

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

多重ストレス誘発性精神病態モデルにおける前部帯状回オシレーション異常の解明

研究代表者 篠崎 吏那 (医学部 生化学)

緒言

前部帯状回 (ACC) は前頭前皮質 (mPFC) に含まれ、扁桃体や海馬とも相互の神経連絡をもち、情動機能への統合的な役割がある。その背景として、mPFCの興奮が扁桃体の抑制をもたらし、いずれもが中脳腹側皮蓋野 (VTA) からのドーパミンの影響を受けることが解明されている。また、前部帯状回における神経回路オシレーション (特に速い周波数) は、覚醒時や注意時に頻繁に観察され、知覚等高次機能の基盤となることが推定されている。その際、異なる領野の脳機能を連合、統合し、局所回路内ではシナプス可塑性を調節することが重要である。また、GABA作動性ニューロンがオシレーションのリズミクな活動を起こすために重要な役割を担っている。

一方、精神疾患、特に統合失調症脳ではこのGABA作動性ニューロン機能が減弱していることがわかっている。殊に、カルシウム結合タンパク質のバルブアルブミン (Pv) 陽性GABAニューロンが本質的な役割を担っており、その機能の減弱が知られている¹⁾。

さらには、統合失調症等の精神疾患の増悪因子として、遺伝子背景とともに生後環境によるストレスが考えられ、ストレスによる直接的影響の一つとしてGABAニューロン機能減弱が予想されている。そこから考えられる結果としては、複数のストレスが加わるほど、前部帯状回におけるオシレーションの異常が強くなり、加えてアミン系の作用にも正常と異なるプロファイルが見られると予想される。それと並行してGABAニューロンおよびドーパミン受容体の数的質的変化が観察されることが期待される。

以上より、統合失調症を基本とした認知情動機能異常の病態の一面を理解するうえで各種ストレス負荷とGABA機能、オシレーション活動との相互関係を解析することは重要な意義をもつと考えた。そこで、methylazoxymethanol acetate (MAM, 細胞増殖阻害剤) 投与による統合失調症様モデルマウスの作製とそのオシレーション活動を解析し、それに加えて、生後直後の母子分離によるストレス、慢性拘束ストレスによる若年期のストレス、さらにそれらの組み合わせによる多重ストレスによるオシレーション活動の変化をGABAニューロン異常とアミン性修飾との関係に焦点を

あてて解析することを最終課題とし、本研究期間においてはその中の若年期の拘束によるストレスとオシレーション活動について解析を試みた。

材料と方法

本実験は埼玉医科大学動物実験規定に即し、埼玉医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。実験動物の使用数は必要最小限になるよう努めた。

慢性拘束ストレス

マウス (C57BL/6J) 雄に対し生後4週齢から7日間連日、1日にあたり2時間の身体的拘束を行った。具体的にはチューブにマウスを閉じ込め、動けないようにし、2時間後もとのケージへ戻した。コントロール群に関しては、そのままケージで飼育した。実験は最終日の翌日より行った。

強制水泳試験

拘束の最終日に行動学的な変化を調べるため、強制水泳試験 (24 ~ 26 °C の水中に6分間放った際に泳ぎを諦めて不動となる時間を測定) を行った。

電気生理

In vitro 電気生理学的実験としてマウスをイソフルラン吸入深麻酔下により断頭による安楽死後、脳を取り出してスライス切片を作製した。スライスは人工脳脊髄液 (ACSF: artificial cerebrospinal fluid; 組成: 120 mM NaCl, 3 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 15 mM glucose, 2.5 mM CaCO₃, 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。その後、前部帯状回領域の浅層から細胞外電極を用いてフィールド記録を行った。細胞内液には0.5 M NaClを使用した。スライス標本では自家発火が起きにくいいため、カイニン酸 (KA; グルタミン受容体作動薬) を使用し、オシレーションを誘発した。1枚のスライスに対してACSF灌流下で、カイニン酸を1分間暴露し誘発されたオシレーション (1st KA) と次にドーパミン (DA; 10 μM) またはノルアドレナリン (NA; 10 μM) をそれぞれ10分間

灌流させ、それら薬剤存在下でのカイニン酸を暴露し誘発されたオシレーション(2nd KA)とを比較した(図1)。データは、pClampにより解析し、power spectrum density (PSD)を θ (4-7Hz), α (7-12Hz), β (12-30Hz), γ (30-80Hz)の周波数帯域に分けて積分し、powerの値を算出した。

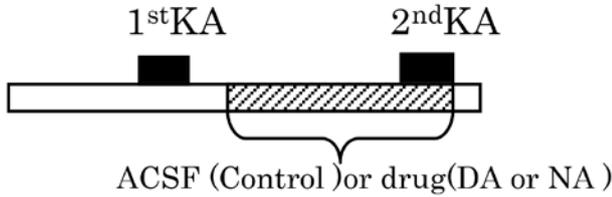


図1. カイニン酸 (KA) 暴露の手順。

結果

拘束をかけたことにより、CRS群はコントロール群に比べるとマウスの体重増加が少なく、胸線も委縮していた。副腎重量に関しては、やや増加傾向を示した(表1)。行動学的実験として、強制水泳試験を行った結果、拘束をかけると不動時間がやや短くなった(図2)。

表1. コントロール群とCRS群の体重、胸線、副腎重量

	コントロール群 (n=23)	CRS群 (n=18)	p
体重(g)	21.1	19.0	p<0.001
胸線(mg)	69.1	36.9	p<0.001
副腎(mg)	3.3	3.6	p<0.01

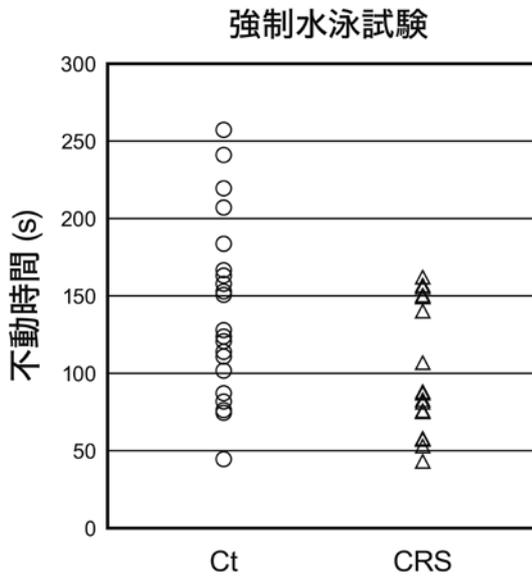


図2. 強制水泳試験の不動時間(s).

オシレーションに関しては、コントロール群と比べてCRS群のオシレーション活動は小さくなった。周波数帯域を解析してみると、特に β 帯域での統計学的に有意な減少がみられた(図3, 4)。

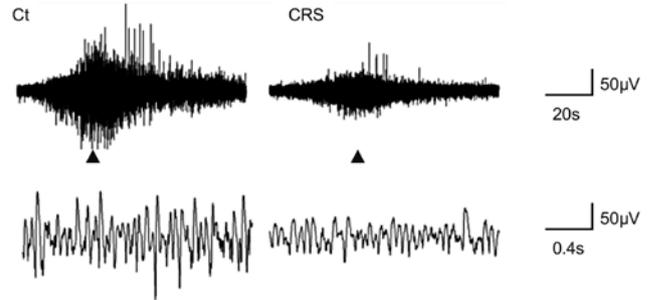


図3. 3 μ Mカイニン酸を暴露したときのオシレーションと拡大図: 左図がコントロール群 (Ct), 右図が拘束をかけたマウス (CRS)。

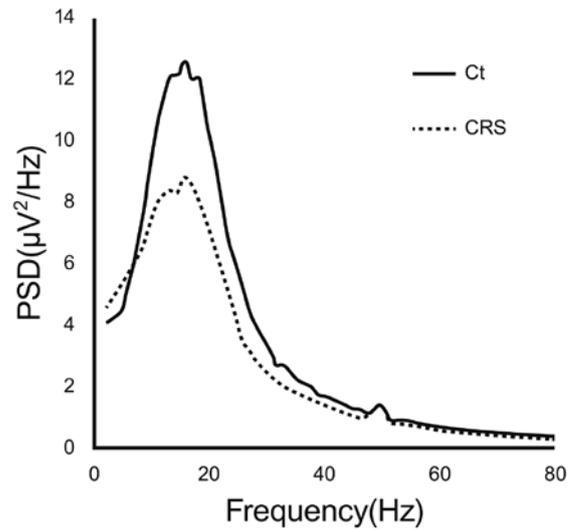


図4A. 3 μ Mカイニン酸を暴露したときのオシレーションのパワースペクトルの平均(実線がCt, 点線がCRS) Ct recording: n=85, CRS recording n=92.

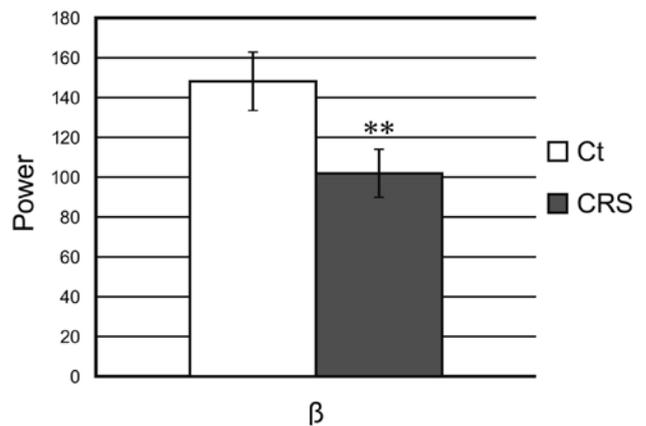


図4B. オシレーションパワー β 帯域 (13-30 Hz) のCtとCRSの比較 ** p < 0.01 (Mann-Whiney U-test).

また、同じスライス上で 1st KA と 2nd KA のオシレーションパワーの比率をコントロール群と CRS 群で比較することで DA および NA の修飾作用を解析したところ、CRS 群では DA の増強が非常に強く、特に θ 領域において有意に大きかった。これに対し、NA はコントロール群と CRS 群の間で差がなかった。

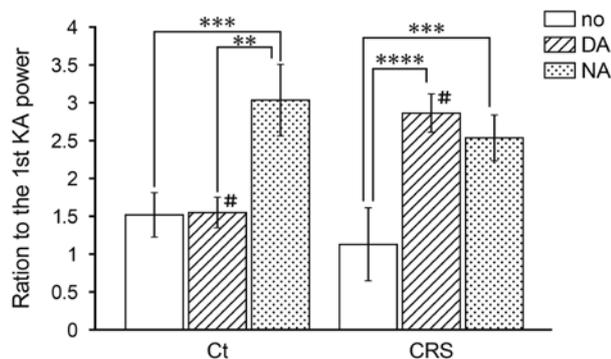


図 5. θ 領域 (3-8Hz) での 2nd KA / 1st KA 比率
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$
 #; Ct (DA) と CRS (DA) で $p < 0.01$ (2要因分散分析).

考 察

拘束をかけたマウスの胸線が萎縮していたことや、副腎重量がやや増加していたため、ストレスをうけた効果が表れたと思われる。また、強制水泳テストで不動時間が短くなったことから、行動量が増加したと考えられる。

電気生理学的実験では、拘束をかけたマウスの KA 誘導によるオシレーションパワーの減弱がみられた。先行研究よりストレスを受けると GABA 機能の減弱が起こることが分かっている²⁾。このことから、GABA ニューロンの数

の減少もしくは GABA シナプス機能の抑制が考えられる。

θ 領域では、拘束をかけたマウスでは DA 存在下でオシレーションパワーの比率が増加した。この結果から、アミン系の修飾作用の少なくとも一部に影響を与えていることが示唆された。

参考文献

- 1) Cunningham MO, Hunt J, Middleton S, LeBeau FE, Gillies MJ, Davies CH, et al. Region-specific reduction in entorhinal gamma oscillations and parvalbumin-immunoreactive neurons in animal models of psychiatric illness. *J. Neurosci* 2006; 26: 2767-76.
- 2) Ito H, Nagano M, Suzuki H, Murakoshi T. Chronic stress enhances synaptic plasticity due to disinhibition in the anterior cingulate cortex and induces hyper-locomotion in mice. *Neuropharmacology* 2010; 58: 746-57.

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*. 2016.06. 325: 20-9.

学会発表

- 1) 篠崎吏那, 北條泰嗣, 向井秀夫, 橋爪幹, 村越隆之. カイニン酸誘導性前帯状回神経回路オシレーションの特性と慢性エタノール投与の作用, 第 39 回日本神経科学学会大会, 平成 28 年 7 月, 横浜