

58. ストレスによる前頭前皮質の神経形態変化の分子機序

古屋敷 智之

神戸大学 大学院医学研究科 薬理学分野

Key words : ストレス, 前頭前皮質, ドパミン受容体, 自然免疫分子

緒言

社会や環境から受ける心身のひずみをストレスと称する。過度のストレスやその遷延化は、うつ状態、不安亢進といった情動変化や認知機能低下を誘導し、うつ病などの精神疾患のリスク因子となる¹⁾。一方、克服可能な短期的なストレスは、ストレスへの馴化や抵抗性を促進する²⁾。しかし、そのメカニズムの多くは不明であり、ストレスを標的とした精神疾患創薬も確立されていない。

我々は、マウスうつ病モデルとされる反復社会挫折ストレスを用いて、短期的なストレスでは内側前頭前皮質に投射するドパミン系が活性化されストレス抵抗性が增强されること、長期的なストレスでは炎症関連分子であるプロスタグランジン E₂ が EP1 受容体を介してこのドパミン系の活性を抑制し、反復ストレスによるうつ様行動の誘導を促すことを示した³⁾。また、反復ストレスによりミクログリアが活性化されること、ミクログリアに選択的に発現するプロスタグランジン合成酵素 COX1 が反復ストレスによるうつ様行動の誘導に必須であることも報告した。

しかし、短期的または長期的なストレスが内側前頭前皮質の錐体神経細胞の機能や形態に与える影響やその意義は不明であった。ラットの慢性緩徐ストレスでは、慢性ストレスにより内側前頭前皮質の錐体神経細胞の樹状突起やスパインが退縮すること、その神経細胞の形態変化がうつ様行動の誘導に関わることが報告されている^{4,5)}。本研究では、マウスの社会挫折ストレスを用い、短期的または長期的なストレスにより誘導される内側前頭前皮質の錐体神経細胞の形態変化を調べた。さらにその形態変化のメカニズムと情動変化との関連性を内側前頭前皮質のドパミン系とミクログリア活性化因子に着目して解析した。

方法

マウスの反復社会挫折ストレスを用いて研究を行った。この実験では、C57BL/6 系統のオスマウスを実験対象とし、体格が優位で攻撃性が強い ICR マウスに 1 日 10 分間暴露し、社会挫折ストレスを与える。このストレスを繰り返すと、社会的忌避行動、砂糖水や異性への嗜好性減弱、明所や高所での不安亢進、認知機能低下が誘導される。短期的なストレスでは 1 日 10 分間の社会挫折ストレスを 1 回、長期的なストレスでは 1 日 10 分間の社会挫折ストレスを 10 回連続で与えた³⁾。

内側前頭前皮質のドパミン受容体の発現抑制は、ドパミン受容体を標的とした人工的な miRNA を発現するアデノ随伴ウイルスを作製し、その組換えウイルスを内側前頭前皮質に注入することで行った⁶⁾。対照群として GC 比率を揃えた対照 miRNA を発現するアデノ随伴ウイルスを用いた。本研究では、神経細胞に選択的に感染する血清型のアデノ随伴ウイルスを用いており、神経細胞選択的にドパミン受容体の発現を抑制した。自然免疫分子 TLR の遺伝子欠損マウスについては審良静男博士の作出されたマウスをオリエンタルバイオサービスより入手して実験を行った。

神経細胞の形態の可視化は、赤色蛍光蛋白 mCherry を発現する組換えレンチウイルスを内側前頭前皮質に低力価で注入し、低密度の錐体神経細胞に mCherry を発現させて解析した。市販の Golgi-Cox 染色キットを用いた検討も行った。

結果

レンチウイルスによる mCherry 発現により内側前頭前皮質の錐体神経細胞の形態を低密度に可視化し、単回の社会挫折ストレスと反復の社会挫折ストレスによる神経細胞の形態変化を解析した。単回の社会挫折ストレスでは、内側前頭前皮質の錐体神経細胞の樹状突起の長さが増加した。反復の社会挫折ストレスでは、内側前頭前皮質の錐体神経細胞の樹状突起の長さが減少したが、スパイン密度には明らかな変化を認めなかった (図 1)。この結果は、短期的なストレスと長期的なストレスでは、内側前頭前皮質の錐体神経細胞に対照的な形態変化が誘導されていることを示している。

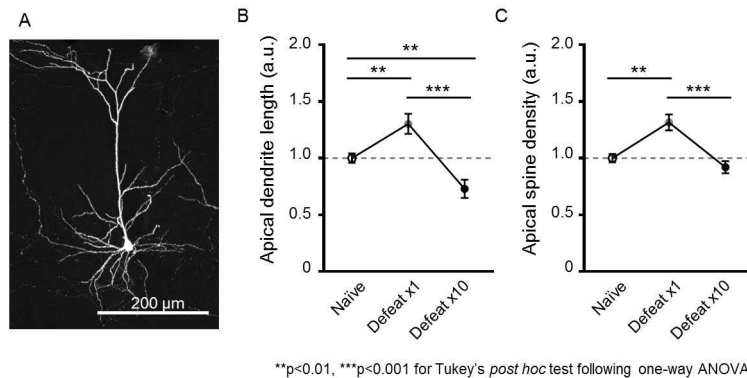


図 1. 単回ストレスによる内側前頭前皮質の錐体神経細胞の形態変化

レンチウイルスによる mCherry 発現により内側前頭前皮質の錐体神経細胞の形態を低密度に可視化した (A)。単回ストレス (Defeat × 1) では内側前頭前皮質の錐体細胞の樹状突起の長さが増加し、反復の社会挫折ストレス (Defeat × 10) では樹状突起の長さが減少した (B)。単回の社会挫折ストレス (Defeat × 1) では内側前頭前皮質の錐体細胞のスパイン密度が増加したが、反復の社会挫折ストレス (Defeat × 10) ではスパイン密度に明らかな変化を認めなかった (C)。

短期的なストレスによる神経細胞形態変化のメカニズムと意義に迫るため、人工 miRNA の発現により内側前頭前皮質の神経細胞におけるドパミン受容体の発現を抑制したマウスを単回の社会挫折ストレスに供した。その結果、ドパミン受容体を発現抑制したマウスでは、単回の社会挫折ストレスによる社会的忌避行動が促進されるとともに、単回の社会挫折ストレスによる内側前頭前皮質の錐体神経細胞の形態的造成は消失した (図 2)。この結果は、短期的なストレスが内側前頭前皮質のドパミン受容体を介してストレス抵抗性を増強するとともに、内側前頭前皮質の錐体神経細胞の樹状突起やスパインを造成することを示している。

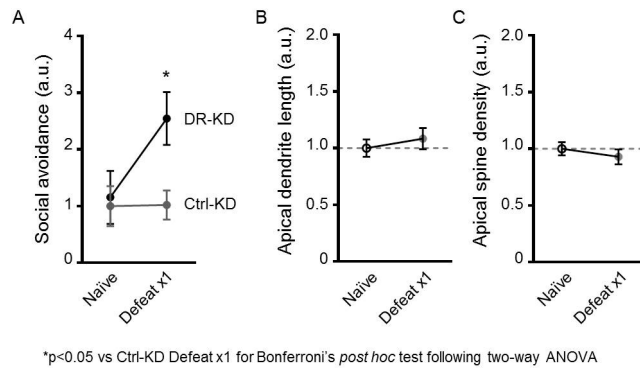


図2. ストレス抵抗性と内側前頭前皮質の錐体細胞の形態的造成におけるドパミン受容体の役割

対照群のマウス (Ctrl-KD) では単回ストレスにより社会的忌避行動が誘導されないが、内側前頭前皮質でドパミン受容体の発現を抑制したマウス (DR-KD) では社会的忌避行動が誘導された (A)。DR-KD マウスでは単回ストレス (Defeat ×1) による内側前頭前皮質の錐体神経細胞での樹状突起の造成が消失した (B)。DR-KD マウスでは単回ストレス (Defeat ×1) による内側前頭前皮質の錐体神経細胞のスパイン密度の増加が消失した (C)。

長期的なストレスによる神経細胞形態変化のメカニズムに迫るため、ミクログリアに高発現する自然免疫分子 TLR の遺伝子欠損マウスを反復の社会挫折ストレスに供した。その結果、反復の社会挫折ストレスによる社会的忌避行動の誘導や不安亢進が消失した。さらに、内側前頭前皮質における反復の社会挫折ストレスによるミクログリア活性化と錐体神経細胞の形態的萎縮も消失した (図3)。この結果は、長期的なストレスが TLR を介して情動変化を促すとともに、内側前頭前皮質のミクログリア活性化や錐体神経細胞の樹状突起萎縮を誘導することを示している。

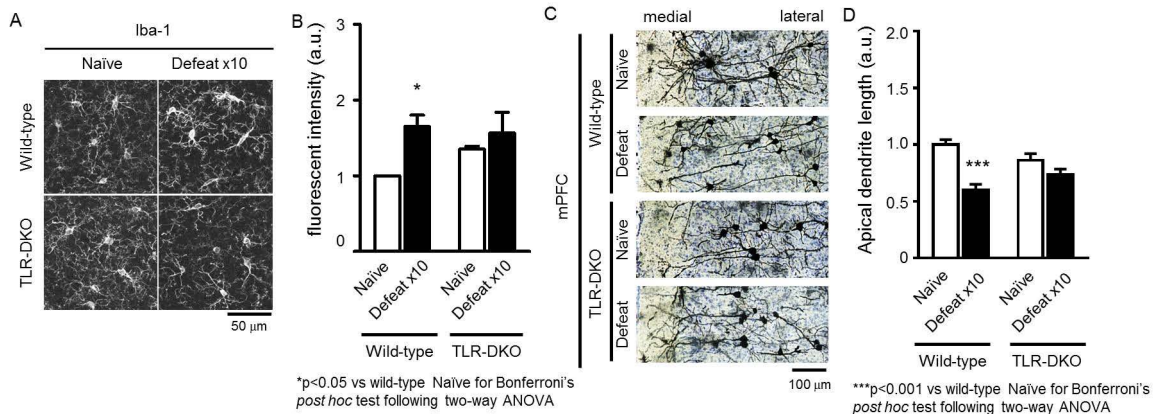


図3. 反復ストレスによる内側前頭前皮質ミクログリアの活性化および樹状突起萎縮における TLR の役割

Iba-1 の免疫染色により、反復ストレスによる内側前頭前皮質ミクログリアの活性化を評価した (A)。野生型マウスの内側前頭前皮質では反復ストレスによりミクログリアが活性化されるが、TLR 欠損マウスでは反復ストレスによるミクログリアの活性化が消失した (B)。Golgi-Cox 染色により、反復ストレスによる内側前頭前皮質錐体神経細胞の樹状突起の長さを計測した (C)。野生型マウスの内側前頭前皮質では反復ストレスにより樹状突起の萎縮が誘導されるが、TLR 欠損マウスでは反復ストレスによる樹状突起の萎縮が消失した (D)。

考 察

本研究の結果は、短期的なストレスでは内側前頭前皮質の形態的造成がストレス抵抗性の増強に寄与する可能性を示唆する。この形態的造成によりスパインの数が増加することから、短期的なストレスにより内側前頭前皮質の入出力の

いずれかが増強されていることが推測される。内側前頭前皮質の錐体神経細胞は情動制御に関わる多様な脳領域に投射しており、側坐核や背側縫線核に投射するものはうつ様行動を抑制すること、外側手綱核に投射するものはうつ様行動を促進することが示されている^{7,8)}。短期的なストレスによる形態的造成が、特定の脳領域に投射する神経細胞集団で見られるかについては今後の検討課題である。

また、本研究の結果は、長期的なストレスではミクログリア活性化が内側前頭前皮質の形態的萎縮と情動変化に寄与する可能性を示唆する。先行研究では、脳発達期の神経細胞の形態的リモデリングにもミクログリアが関与することが示唆されている⁹⁾。一般的に、ミクログリア活性化はプロスタグランジン E₂ や炎症性サイトカインの放出や貪食能の亢進を誘導することから、このいずれの作用が長期的なストレスによる神経細胞の形態的萎縮や情動変化に関与するかは今後の検討課題である。近年、組織恒常性の破綻により細胞内からダメージ関連分子が放出され、TLR の内因性リガンドとして働いて炎症を惹起することが提唱されている。長期的なストレスによる脳機能変化にも脳内で何らかのダメージ関連分子が関与する可能性が考えられる。

さらに、本研究の結果は、短期的なストレスと長期的なストレスではその脳への作用が異なること、両者を区別したストレス研究を行う重要性を示している。従来のストレス研究ではストレスの長さや度合いを系統的に変化した研究は少なく、従来報告されてきたストレスによる脳機能変化をストレスの性質と対応付けて再解析する必要がある。本研究の結果は、ストレスによる内側前頭前皮質の神経細胞の形態変化や情動変化を操作するための標的分子に手掛かりを与えるもので、今後の精神疾患創薬に貢献する可能性が大いに期待される。

共同研究者

本研究の主な共同研究者は、京都大学大学院医学研究科の成宮周教授、Johns Hopkins University の澤明教授、神戸大学大学院医学研究科の北岡志保助教、同研究科の篠原亮太特命助教である。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) McEwen BS, Gianaros PJ. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1186:190-222. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x. PubMed PMID: 20201874.
- 2) Peters A, McEwen BS. Stress habituation, body shape and cardiovascular mortality. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;56:139-150. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.07.001. PubMed PMID: 26148986.
- 3) Tanaka K, Furuyashiki T, Kitaoka S, Senzai Y, Imoto Y, Segi-Nishida E, Deguchi Y, Breyer RM, Breyer MD, Narumiya S. Prostaglandin E₂-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *J Neurosci.* 2012;32(12):4319-4329. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5952-11.2012. PubMed PMID: 22442093.
- 4) Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, Rajkowska G, Stockmeier CA, Licznanski P, Lepack A, Majik MS, Jeong LS, Banasr M, Son H, Duman RS. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat Med.* 2012;18(9):1413-1417. doi: 10.1038/nm.2886. PubMed PMID: 22885997.
- 5) Ota KT, Liu RJ, Voleti B, Maldonado-Aviles JG, Duric V, Iwata M, Dutheil S, Duman C, Boikess S, Lewis DA, Stockmeier CA, DiLeone RJ, Rex C, Aghajanian GK, Duman RS. REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior. *Nat Med.* 2014;20(5): 531-535. doi: 10.1038/nm.3513. PubMed PMID: 24728411.
- 6) Lazarus M, Shen HY, Cherasse Y, Qu WM, Huang ZL, Bass CE, Winsky-Sommerer R, Semba K, Fredholm BB, Boison D, Hayaishi O, Urade Y, Chen JF. Arousal effect of caffeine depends on adenosine A_{2A} receptors in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2011;31(27):10067-10075. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6730-10.2011. PubMed PMID: 21734299.
- 7) Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim SY, Adhikari A, Tye KM, Frank LM, Deisseroth K. A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature.* 2012;492(7429):428-432. doi: 10.1038/nature11617. PubMed PMID: 23160494.
- 8) Christoffel DJ, Golden SA, Walsh JJ, Guise KG, Heshmati M, Friedman AK, Dey A, Smith M, Rebusi N, Pfau M, Ables JL, Aleyasin H, Khibnik LA, Hodes GE, Ben-Dor GA, Deisseroth K, Shapiro ML, Malenka RC, Ibanez-Tallon I, Han MH, Russo SJ. Excitatory transmission at thalamo-striatal synapses mediates susceptibility to social stress. *Nat Neurosci.* 2015;18(7):962-964. doi: 10.1038/nn.4034. PubMed PMID: 26030846.
- 9) Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012;74(4):691-705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026. PubMed PMID: 22632727.