

論文内容の要旨

論文題目

マウスの行動および前部帯状回シナプス機能に与える
慢性ストレスの影響

The effects of chronic stress on behavior and synaptic function
in the anterior cingulate cortex in mice

氏名 伊藤 浩志

【緒言】

本研究は、慢性ストレスによる情動行動の変化、および情動に関わる脳部位の機能変化をシナプスレベルで解析することを目的とした。

研究対象とした前部帯状回（以下 ACC）は辺縁系に属し、ストレスに対して脆弱な部位である。うつ病、統合失調症などストレスが関連する精神疾患で体積減少などが報告されている。げっ歯類では、ストレスにより ACC 第 II/III 層錐体細胞の樹状突起に形態学的な変化が起きることが知られている。ACC を含む前頭前野内側部（mPFC）は、海馬とともにストレス応答系である視床下部-脳下垂体-副腎皮質系（HPA 軸）の制御に関与するが、ストレスにより mPFC の制御機能が低下する可能性が示唆されている。このように、ACC の形態や機能がストレスによって変化し、情動行動に影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかしながら、慢性ストレスによる情動行動変化に関連した ACC の機能変化をシナプスレベルで解析した研究は、これまでほとんど行われてこなかった。そこで ACC に焦点を絞り、これら変化の詳細を検討することにした。

【研究の目的】

4 週齢目のオスマウス（C57BL/6J）に対し 1 日 2 時間、1 週間の慢性拘束ストレス（以下 CRS）を加え、5 週齢目に行動実験と電気生理学的実験を行い、CRS

が行動および ACC 第 II/III 層シナプス機能に及ぼす影響を解析した。併せて、CRS による ACC シナプス機能変化における左右非対称性について検討した。

【行動学的実験の方法・結果と考察】

CRS によるマウスの行動変化として、情動に関連する行動と考えられる活動量、不安様行動、および恐怖条件刺激に対する情動学習能力の変化を、それぞれオープンフィールドテスト、明暗選択テスト、恐怖条件付けテストによって解析した。その結果、CRS によりマウスの行動が多動となった。恐怖条件付けテストでは、すくみ行動が減少することが明らかになった。

1. 行動の多動化

オープンフィールドテストでは、CRS 群でコントロール群に対し、移動距離、中央エリア内での滞在時間、立ち上がり回数が増加した。不安様行動の評価に特化した行動実験である明暗選択テストでは、明箱での滞在時間、および暗箱から明箱に最初に入る潜時には、両群間で有意差はなく、CRS によって不安様行動は増加していないことが示された。これらの結果から、1 週間の拘束ストレスによって、マウスは多動となったと考えられる。

2. すくみ行動の減少

恐怖条件付けテストでは、文脈依存性テスト、聴覚刺激依存性テストいずれにおいても、CRS 群はコントロール群に比べすくみ行動が減少した。これらは情動学習能力が低下した可能性と同時に、多動の二次的結果であるとも解釈される。

【電気生理学的実験の方法・結果と考察】

ACC シナプス機能に対する CRS の影響を、電気生理学的、および薬理学的手法を用いて解析した。CRS 負荷後、マウス脳より ACC を含むスライス標本作製し、細胞外電位記録法によりフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を測定、シナプスの短期可塑性、長期可塑性、ドーパミンによる修飾作用に対する CRS の影響を解析した。またホールセルパッチクランプ法により自発的な微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) および微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC)、誘発刺激による興奮性シナプス後電流 (EPSC) を測定した。併せて、mIPSC に対する CRS の影響における左右非対称性について検討した。

その結果、CRS による GABA 神経系の機能低下と、それに起因する興奮性シナプスの短期および長期可塑性の増大が明らかになった。さらに、CRS はドーパミンの修飾作用を減じること、抑制性シナプスに与える影響には左右非対称

性があり、右脳でのみ GABA 神経系の機能が低下していることが示された。

1. GABA 神経系による抑制の減弱

細胞外電位記録法を用いて ACC 深部層刺激に対する ACC 第 II/III 層での fEPSP slope 測定の結果、刺激強度-fEPSP slope の量的関係は CRS による変化がなかった。しかし fEPSP slope の時間幅 (half width) はコントロール群に比べ CRS 群で延長しており、コントロール群については GABA_A 受容体拮抗薬 (bicuculline) 適用により half width が延長することで両者の差がなくなることが分かった。

ホールセル記録法を用いた mIPSC 解析の結果、コントロール群に比べ CRS 群では振幅は維持されたまま頻度が低下していた。一方 mEPSC に関しては振幅、頻度ともに変化がなかった。

次に、50 ないし 100 ms 間隔での 2 発連続刺激時の fEPSP slope 比 (PPR: paired-pulse ratio、2 発目 fEPSP slope / 1 発目 fEPSP slope) は CRS により増大し、これも bicuculline 適用により有意差がなくなった。このことはホールセル記録による刺激誘発性の EPSC の振幅の比較からも再現された。すなわち膜電位を -45mV に固定した場合の PPR は CRS 群の方が高いが、GABA 受容体を介する抑制性伝達の効果が現れにくい -70mV での記録においては差がなく、-45mV 測定でも bicuculline を適用するとコントロール群と有意差がなくなった。

一方、興奮性神経伝達そのものに関しては、EPSC の振幅の比較、および EPSC のうちの NMDA 受容体に媒介される成分の比較から両群の間で有意差がなかった。

これらの結果は、1) CRS により GABA ニューロンによる抑制性伝達が減弱し、2) その結果、興奮性伝達のうち、時間経過の遅い成分や 2 発目の反応に対しての GABA 抑制が少なくなることで、fEPSP slope 時間幅の延長と PPR の増大が起こった、という共通のメカニズムにより説明される。

これらのことから、CRS によりグルタミン酸ニューロンによる興奮性シナプス自体は無変化であるものの、ACC 内 GABA 神経系の機能が低下することで、第 II/III 層錐体細胞の興奮性が高まっている可能性が示唆された。

2. 長期可塑性の増大

細胞外記録にてテスト刺激 (0.05 Hz) による fEPSP slope を記録し、反応が十分に安定化したところでシータバースト刺激 ([<100 Hz・4 回> を 5 Hz ・5 回] これをさらに 0.2Hz ・5 回) による条件刺激を与え、それ以降のテスト刺激に対する fEPSP slope の変化を観察した。CRS 群で条件刺激 25-30 分後における長期増強 (LTP: long-term potentiation、条件刺激前の fEPSP slope に対する条件刺激後

の fEPSP slope の比率) は、コントロール群で 124.5% に対し CRS 群では 141.2% と有意に増大していた。Bicuculline の灌流適用で同様の実験を行うと、コントロール群の LTP が増大し、CRS 群との有意差はなくなった。

次に、条件刺激として 1Hz・900 回を与え、どのように長期抑圧 (LTD: long-term potentiation) が起こるかを観察した。この結果コントロール群では LTD が起こらなかったのに対し、CRS 群では条件刺激前に比し 25–30 分後では fEPSP slope が 85.5% に減少するという LTD が発現した

これらのことは、CRS により ACC 第 II/III 層興奮性シナプスの長期可塑性が増大したことを示し、CRS による GABA 神経系抑制機能の減少により錐体細胞の興奮性が高まった結果である可能性が考えられた。

3. ドーパミンに対する反応の低下

コントロール群では、ドーパミン (10、30、100 μ M) の灌流適用により濃度依存的に fEPSP slope が減少した。CRS 群ではこのドーパミンによる興奮性伝達の修飾作用が見られず、ドーパミンに対する反応が低下していることが示された。このことから CRS 群マウスでは脳内でドーパミンが過剰状態になっており、受容体のダウンレギュレーションが惹起されている可能性が考えられる。

4. CRS による GABA 抑制変化における左右非対称性

CRS により ACC 内 GABA 神経系の機能低下が明らかになったので、さらに mIPSC について、コントロール群、CRS 群それぞれにつき右脳と左脳による違いがないかを検討した。その結果、CRS 群右脳ではコントロール群右脳に対して頻度が減少しているのに対し、左脳では、両群間の頻度に有意差はなく、振幅は右脳、左脳ともに両群間で有意差がなかった。またストレスによる影響を受けにくいと考えられる視覚野からの脳スライスを用いて同様に左右差の検討を行ったところ、コントロール群、CRS 群の左右 ACC 4 グループ間のいずれでも頻度、振幅に有意差は認められなかった。このことから、右脳のみにかかる GABA 神経系の機能低下は、スライス作成手技や実験操作による人為的な理由に由来するのではなく、ストレス反応の一部であることが示唆された。

【全体的考察】

慢性ストレスにより ACC における GABA 神経系の機能が低下、ACC 興奮性シナプス伝達の短期および長期可塑性が増大することが本研究で明らかになった。行動実験により示された個体レベルでの多動化とすくみ行動の減少といった行動変化は、ACC での GABA 神経系の機能低下により出力細胞である錐体細胞の興奮性が高まり、加えて ACC でのシナプス可塑性が増大したことと関連し

ている可能性が示唆される。多動化のメカニズムとしてはさらに中脳からのドーパミン投射の調節作用の亢進が関与し、その点にも GABA ニューロン抑制系の変化が関係する可能性が考えられる。

さらに脳機能に対する CRS の影響に、左右非対称性があることが明らかになった。うつ病や統合失調症などストレスが関連する精神疾患で、右脳と左脳で非対称的な障害が報告されている。今回、*in vitro* の実験系によりシナプスレベルで検出可能な脳の非対称性を発見したことにより、今後マクロレベルでの脳の非対称性がいつ、どのように生じるのか、ストレスが関連する精神疾患の発症に脳の非対称性がどのように関わっているのかについて、物質的な基盤に基づいた研究を行う足がかりが得られたものと考えられる。