

学位論文題名

# The development of the central 5-HTergic systems and early postnatal stress

(セロトニン神経の生後発達と幼若期ストレス)

## 学位論文内容の要旨

**[Background and Objectives]** It is well known that serotonin (5-hydroxytryptamine: 5-HT) neuronal system is involved in the regulation of emotional stress. Especially, the midbrain raphe nuclei such as the dorsal raphe nucleus (DRN) and median raphe nucleus (MRN), the main origins for ascending 5-HTergic projections to the forebrain, are considered to play a critical role in the regulation of stress responsiveness. Serotonin is one of the earliest developing neurotransmitter systems in the mammalian brain and eventually becomes one of the most widely distributed systems in the brain, contacting most cells of the cortex. Thus, the 5-HTergic system develops early enough, and is widespread enough that it can influence maturation of many other cells in the brain. Given the association with the development of the 5-HTergic systems and its prominent role in maturation, early life stress might lead to persistent changes in the 5-HTergic systems, and may alter the response to emotional stress later in life. I examined whether early postnatal stress influences the 5-HTergic system underlying regulation of emotional stress in adult rats, focusing on the neural developing of 5-HTergic and GABAergic interneuron in the midbrain raphe nuclei.

**[Methods]** First, I investigated the postnatal development of 5-HTergic neuron, GABAergic interneuron and 5-HT/GABA co-localized neuron in the raphe nuclei using immunohistochemistry and *in situ* hybridization techniques of the postnatal rat brain. Secondly, I investigated pups were exposed to aversive stimuli, footshock (FS) at early postnatal period of the second week (2w) and the third week (3w). At postadolescent period (10-12 weeks old), behavioral study and the immunohistochemical study were undertaken to investigate the changes of the emotional response and neuroanatomical changes. To investigate the contribution of the DRN and MRN to anxiety-related behavior, rats were subjected electrolytic lesion of either the MRN or the DRN. Finally, I investigated whether administration of the 5-HT reuptake inhibitor, fluvoxamine (Flv), reverses the abnormal behaviors and neuroanatomical changes of 3wFS rats. For this purpose, pups were exposed to the FS once a day, 5 days repeatedly at the early postnatal period of the third week. Immediately after the exposure to the FS, rats were orally administrated the 10 mg/kg of Flv. At the postadolescent period (10-12 weeks old), behavioral studies and the immunohistochemical studies were undertaken to investigate the effects of Flv on the emotional response and neuroanatomical changes.

**[Results and Discussion]** First, I demonstrated that the postnatal development of the 5-HTergic, GABAergic neurons and 5-HT/GABA co-localized neuron in the DRN and MRN. The immunohistochemical and *in situ* hybridization studies revealed that PND21 was important period for 5-HTergic neural development in terms of the dramatic changes in its organization. It is supported that 5-HT levels continue to increase and 5-HT axons reach target areas, and the final innervation occurs robustly up until PND21. On the other hands, development of the GABAergic interneurons in the raphe nuclei might occur from during PND21 to PND28. Considering the

relevance of 5-HTergic and GABAergic development, developed 5-HTergic system may consequently exert the GABAergic development in the raphe nuclei. This hypothesis is sustained that 5-HT promotes the emergence of the GABA phenotype as demonstrated by the graft of embryonic raphe cells, and 5-HT increases GABA via increasing GAD67 and GAD65 protein in cultured rat spinal dorsal horn neurons. 5-HT/parvalbumin co-localized cells in the raphe nuclei also increased in PND21-PND28. Double immunofluorescence and double fluorescence *in situ* hybridization revealed that some 5-HTergic neurons had GAD67 or GAD65. Namely, there is strong possibility that GABA is synthesized in the some 5-HTergic neurons. Although the functional consequence of such co-release is unknown, GABA may act on autoreceptors on the presynaptic axon to regulate 5-HT release. Consistent with this possibility, the presence of presynaptic GABA receptors on 5-HTergic terminals in the substantia nigra has been suggested. 5-HTergic terminal, however, did not expressed vesicular GABA transporter in 5-HTergic projection areas. Namely, my results and previous reports suggest that 5-HTergic neurons have GAD activity, but GABA is not co-released in the 5-HTergic synaptic cleft. Recently, Jagasia et al reported that GABA regulated neural development via excitation of cAMP response element-binding protein (CREB) during developmental periods. Thus, increasing GABA in the 5-HTergic neuron during PND21-28 might contribute to the final development of the 5-HTergic neuron via excitation of CREB.

I demonstrated that the behavioral study revealed that 3wFS, but not 2wFS, induced anxiolytic behavior in response to unconditioned fear stress, which was mimicked by lesion of the MRN. The immunohistochemical experiment showed that MRN 5-HT-immunoreactive cells were decreased in the 3wFS group. These results suggest that the developmental changes of the 5-HTergic system in the MRN likely contribute to the altered behavioral responses to emotional stress in adults.

I clarified whether the early postnatal stress-induced behavioral changes would be influenced by chronic treatment with Flv or vehicle was administered once a day for 14 days in 3wFS immediately after exposure to FS. The anxiolytic behavior seen in the 3wFS was not found in the Flv-treated group (3wFS-Flv), whereas such behavior was observed in vehicle treated group (3wFS-Veh). The immunohistochemical experiment showed that MRN 5-HT/parvalbumin co-localized cells and parvalbumin positive cells were decreased in the 3wFS-Veh. These neuroanatomical changes shown in 3wFS-veh group were recovered by chronic administration of Flv. The mechanism of the reduction of 5-HT/parvalbumin co-localized cell in MRN shown in 3wFS may be correlated with the reduction of 5-HT immunoreactive cell in the MRN. Although the precise mechanism is not clear, the co-localized cell might be more vulnerable to stress. Taken together, aversive stimuli exposed at the third week disrupt normal development of the 5-HTergic and GABAergic neurons in the MRN, and consequently might cause abnormal responses to emotional stress later in life.

**[Conclusion]** In conclusion, aversive stress at postnatal third week affects the 5-HTergic development in the raphe nuclei. Consequently, dysfunctional 5-HTergic systems might impair the development of the GABAergic interneurons in the raphe nuclei and its own 5-HTergic neurons. In other words, the critical period of neural circuit development appears to exist in the 5-HTergic and GABAergic system, which may be implicated in the lifelong susceptibility to emotional stress. Furthermore, a certain pharmacological intervention might be potential to treat possibly raphe-involved disorders.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	本間	さと
副査	准教授	飛驒	一利
副査	教授	岩永	敏彦
副査	教授	神谷	温之
副査	教授	森本	裕二

学位論文題名

## The development of the central 5-HTergic systems and early postnatal stress

(セロトニン神経の生後発達と幼若期ストレス)

本研究は、幼若期の一定期間に過度のストレスを負荷すると、脳内神経回路に機能的異常が生じるとの仮説に基づき、幼若期におけるストレス負荷と脳機能発達との関連性をセロトニン (5-hydroxytryptamine: 5-HT)による情動応答調節機構に焦点を当て、行動薬理学的ならびに免疫組織化学的に検討した。本研究では、(1) 縫線核における 5-HT 作動性神経、GABA 作動性介在神経、5-HT/GABA 共存細胞の生後発達について、免疫組織化学的手法および *in situ* hybridization 法を用いて検討した。(2) 生後 2 週齢時 (2wFS 群)あるいは 3 週齢時 (3wFS 群)のラットに、嫌悪刺激である足蹠電撃ショック (foot shock: FS ; 0.5 mA, 2 秒間, 30 秒毎)を 5 回、5 日間反復負荷した。成熟期 (10-12 週齢時)に生得的な恐怖に対する行動評価系である高架式十字迷路 (elevated plus maze: EPM) 試験によって、情動ストレスに対する行動応答性を評価した。また、抗 5-HT 抗体を用いた免疫組織化学的手法により 2wFS 群および 3wFS 群の 5-HT 神経系の起始核である背側縫線核 (dorsal raphe nucleus: DRN)ならびに正中縫線核 (median raphe nucleus: MRN)の 5-HT 免疫反応陽性細胞数を測定した。情動応答に対する縫線核の役割を調べる目的で正常成熟ラットの DRN あるいは MRN を電気的に破壊することにより 5-HT 神経系を擾乱し (それぞれ DRN 破壊群、MRN 破壊群)、EPM 試験を用いて不安関連行動を計測した。(3) 3wFS 群に認められた行動異常および組織化学的变化に対して、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬である fluvoxamine 反復投与の効果について検討した。その結果、① 縫線核における、抗 5-HT 抗体を用いた免疫組織化学的検討によると、生後 3 週齢時に最も染色強度が強く認められた。脳内 5-HT 合成酵素である tryptophan hydroxylase 2 の mRNA の発現強度もまた生後 3 週齢時に強くなることが明らかとなった。縫線核において、GABA 神経のマーカーの一つである抗 parvalbumin 抗体を用いて免疫組織

化学的に検討した結果、生後 2 週齢時ではほとんど陽性細胞が認められなかったのに対して、生後 3-4 週齢時では陽性細胞が多く認められた。さらに GAD67 mRNA の発現強度は生後 2 週齢では弱く、生後 3-4 週齢時に強くなることが明らかとなった。② EPM 試験において、3wFS 群の open arm 滞在時間は有意に増加し、不安状態の低下を示した。さらに 3wFS 群の MRN の 5-HT 陽性細胞は non-FS 群に比べ有意に減少していた。MRN 破壊群は EPM 試験において open arm 滞在時間が有意に増加した。生得的な恐怖に対する 3wFS 群が示した不安水準は、MRN 破壊群の行動応答性と一致していた。③ 3wFS 群で認められた行動異常 (不安水準の低下) および組織学的変化 (5-HT/parvalbumin 共存細胞数および parvalbumin 陽性細胞数の減少) はストレス負荷直後の fluvoxamine 反復投与によって改善した。以上の結果から、生後 3 週齢時のストレス負荷は MRN における 5-HT 神経の発達に影響を及ぼし、幼若期ストレスによって機能低下した 5-HT 神経系は正常な GABA 介在神経の発達を障害することが示唆された。すなわち、5-HT 神経系および GABA 神経系の発達において、成長後の情動応答に対する感受性が変化する臨界期が存在することが示唆された。審査会において、申請者のプレゼンテーションに対し、副査の岩永教授から、5-HT/GABA 共存細胞における GABA の 5-HT 神経終末部への輸送の有無および 5-HT 陽性細胞数減少のメカニズムについて細胞死であるか、伝達物質の産生能の消失であるか、副査の神谷教授から、ストレス負荷の強度・種類による生体応答性の相違、5-HT 神経終末部における GABA 合成酵素の有無、GABA 神経のマーカーとして parvalbumin のみを用いた理由について、副査の飛驒准教授から、5-HT 神経系以外のモノアミン神経系の変化について、また副査の森本教授から、3wFS 群の動物モデルとしての意義の応用について、特に特定疾患のモデルとなりうるかどうか、また、不安水準の低下は生体に有利とも解釈できるが、その生理的意義と解釈について、また実験 3 のみで Open field test を行った理由と結果に有意差がなかったことに対する説明を求める、さらに主査の本間さと教授からは、Open field test において不安水準を検討する解析を行ったかどうか、home cage で自発行動量の比較をしたかどうか、離乳時期における影響、生後 2 週齢と生後 3 週齢の間のストレス応答性の相違、5-HT/GABA 共存細胞に存在する GABA の意義について質問がなされた。申請者はすべての質問に対して、自らの実験成績と過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。複数の審査員から、「3wFS で不安水準が低下」の表現が、「ストレス抵抗性の獲得」と解釈されること、むしろ 3wFS により「注意力や慎重さの低下、衝動性の上昇」が生じた点を強調すべきでないかとの提案があった。

この論文は、幼若期におけるストレスと成長後の行動応答性ならびに 5-HT 神経による情動調節機構との関連性を明らかにしたものであり、この研究により幼児期に受けた様々なストレスと精神疾患発現機構との関連性の理解が深まることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。