

ストレスにおける神経グリア相互作用の分子実体の解明

神戸大学大学院医学研究科薬理学分野

古屋敷 智之

1. 目的

社会や環境から受けるストレスは、うつ病や統合失調症など広く精神疾患のリスク因子である(Duric & Duman, 2013)。過度なストレスやストレスの遷延化はうつ様行動や不安亢進といった情動変容、認知機能低下を引き起こす(Nestler & Hyman, 2010; Duman & Aghajanian, 2012)。しかしその分子機序には不明な点が多く、ストレスを標的とした精神疾患創薬は確立していない。

拘束や社会挫折など多様なストレス刺激を用いたげっ歯類の反復ストレスモデルでは、反復ストレスにより内側前頭前皮質や海馬では神経細胞の樹状突起の萎縮や興奮性シナプスの場であるスパインの密度の低下が誘導され、刺激への応答性が減弱する(Liston et al., 2006; Dias-Ferreira et al., 2009; Duman & Aghajanian, 2012)。うつ病など気分障害の患者の死後脳解析や脳イメージング解析から、内側前頭前皮質の体積の減少や活動の異常が認められている(Price & Drevets, 2010)。反復ストレスによる内側前頭前皮質の機能や構造の変化がうつ様行動や認知機能低下と関連することが示されてきた。例えば、内側前頭前皮質を光遺伝学的に刺激すると、反復社会挫折ストレスによるうつ様行動の一つである社会的忌避行動が減弱する(Covington et al., 2010)。反復緩徐ストレスによる内側前頭前皮質の樹状突起萎縮を担う分子機序を阻害すると、このストレスモデルでの砂糖水嗜好性減少、すなわち快感減少が消失する(Kang et al., 2012)。反復社会挫折ストレスにより内側前頭前皮質のドーパミン系が抑制され、その結果、社会忌避行動が誘導される(Tanaka et al., 2012; Chaudhury et al., 2013)。内側前頭前皮質のノルアドレナリン系の阻害により、反復拘束ストレスによる認知学習機能障害が起こらなくなることも示された(Jett & Morilak, 2013)。これらの結果は、反復ストレスによる認知・情動変化における内側前頭前皮質の機能・構造変化の重要性を示す。その分子機序については依然不明な点が多い。

古くより、うつ病など気分障害の患者より採取した末梢血でプロスタグランジンE₂やサイトカインなど炎症関連分子が高値を示すことが報告されてきた。しかしこれらの炎症関連分子の上昇が精神疾患の病態に関与するかは不明であった。我々を含む複数の研究グループがげっ歯類のストレスモデルを用いて、反復ストレスによる情動変化に炎症関連分子が必須であることを示してきた。例えば、IL-1の受容体の欠損マウスでは反復緩徐ストレスによる砂糖水嗜好性減少が消失する(Koo & Duman, 2008; Goshen et al., 2008)。また我々は、プロスタグランジンE₂の受容体EP1やプロスタグランジン合成酵素COX1の欠損マウスでは反復社会挫折ストレスによる社会忌避行動が消失することを示した(Tanaka et al., 2012)。脳内ではIL-1βの主な産生源はミクログリアであり、COX1もミクログリアに選択的に発現することから、反復ストレスによる情動変化におけるミクログリアの関与が示唆された。この可能性に合致し、反復ストレスはミクログリアの活性化に合致した形態変化を誘導する(Tanaka et al., 2012; Wohleb et al., 2011)。

しかし、反復ストレスによるミクログリア活性化の分子機序は不明であった。また、反復ストレスによるミクログリア活性化が情動変化に必須であるかも不明であった。近年、組織恒常性の破綻がToll-like receptor (TLR)など自然免疫分子を介して炎症や組織リモデリングを誘導することが示唆されている。本研究では、反復社会挫折ストレスによるミクログリア活性化と情動変化におけるTLRの役割を調べた。さらに反復社会挫折ストレスによる情動変化にミクログリア活性化が関与するか、その場合、どの脳領域のミクログリア活性化が重要であるかについても検討した。

2. 方法

(反復社会挫折ストレス)

反復社会挫折ストレスでは、実験対象のC57BL/6系統の雄マウスを、攻撃性の強く体格の優位なICR系統の新奇雄マウスからの攻撃に1日10分間、10日間連続で暴露する。対照群として、1日10分間、10日間連続で新しいケージに移す。反復社会挫折ストレスの終了後に、数日に亘り行動実験を行う。

社会行動実験では、30cm x 40cmのオープンフィールドに小さな金属の檻を設置し、その外側に反復社会挫折ストレスを受けたマウスと対照群のマウスを投じ、2分半に亘り移動の軌跡を記録する。翌日、オープンフィールドに設置した金属の檻にICR系統の新奇雄マウスを入れておき、その外側に反復社会挫折ストレスを受けたマウスと対照群のマウスを投じ、2分半に亘り移動の軌跡を記録する。金属の檻の周囲に社会行動ゾーン、反対側の壁の近傍に忌避行動ゾーンを設定し、それぞれの領域における滞在時間を計測して、社会行動と忌避行動の定量的指標とした。

不安行動の計測には、2本のopen arms (幅5cm、奥行き25cm、壁無し)と2本のclosed arms (幅5cm、奥行き25cm、高さ15cmの壁有り)が5cm四方の中心領域を介して相互に接続し、高架全体が床から50cmの高さに設定された高架式十字迷路を用いた。試験環境を馴化させた後、実験対象のマウスを十字迷路の

中心に置き、5分間のマウスの異動の軌跡を記録する。Open armsでの滞在時間の減少を不安亢進の指標とした。

(蛍光免疫染色による神経活動とミクログリア活性化の解析)

社会挫折ストレスを与えていない対照群、単回の社会挫折ストレスを与えた群、反復して社会挫折ストレスを与えた群の個体を蛍光免疫染色に供した。反復社会挫折ストレスを与えた個体については、10回目のストレスの後、社会行動試験を行い、その後11回目の社会挫折ストレスを与えてから蛍光免疫染色に供した。神経活動の解析には、神経活動マーカーであるc-Fosの免疫染色を行った。ミクログリア活性化の解析には、Iba1などミクログリア活性化マーカーの免疫染色を行った。蛍光免疫染色の画像は共焦点顕微鏡により取得した。

(特定の脳領域のミクログリアにおけるTLRの発現抑制)

TLRの配列を標的とした人工miRNAを発現する組換えレンチウイルスをマウスの情動関連脳領域に脳定位固定法により注入し、人工miRNAを特定の脳領域でミクログリア選択的に発現させた。術後1か月以上回復を待ってから反復社会挫折ストレスに供した。

3. 結果

野生型マウスでは、反復社会挫折ストレスによる社会忌避行動や不安亢進が誘導されるのに対し、TLRの遺伝子欠損マウスではこの社会忌避行動や不安亢進が消失していた。しかし社会挫折ストレスの最中に見られる降参の姿勢についてはこの遺伝子欠損マウスでも正常に見られた。この結果から、TLRはストレスの知覚ではなく、反復ストレスによる情動変化に選択的に関与することが示された。

TLRの役割に迫るため、反復ストレスによる神経細胞の機能や形態の変化について調べた。その結果、野生型マウスではある脳領域の神経細胞の樹状突起の形態的萎縮とストレスによる応答性の減弱が観察されるが、TLRの欠損マウスではこれらの変化が消失していた。さらにこの脳領域での反復ストレスによるミクログリア活性化もTLRの欠損マウスで消失していた。

さらに、この脳領域のミクログリアにおけるTLRの発現を選択的に抑制したところ、反復ストレスによる社会忌避行動の誘導が消失した。

4. 考察

以上の結果から、反復ストレスによるミクログリア活性化にTLRが必須であることが示された。さらに特定の脳領域におけるTLRによるミクログリア活性化が、反復ストレスによる情動変化に必須であることが示された(論文投稿中)。TLRが反復ストレスによる神経細胞の機能・形態萎縮にも必須であることから、TLRによるミクログリア活性化が近傍の神経細胞の機能・形態萎縮を引き起こし、情動変化を促す可能性が示唆される。TLRは受容体分子であることから、今後、当該脳領域におけるTLRのリガンドの同定が求められる。また反復ストレスによりミクログリアから放出されることが想定されているサイトカインやPGE₂の機能との関連性も今後の検討課題である。

本研究により、反復ストレスによる情動変化には、情動を司る神経回路の可塑性に加え、脳局所における神経ミクログリア相互作用が重要であることが示された。本研究で用いた反復社会挫折ストレスでは、抗うつ薬の反復投与による治療効果が観察されることから、マウスのうつ病モデルとされてきた(Nestler & Hyman, 2010)。統合失調症など一部の精神疾患では脳内のミクログリア活性化が報告されている。反復ストレスにおける神経ミクログリア相互作用の分子機序の解明は、精神疾患の新たな創薬シーズの発見に繋がる可能性が期待される。

5. 参考文献

- Chaudhury D. et al. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 493, 532-536 (2013).
- Covington H. E. et al. Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 30, 16082-16090 (2010).
- Dias-Ferreira E. et al. Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science* 325, 621-625 (2009).
- Duman R. S. & Aghajanian G. K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 338, 68-72 (2012).
- Duric V. & Duman R. S. Depression and treatment response: dynamic interplay of signaling pathways and altered neural processes. *Cell Mol Life Sci* 70, 39-53 (2013).
- Goshen I. et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry* 13, 717-728 (2008).
- Kang H. J. et al. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat Med* 18, 1413-1417 (2012).
- Koo J. W. & Duman R. S. IL-1 β is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 751-756 (2008).

- Jett J. D. & Morilak D. A. Too much of a good thing: blocking noradrenergic facilitation in medial prefrontal cortex prevents the detrimental effects of chronic stress on cognition. *Neuropsychopharmacology* 38, 585-595 (2013).
- Liston C. et al. Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci* 26, 7870-7874 (2006).
- Monji A. et al. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 42, 115-121 (2013).
- Nestler E. J. & Hyman S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13, 1161-1169 (2010).
- Price J. L. & Drevets W. C. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 192-216 (2010).
- Tanaka K. et al. Prostaglandin E₂-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *J Neurosci* 32, 4319-4329 (2012).
- Wohleb E. S. et al. β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci* 31, 6277-6288 (2011).