

学位論文題名

幼若期ストレス負荷による  
5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能の変化に関する神経薬理学的研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 ストレス応答に関わる脳内システムは、生後、発達の過程で形成される。幼児期に受けたストレスが成長後の情動ストレスに対する感受性を亢進させ、抑うつ、不安あるいは PTSD といったストレス関連精神疾患の誘因となることが報告されている。また、脳内セロトニン神経系はストレス応答機構において重要な役割を果たしていると考えられており、特に 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が不安などの情動と関連性が深いと考えられている。実験的に幼若期のストレスとして現在広く用いられているものに母子分離ストレスがある。この母子分離ストレスにより成熟後の不安水準が変化することが報告されているが、これらの研究は、行動変容に関連する脳部位を特定するために、オートラジオグラフィによる 5-HT<sub>1A</sub> 受容体数や *in situ* ハイブリダイゼーションによる 5-HT<sub>1A</sub> 受容体 mRNA の変化を調べたものがほとんどであり、特定の脳部位における 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の機能を直接調べた研究ではない。当研究室でも、ラットの幼若期に電撃フットショック (foot shock: FS) を負荷すると、成熟後の行動応答に変化が生じること、その変化には 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が関与している可能性を報告してきた。以上の背景を踏まえ、本研究は、幼若期のストレス負荷が、不安との関連性が強いと考えられている脳内 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の機能に及ぼす影響を追究した。①神経細胞活性化のマーカーである c-Fos を用いた免疫組織化学的手法および脳内微小透析法を用いて、幼若期ストレス負荷が注意、判断、行動などの統合部位として考えられている内側前頭前野の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能に及ぼす影響について検討した。また、5-HT<sub>1A</sub> 受容体の特異的リガンドである [<sup>3</sup>H]WAY-100635 を用いた受容体結合実験、定量 PCR による 5-HT<sub>1A</sub> 受容体 mRNA 測定も行った。②幼若期ストレスの負荷が、不安において重要な脳部位と考えられている背側海馬および扁桃体の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能に及ぼす影響について、文脈的恐怖条件付け (contextual fear conditioning: CFC) 試験における 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介する抗不安作用を指標として検討した。さらに 5-HT<sub>1A</sub> 受容体結合実験および定量 PCR を行った。

【材料と方法】 幼若期ストレス負荷として生後 3 週齢 (3wFS) の Wistar 系雄性ラットに、FS (0.5 mA、2 秒間、30 秒毎、5 回) を、電撃ショック箱 (FS-box) を用いて 5 日間反復負荷した。対照群として FS-box に入れる処置のみを負荷した FS 非負荷ラット (non-FS 群) を用いた。①5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬である R-(+)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) を投与し、神経細胞活性化の指標となる c-Fos の発現を調べた。さらに、内側前頭前野では

シナプス後部に存在する 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介した縫線核へのフィードバック抑制系が存在することが知られているので、内側前頭前野で 8-OH-DPAT を透析液中に入れて還流する reverse dialysis 法を行い、同時に同部位での 5-HT 遊離量を測定することにより、内側前頭前野での 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能を評価した。さらに、5-HT<sub>1A</sub> 受容体の特異的リガンドである [<sup>3</sup>H]WAY-100635 を用いた受容体結合実験ならびに定量 PCR による 5-HT<sub>1A</sub> 受容体 mRNA 測定を行った。②不安の評価系である CFC 試験を用いて、5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介する抗不安作用を指標として、不安との関連性が強い脳部位と考えられている背側海馬および扁桃体へ 8-OH-DPAT の局所投与を行い、これらの部位に対する幼若期ストレス負荷の影響を検討した。さらに、受容体結合実験ならびに定量 PCR による 5-HT<sub>1A</sub> 受容体 mRNA 測定を行った。

【結果】 ①3wFS 群では non-FS 群と比較して、内側前頭前野において、8-OH-DPAT 投与により発現する c-Fos 陽性細胞数が減少していた。測定を行った他の領域では、non-FS 群および 3wFS 群ともに 8-OH-DPAT による有意な c-Fos 発現増加が認められ、両群間に差はなかった。脳内微小透析法において、non-FS 群では 8-OH-DPAT 還流により内側前頭前野の細胞外 5-HT 濃度はベースラインの約 50%まで減少したのに対して、3wFS 群では減少せず、non-FS 群と有意差が認められた。一方、幼若期ストレス負荷は内側前頭前野の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体数および mRNA 量に影響を与えなかった。②8-OH-DPAT の全身投与により、non-FS 群は 0.2 mg/kg の用量で freezing が低下したが、3wFS 群では同じ用量で freezing は低下しなかった。扁桃体への 8-OH-DPAT の局所投与により non-FS 群、3wFS 群の両群とも freezing は低下した。一方、背側海馬への 8-OH-DPAT の局所投与により non-FS 群では freezing は低下したが、3wFS 群では freezing の低下は認められなかった。5-HT<sub>1A</sub> 受容体数は扁桃体では変化しなかったが、背側海馬においては non-FS 群と比較して 3wFS 群で有意に低下していた。しかし、5-HT<sub>1A</sub> 受容体 mRNA の発現量に関しては背側海馬、扁桃体ともに non-FS 群と 3wFS 群の間に差は認められなかった。

【考察】 ①3wFS 群は内側前頭前野の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能が低下している可能性が示唆された。また、今回測定した他の部位においては発現した c-Fos 陽性細胞数に変化がなかったことから、5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能は、内側前頭前野において、部位特異的に変化していると考えられる。また、脳内微小透析実験より、3wFS 群は内側前頭前野のシナプス後部に存在する 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介した 5-HT の遊離調節機構が減弱していることが明らかとなった。この調節機構の減弱は幼若期ストレス負荷による行動異常と関係している可能性が考えられる。②幼若期ストレスの負荷によって扁桃体では変化が認められないが、背側海馬では 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能が減弱することが示唆された。また、その機能減弱には 5-HT<sub>1A</sub> 受容体数の減少が関与していることが示唆された。

【結論】 幼児期のストレスが誘因となって発症する精神疾患としてうつ病や PTSD などがあり、これらの疾患には前頭前野や海馬、扁桃体などが関与していると考えられている。本研究は、幼若期のストレス負荷により前頭前野や海馬の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能が低下することを明らかとした。つまり、幼若期ストレス負荷はこれらの精神疾患の病因の一端を反映していると考えられる。したがって、本研究結果およびこれからの研究展開は、精神疾患におけるストレス脆弱性の寄与を解明する糸口となり、新たな治療戦略、妥当性の高い薬

物療法の可能性や成熟後の精神疾患発症の予防のための有用な情報を提供するものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	本間	研一
副査	教授	三輪	聡一
副査	教授	小山	司
副査	教授	渡辺	雅彦
副査	教授	佐々木	秀直

学位論文題名

## 幼若期ストレス負荷による

## 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能の変化に関する神経薬理学的研究

ストレス応答に関わる脳内システムは、生後、発達の過程で形成される。幼児期に受けたストレスが成長後の情動ストレスに対する感受性を亢進させ、抑うつ、不安あるいは PTSD といったストレス関連精神疾患の誘因となることが報告されている。本研究は、幼若期のストレス負荷が、内側前頭前野の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能に及ぼす影響について、免疫組織化学的手法や脳内微小透析法などを用いて検討したものである。その結果、幼若期ストレス負荷により 5-HT の遊離調節機構が減弱していることが示され、これは内側前頭前野のポストシナプスに存在する 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介した反応であることが示唆された。また、幼若期におけるストレス負荷が、海馬および扁桃体の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能に及ぼす影響について、5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介する抗不安作用を指標として検討した研究では、幼若期のストレス負荷によって扁桃体では 5-HT<sub>1A</sub> 受容体機能に変化は認められないが、海馬では受容体機能が減弱することが示された。また、その機能減弱には 5-HT<sub>1A</sub> 受容体数の減少が関与していることが示唆された。

学位審査は、平成 22 年 3 日午後 4 時 30 分より、医学研究科中研究棟 3 階のセミナー室において、5 名の審査員（主査・本間研一教授）の出席のもと、非公開で行われた。まず、申請者がスライドを用いて学位論文の概要を 30 分にわたって説明した後に、審査員からの個別の質問があり、最後に総合討論が行われた。質疑時間は約 40 分であった。副査の渡辺教授から、部位により幼若期のストレス負荷の影響が異なる理由についてどのように考えているか、内側前頭前野の受容体数や mRNA 発現量に変化が認められないが、機能が変化していることについてどのように考えているかの質問があった。これらの質問に対し、申請者は部位差は脳構造の機能分化により生じたと考えられ、また受容体機能、特に細胞内情報伝達系が関与している可能性がある」と述べた。また、副査の三輪教授から、免疫染色

で用いた各種マーカーの妥当性について、脳内微小透析法で得られた結果の解釈にプレシナプスの5-HT<sub>1A</sub>受容体の存在を考慮に入れなくても良いのかの質問があった。これらの質問に対し、申請者は、マーカーとしては通常用いられているものを使用したこと、内側前頭前野ではプレシナプスに5-HT<sub>1A</sub>受容体の存在は報告されていないと回答した。また、副査の小山教授から、幼若期ストレス負荷の摂食などに対する影響について、内側前頭前野の機能変化をc-Fosの発現変化をもって言うことができるのかの質問があった。これらの質問に対して、申請者は、この研究では摂食量は測定していないが、体重変化は認められなかったこと、またc-Fosの発現変化のみでは機能変化は言えないと回答した。副査の佐々木教授から、内側前頭前野の機能低下は神経細胞が減少したことによるものか、臨床で見られるような海馬の萎縮などの形態変化が起きているかとの質問があった。これらの質問に対し、申請者は神経細胞の数は減少していないと回答した。主査の本間教授から、内側前頭前野の5-HTのネガティブフィードバック機構の脆弱性と不安との関連について、またこれからの研究の方向性についての質問がなされた。これらの質問に対し、申請者はセロトニンに不活化を抑えるSSRIが抗不安作用をもつことをあげて、その関連性を説明した。

本学位論文は、幼若期ストレス負荷と情動に關与する前頭前野、海馬、扁桃体における5-HT<sub>1A</sub>受容体の機能を明らかにしたものであり、この研究は幼児期に受けたストレスに起因する精神疾患の治療や予防のための基礎的研究とな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。