

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医学) 氏名 隈元 晴子

### 学位論文題名

幼若期ストレスによるラットの社会性行動障害に関する研究  
(Early postnatal stress-induced social impairment in adult rats)

【背景と目的】 幼少期における身体的虐待やネグレクトの経験は、成長後の情動ストレスに対する感受性を亢進させ、成長後抑うつや心的外傷後ストレス障害 (PTSD)、注意欠陥多動性障害 (ADHD)、その他の行動障害を誘引することが報告されている (Heim and Nemeroff, 2001)。また虐待の影響は成人後、対人関係などの社会生活に支障をきたす (Yehuda and LeDoux, 2007)ほか、人格的障害や反社会的行動とも関連する (MacMillan et al., 2001)ため、結果として社会に負の影響をもたらさう。脳画像研究によると、幼少期に虐待を経験した大人では前頭前皮質や海馬の委縮が報告されている (Bremner JD et al., 1997; Hanson et al., 2015)。また、幼若期のストレス動物モデルとして広く用いられているものに母子分離ストレスがあるが、このモデルを用いた研究では成熟後、ストレスに対する視床下部-下垂体-副腎系の亢進やオープンフィールド (OF) 試験、高架式十字迷路 (EPM) 試験および social interaction (SI)試験などの行動試験において不安様行動を示すことが報告されている (Molet et al., 2014)。学位申請者が在籍する研究室においても生後 3 週齢のラットに電撃フットショック (FS)を負荷し、幼若期ストレスが成熟後の情動表出に及ぼす影響について検討してきた。OF 試験における探索期の行動量の減少、および順応期の行動量が増加すること (樋口ら, 2004)、EPM 試験において open arm での滞在時間が有意に延長すること (Konno et al., 2007)、恐怖条件付け試験における消去過程が遅延すること (Matsumoto et al., 2008., Koseki et al., 2009)、海馬への投射先の一つである正中縫線核 (MRN) の 5-HT 陽性細胞数が減少すること (Konno et al., 2007)、内側前頭前野下辺縁皮質 (IL)における錐体細胞の先端樹状突起棘密度が減少するが、幼若期ストレス後 14 日間 SSRI の一種であるフルボキサミン反復投与によって回復したことを報告してきた (Lyttle et al., 2015)。しかしながら、ラットの社会性に与える幼若期ストレスの影響と、その関連脳部位については明らかになっていない。以上の背景から本研究では、ラットに幼若期ストレスを負荷し、成熟後の社会性行動の指標として SI 行動の変化および脳に与える影響に焦点をあて検討を行った。また、背側縫線核 (DRN) において生得的な不安に関与することが報告 (Shikanai et al., 2012) されている GABA 合成酵素含有 5-HT 作動性神経細胞数と細胞周径に与える影響についても検討を行った。

【材料と方法】 生後 3 週齢の Wistar 系雄性ラットに FS を 5 日間繰り返した (3wFS 群)。コントロール群は FS を負荷せず、ホームケージで飼育した (NONFS 群)。幼若期ストレスによる行動学的変化および脳の形態学的変化に対する薬理的介入については、幼若期ストレス負荷後フルボキサミンを 14 日間反復経口投与し、NONFS-veh、NONFS-flv、3wFS-veh、3wFS-flv の 4 群に分け、生後 10-14 週齢時に 3 日間の実験装置への馴化後、4 日目に SI 試験を実施した。行動試験終了後に摘出した脳を用いて Golgi cox 染色を行い、海馬 CA3 の錐体細胞先端樹状突起棘密度の測定を行った。さらに 5-HT と parvalbmin (PV)、calbindin (calb)陽性細胞を可視化するため蛍光染色を行い、単位面積あたりの細胞数および細胞周径を計測した。

【結果】SI 試験を行った結果、3wFS-veh 群が NON-FS-veh 群と比較して SI 時間が有意に上昇 ( $p < 0.01$ )したが、3wFS-flv 群ではその差が認められなくなった。また、Golgi cox 染色を行った結果、海馬 CA3 において 3wFS-veh 群では NON-FS-veh 群と比較して先端樹状突起棘密度が有意に減少 ( $p < 0.05$ )したが、3wFS-flv 群ではその差が認められなかった。次に、蛍光染色を行った結果、正中縫線核の PV 陽性細胞数および PV 陽性 5-HT 神経細胞数と細胞周径が、3wFS-veh 群では NON-FS-veh 群と比較して有意に減少 ( $p < 0.01$ )したが、3wFS-flv 群ではその差が認められなかった。

【考察】本研究の結果より、SI 行動が幼若期ストレスの影響によって増加し、海馬 CA3 にある錐体細胞の先端樹状突起棘は減少するが、幼若期ストレス負荷後フルボキサミンを反復経口投与することで、予防できる可能性が示唆された。5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬を海馬に局所投与すると、SI 行動が低下したこと (Andrews et al., 1994; File et al., 1996)や、マウスの背側海馬を NMDA で破壊すると、SI 行動が増加したとの報告 (Bannerman et al., 2002) から、海馬の活動低下がラットの社会的行動を増加させる可能性が示唆される。また、グルココルチコイドを海馬に局所投与すると、CA3 における錐体細胞の樹状突起に分枝数、長さ、樹状突起密度の減少などの変化が生じることが報告されていることから (Wooley et al., 1990)、本研究においても幼若期に受けたストレスの影響により脳内コルチコステロン濃度が上昇した結果、先端樹状突起棘密度が減少したと考えられる。PTSD 患者では健常群と比べて海馬の容積が有意に減少するが、SSRI を服用することにより回復すること (Vermetten et al., 2003)が報告されており、本研究においてもフルボキサミンの反復投与後、減少していた海馬錐体細胞の先端樹状突起棘が正常レベルまで回復し、その結果 SI 行動が正常に戻った可能性が示唆される。次に、幼若期ストレスを経験したラットでは、成熟後 MRN における PV 陽性 5-HT 神経細胞数と細胞周径および、PV 単独陽性細胞数が減少したが、calb 陽性 5-HT 陽性細胞には変化が見られず、PV に特異的な変化であることが示唆された。PV 陽性 5-HT 細胞の変化は、PV がストレスの影響により脆弱化したことにより Ca<sup>2+</sup>への結合力が減少し、結果的に PV 陽性 5-HT 細胞を委縮させる可能性が示唆される。また 5-HT は、ラットの新生仔の脳新皮質における神経細胞の分化や神経回路網の形成や神経新生を促進すること (Chubakov et al., 1986, 1993)から、神経伝達物質としてだけではなく、成長過程において神経栄養因子としての役割をもつと考えられている (Whitaker-Azmitia and Azmitia, 1986)。そのため、MRN からの 5-HT の投射が減少したことにより、CA3 錐体細胞の先端樹状突起棘密度が減少した可能性が示唆される。また、海馬では SSRI が細胞間隙の 5-HT 濃度を上昇させ、神経細胞のシナプス数を増加させる (Pittenger et al., 2008)ことから、MRN においてもフルボキサミンの投与は、幼若期ストレスによって障害された PV および PV 共発現 5-HT 神経細胞の回復に寄与したと考えられる。

【結論】生後 3 週齢のラットへのストレス負荷は、成熟後に SI 行動を増加させ、海馬錐体細胞の先端樹状突起棘密度を減少させた。また幼若期ストレスの負荷は、MRN における PV 陽性 5-HT 神経細胞数と細胞周径および、PV 単独陽性細胞数を減少させた。以上の変化に対して、ストレス負荷後にフルボキサミンを反復投与することによって、予防できる可能性が示唆された。