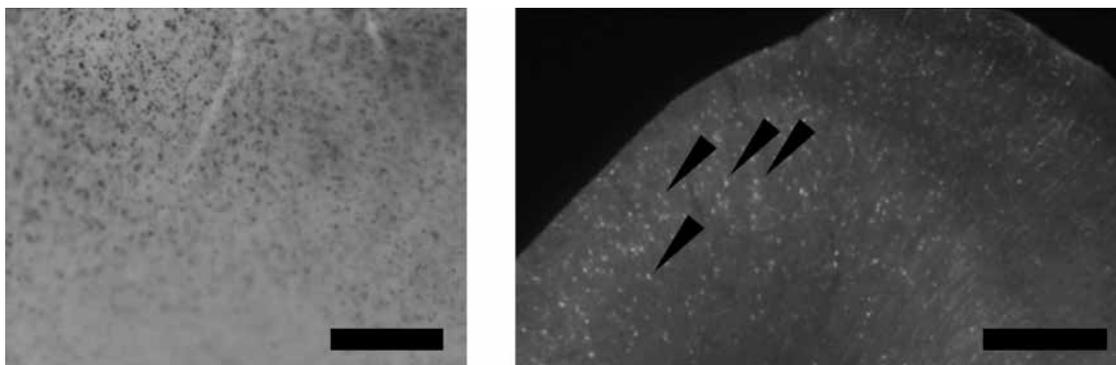


図3. (左) マウス前部帯状回凍結切片におけるGRの局在。DAB発色。前部帯状回にはGRが存在する。Scale bar, 300 μm。(右) 抗GR抗体と抗PV抗体を用いた、ラット前部帯状回凍結切片の傾向二重染色像。GRとPVがともに発現する細胞が観察された(矢印)。Scale bar, 600 μm。

考 察

本研究により、CORTは1時間程度の短時間で前部帯状回の神経回路の発振 (oscillation) を抑える傾向があることがわかった。このことから、急性ストレスによって前部帯状回の神経回路活動が抑制されると示唆される。前部帯状回の神経活動の発振は、この部位の機能と密接に関連しているという研究が報告されている⁷⁾。本研究は、その機能を急性ストレスが弱めることを示唆するものである。有意差は出ていないが、これは実験の例数が未だ少ない(対照群、CORT処理群ともに3例ずつ)ためと考えられ、今後、実験を追加することで、前部帯状回に対する急性ストレス効果を明らかにすることができると期待している。

前部帯状回の発振を生じさせる神経回路は、興奮性のグルタミン酸作動神経と抑制性のGABA (gamma-aminobutyric acid) 作動性神経から構成される⁷⁾。本研究では、急性ストレスの作用サイトとしてGRを想定し、GRが神経回路のどの構成要素に局在しているかを解明することを試みた。その結果、PV陽性のGABA作動性神経にGRが局在していることがわかった。PV陽性のGABA作動性神経は、別名fast-spiking neuronとも呼ばれ、神経細胞の集団が同期して活動するタイミングを制御している⁸⁾。本研究の結果から、CORTはPVに存在するGRを通じて神経細胞集団の活動の同期を弱め、発振のパワーを減少させたと考えられる。ただし、DABによる発色では確認されたマウスのGRが、蛍光染色においては観察できなかったことから、蛍光染色の感度を向上させることが今後の課題である。また、前部帯状回の神経活動の発振に関わる、別の構成要素、例えば、グルタミン酸作動神経やPV陽性以外のGABA作動性神経にGRが局在することの解明も必要であると考えられる。さらには、より微細なシナプスレベルの変化も観察したい(現在、準備中)。

謝 辞

本研究の遂行にお力添えいただきました、埼玉医科大学研究マインド支援グラントに深く感謝申し上げます。また、研究代表者の実験など様々な面でご支援くださいました、埼玉医科大学大学生化学教室の皆様がこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

1) McEwen BS, Morrison JH. The brain on stress:

vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 2013; 79(1): 16-29.

- 2) Komatsuzaki Y, Hatanaka Y, Murakami G, Mukai H, Hojo Y, Saito M, et al. Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus. *PLoS One* 2012; 7(4): e34124.
- 3) Hojo Y, Munetomo A, Mukai H, Ikeda M, Sato R, Hatanaka Y, et al. Estradiol rapidly modulates spinogenesis in hippocampal dentate gyrus: Involvement of kinase networks. *Horm Behav* 2015; 74: 149-56.
- 4) Ikeda M, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Okamoto M, Kato A, Takeda T, et al. Hippocampal spine changes across the sleep-wake cycle: corticosterone and kinases. *J Endocrinol* 2015; 226(2): M13-M27.
- 5) Jeon D, Kim S, Chetana M, Jo D, Ruley HE, Lin SY, et al. Observational fear learning involves affective pain system and CaV1.2 Ca²⁺ channels in ACC. *Nat Neurosci* 2010; 13: 482-8.
- 6) Singer T, Seymour B, O'Doherty J, Kaube H, Dolan R, Frith CD. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science* 2004; 303: 1157-62.
- 7) Uehara T, Sumiyoshi T, Kurachi M. New Pharmacotherapy Targeting Cognitive Dysfunction of Schizophrenia via Modulation of GABA Neuronal Function. *Curr Neuropharmacol* 2015; 13(6): 793-801.
- 8) Hu H, Gan J, Jonas P. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* 2014; 345(6196): 1255263.

研究成果リスト

論 文

- 1) Shinozaki R, Hojo Y, Mukai H, Hashizume M, Murakoshi T. Kainate-induced network activity in the anterior cingulate cortex. *Neuroscience* 2016; 325: 20-9.

学会発表

- 1) 北條泰嗣, 篠崎吏那, 橋爪幹, 村越隆之. 前部帯状回の神経回路発振に及ぼすストレスホルモンの影響. 第39回日本神経科学大会, 2016年7月, 神奈川県横浜市