

国際医療福祉大学審査学位論文 (博士)

大学院薬学研究科博士課程

ストレスに対する認知・適応機構における
5-HT₇受容体の役割

平成 28 年度

医療・生命薬学専攻

学籍番号：13R3006 氏名：武田 弘太郎

研究指導教員：辻 稔 准教授

副研究指導教員：加藤 英明 講師

【目次】

| | | |
|-------|---|----|
| 和文要旨 | ----- | 1 |
| 英文要旨 | ----- | 2 |
| | | |
| 第 1 章 | ストレスの認知・記憶機構における 5-HT ₇ 受容体の役割 | |
| 緒言 | ----- | 3 |
| 方法 | ----- | 6 |
| 結果 | ----- | 9 |
| 考察 | ----- | 14 |
| | | |
| 第 2 章 | ストレスに対する適応機構における 5-HT ₇ 受容体の役割 | |
| 緒言 | ----- | 18 |
| 方法 | ----- | 20 |
| 結果 | ----- | 25 |
| 考察 | ----- | 34 |
| | | |
| 総 括 | ----- | 39 |
| 出版目録 | ----- | 40 |
| 謝 辞 | ----- | 41 |
| 引用文献 | ----- | 42 |

【和文要旨】

文脈的および音依存性恐怖条件付けにより誘発されるマウスのすくみ行動ならびに扁桃体における extracellular signaling-regulated kinase (ERK) 活性の上昇は、選択的 5-HT₇ 受容体拮抗薬により抑制された。したがって、ストレスを認知・記憶する過程において 5-HT₇ 受容体が重要な役割を担っており、その機構に扁桃体における ERK 情報伝達系が関与することが示唆された。

また、ストレス適応モデルマウスの前頭前皮質および海馬では、5-HT₇ 受容体発現量および ERK 活性化レベルの上昇が認められた。さらに、ストレス非適応モデルマウスが示す情動性の低下は、選択的 5-HT₇ 受容体作動薬により抑制された。これらの結果より、ストレスへの適応形成には、前頭前皮質および海馬における 5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系が関与していること、さらには、ストレスへの非適応に起因する情動性の低下に対して、5-HT₇ 受容体作動薬が有効であることが示唆された。

キーワード：ストレス認知、ストレス適応、5-HT₇ 受容体、ERK、マウス

【英文要旨】

The fear responses as well as increases in ERK activity in the amygdala induced by context- and tone-dependent fear conditioning were inhibited by a selective 5-HT₇ receptor antagonist. These results suggest that amygdaloid 5-HT₇ receptor-mediated ERK signaling may play an important role in the processes of the recognition and memory of stress.

Increases in 5-HT₇ receptor expression and ERK phosphorylation were observed in the frontal cortex and hippocampus of stress-adaptive mice. Furthermore, the decreased emotionality observed in stress-maladaptive mice was inhibited by a selective 5-HT₇ receptor agonist. These results suggest that the 5-HT₇ receptor-ERK system in the frontal cortex and hippocampus may be involved in the formation of stress adaptation. Furthermore, 5-HT₇ receptor agonist may show a beneficial effect for the decrease in emotionality caused by the maladaptation to excessive stress.

Key words: stress recognition, stress adaptation, 5-HT₇ receptor, ERK, mouse

第 1 章

ストレスの認知・記憶機構における

5-HT₇受容体の役割

【緒言】

現代は、ストレス社会ともいわれ、物理的、化学的、生物的、心理的および社会的な多彩なストレス刺激に暴露される環境にある。元来、“ストレス”とは、「物体に力が加わったときに生じる物体内の力の不均衡（歪み）」と定義される物理・工学用語である。ストレス科学の大家であるハンス・セリエは、“ストレス”という用語を医学・生理学領域に初めて導入し、「ストレスとは、生体の中におこる生理的および心理的歪みであり、このストレスを作り出すものが外部から加えられるストレッサー（ストレス刺激）である」と述べている^{1,2)}。また、このストレス刺激に対する生体反応（ストレス反応）を、生体のストレス刺激に対する抵抗力が一過性に減弱する「警告反応期」、生体の恒常性を維持する機構が機能してストレス刺激に対する抵抗力が増大する「抵抗期」、および過度のストレス刺激により生体の恒常性を維持する機構が破綻をきたし適応力を失う「疲憊期」の3期に分類している。これらの学説を踏まえると、本来ストレス反応は、ストレス刺激に対する生体の防御反応として必要不可欠なものであるが、ストレス刺激が過剰な場合には一転して病的状態の原因となることが示唆される。すなわち、健常な状態ではストレス状況への適応が形成されるのに対し、過度のストレス状況下では「疲憊期」に陥り、様々なストレス性疾患の発症に繋がるものと考えられる。

ストレスに適応する過程では、ストレス経験を認知・記憶し、適切に対処することが重要と考えられる。一方、生体が経験に基づいて後に生じる出来事を予測し、対処することを可能にする適応プロセスを連合学習と呼び、その代表的な一形態として恐怖条件付けが挙げられる³⁾。恐怖条件付けとは、不快感や恐怖感を誘発するストレス刺激（無条件刺激）と空間や音など（条件刺激）を関連付けた記憶が形成され、無条件刺激に対する連合学習が獲得される現象であり、実験動物でも再現することが可能である。例えば、げっ歯類における恐怖条件付けでは、条件刺激である新奇環境や音と無条件刺激である四肢への電撃刺激（電撃フットショック）との関連付け

により表出されるすくみ行動を測定することにより、連合学習を評価することができる。このモデルの利点は、文脈的恐怖記憶および音依存性恐怖記憶に基づくストレス反応の両方を、1つの実験系においてそれぞれ独立したかたちで評価できることである。すなわち、ある環境においてげっ歯類に音とともに電撃フットショックを与えると、条件刺激（音および環境）と無条件刺激（電撃フットショック）とを関連付けた記憶が形成される。したがって、げっ歯類は、条件付けを経験した環境に再び曝されるとすくみ行動を示し、さらにこれまで経験したことがない新たな環境においても、条件付けで用いた音のみを暴露することによりすくみ行動を示す。前者は文脈的恐怖条件付け、後者は音依存性恐怖条件付けと呼ばれるものであり、この実験手法は、情動記憶のメカニズムや、ストレスへの適応障害を基盤とする精神症状の発症要因の解明に有用とされている³⁾。

これまでに、恐怖条件付けによる情動記憶のメカニズムに、脳内セロトニン（5-HT）神経系が深く関与していることが示唆されている⁴⁾。現在、5-HT受容体には、5-HT₁から5-HT₇の7種のタイプが存在することが明らかにされており、さらにこれら受容体タイプは14種類のサブタイプに細分化されている⁵⁾。これらのうち、5-HT₇受容体は、5-HT受容体ファミリーの中で最も新しく発見された受容体タイプであり^{6,7)}、本受容体の脳内分布については、*in situ hybridization*、オートラジオグラフィ、免疫組織化学染色法など、様々な手法を用いた検討がなされている。その結果、5-HT₇受容体 mRNA の発現は、大脳皮質、海馬、視床、扁桃体、視床下部に高密度に認められ、且つ、5-HT₇受容体タンパク質の発現と概ね一致することが報告されている^{6,8-10)}。このように、5-HT₇受容体が大脳辺縁系領域を中心に高密度に存在している事実は、本受容体と情動調節機能あるいは認知・学習・記憶機能とを強く関連付ける根拠の一つとなっている。5-HT₇受容体ノックアウトマウスを用いたこれまでの研究において、海馬依存性の情動記憶に5-HT₇受容体が関与していることが明らかにされている^{11,12)}。また、我々の以前の研究では、選択的5-HT₇受容体拮抗薬である 2a-[4-(4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridyl)butyl]-2a,3,4,-tetrahydrobenzo(c,d)

indol-2-(1*H*)-one (DR4004) を条件付けの前後に投与した場合、文脈的および音依存性恐怖記憶が有意に低下することを見出している¹³⁾。これらの知見は、情動記憶の獲得あるいは保持過程において、5-HT₇受容体が重要な役割を担っていることを示唆する。

Mitogen-activated protein kinase ファミリーの 1 つである extracellular signal-regulated kinase (ERK) は、情動記憶における 5-HT₇受容体の役割と密接に関係することが想定される機能的分子である。その根拠として、多くの研究成果の累積により、海馬および扁桃体における ERK 情報伝達が、文脈的および音依存性恐怖条件付けに必須の要素であることが示唆されている^{14,15)}。一方、興味深いことに、遺伝子導入により 5-HT₇受容体を強制発現させた細胞を用いた研究では、5-HT₇受容体を刺激することにより、プロテインキナーゼ A 依存性ならびに非依存性の経路を介して ERK の活性化が引き起こることが明らかにされており¹⁶⁻¹⁸⁾、同様の 5-HT₇受容体刺激に伴う ERK の活性化は、海馬培養神経細胞を用いた検討においても証明されている¹⁹⁾。したがって、5-HT₇受容体と関連する ERK 情報伝達系が、情動記憶に関与している可能性が考えられる。

本研究では、まず我々がこれまで得てきた知見¹³⁾の再現性を確認するために、マウスにおける文脈的および音依存性恐怖条件付けにおよぼす DR4004 の影響について検討した。さらに、情動記憶における 5-HT₇受容体-ERK 情報伝達系の役割を明らかにするために、文脈的および音依存性恐怖条件付けを行ったマウスの扁桃体および海馬における ERK 活性の変化と、それらに対する DR4004 の効果について検討した。

【方法】

本研究は、実験動物に対する動物愛護上の問題に配慮し、「国際医療福祉大学動物実験規定」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守し、国際医療福祉大学動物実験委員会の承認のもと、適正な実験動物の飼育と動物実験を実施した。

1. 実験動物および飼育条件

実験には、体重 30～35 g（実験開始時）の ICR 系雄性マウス（日本エスエルシー（株）、浜松）を使用した。動物は恒温恒湿室（ 23 ± 1 °C, 50 ± 5 %）にてプラスチックケージ内で飼育し、7:00 点灯、19:00 消灯の 12 時間サイクルの明暗条件下で飼育した。尚、摂餌（ラボ MR ストック、日本農産工業（株）、横浜）および飲水（水道水）はともに自由とした。

2. 使用薬物

選択的 5-HT₇ 受容体拮抗薬である DR4004（明治製菓（株）、神奈川）を Tween 20 に溶解し、次いで生理食塩液（大塚製薬（株）、東京）で希釈した。溶液中の Tween 20 の最終濃度は 1 % とした。DR4004 の用量、投与経路および投与スケジュールは、以前の我々の研究¹³⁾ならびに他の研究グループによる先行論文²⁰⁻²²⁾に基づいて設定した。

3. 恐怖条件付けストレス試験

恐怖条件付けストレス試験は、Stiedl ら²³⁾の変法¹³⁾に従って、3 日間のスケジュール（1 日目：条件付け；2 日目：文脈的恐怖反応の測定；3 日目：音依存性恐怖反応の測定）で行った。試験 1 日目では、床面に電撃刺激用のグリッドを設けた 3 コンパートメントのショック箱（1 コンパートメントあたり 10 × 30 × 25 cm）にマウスを入れて 180 秒間放置し、その後、音刺激（80 dB, 60 sec）

とそれに続く電撃刺激 (0.6 mA, 2 sec) を負荷した。この一連の手続きを 3 回繰り返し、最後にショック箱内に 60 秒間放置することで条件付けを行った。非条件付け群のマウスには、ショック箱内で音刺激のみを提示し、電撃刺激は負荷しなかった。尚、各条件付けを行う前には、毎回、ショック箱内を 1 %酢酸で清掃した。条件付け 24 時間後 (試験 2 日目) では、再度、1 %酢酸で清掃したショック箱にマウスを入れ、電撃刺激を負荷しない状態で、すくみ行動の出現時間を 6 分間測定した (文脈的恐怖反応の評価)。さらにその 24 時間後 (試験 3 日目) では、条件付けを行ったショック箱とは全く異なる環境 (70 %エタノールで清掃したプラスチック製シリンダー (直径 19 × 高さ 25 cm)) にマウスを入れ、180 秒間放置した後に音刺激を 180 分間提示し、音刺激を提示している間にマウスが示すすくみ行動の出現時間を測定した (音依存性恐怖反応の評価)。すくみ行動の出現時間は、ショック箱あるいはシリンダーの上方に設置した赤外線センサー (SUPER-MEX、室町機械 (株)、東京) により記録した。また、DR4004 は条件付け終了後に腹腔内 (i.p.) 投与した。

4. ERK 活性の測定

文脈的あるいは音依存性恐怖反応を測定した直後に、扁桃体および海馬を速やかに摘出した。各脳組織中の総 ERK 量およびリン酸化 ERK 量は、専用の測定キット (Assay Designs Inc., MI, USA) を用いて測定した。脳組織を 10 倍量の 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (Sigma Aldrich, Co., Ltd., MO, USA)、2 mM オルトバナジン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich)、20 mM ピロリン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich) およびプロテアーゼ阻害剤 (Sigma-Aldrich) を含む冷却した RIPA 細胞溶解緩衝液 2 (50 mM トリス塩酸 (pH 7.4)、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM エチレンジアミン四酢酸、1 mM エチレングリコール四酢酸、1 %トリトン X-100、1 %デオキシコール酸ナトリウム、0.1 %ドデシル硫酸ナトリウム) とともにホモジナイズし、遠心分離 (12,000 x g, 30 min, 4 °C) により得られた上清を 80 倍希釈してサンプルとした。サンプル (100 μL) を ERK または

リン酸化 ERK に対するモノクローナル抗体でコーティングしたマイクロプレートに添加し、振盪しながら室温で 1 時間インキュベートした。次いで、マイクロプレートを洗浄用緩衝液で 4 回洗浄し、ERK またはリン酸化 ERK に対するウサギポリクローナル抗体を加えて、振盪しながら室温で 1 時間インキュベートした。その後、過剰の抗体を除去した後にホースラディッシュペルオキシダーゼで標識したロバ抗ウサギ IgG 抗体を加えて振盪しながら 30 分間インキュベートし、さらに洗浄後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) および過酸化水素を含有する基質溶液とともに 15 分間インキュベートした。最後に、1N 塩酸を添加することにより反応を停止させ、試料の光学濃度 (OD 値) を波長 450 nm で測定した。得られた OD 値を既知濃度の ERK またはリン酸化 ERK 標準品の OD 値と比較し、各サンプル中の ERK または pERK の濃度 (pg/ml) を算出した。

5. 統計処理

値は全て平均±標準誤差で表示した。すくみ行動の経時変化 (Fig. 1A-1 および 1B-1) に関する統計学的有意差検定は、二元配置分散分析および Student-Newman-Keuls 多重比較検定を用いて行った。また、その他の結果は、一元配置分散分析および Student-Newman-Keuls 多重比較検定を用いて、統計学的有意差を検定した。危険率 5%未満 ($P<0.05$) を有意差ありと判定した。

【結果】

1. 選択的 5-HT₇受容体拮抗薬 DR4004 が文脈的および音依存性恐怖条件付けに及ぼす影響

選択的 5-HT₇受容体拮抗薬 DR4004 が文脈的および音依存性恐怖条件付けに及ぼす影響を Fig. 1 に示した。恐怖条件付け 24 時間後に、再度、条件付けを行ったショック箱内にマウスを入れると、持続的かつ有意なすくみ行動（文脈的恐怖反応）が認められた（Fig. 1A-1）。また、その 24 時間後に、条件付けを行ったショック箱とは全く異なる環境（プラスチック製シリンダー）にマウスを入れ、条件付けで使用した音刺激を提示すると、一過性に有意なすくみ行動（音依存性恐怖反応）が出現した（Fig. 1B-1）。これら文脈的および音依存性恐怖反応は、条件付け直後に DR4004（5 mg/kg, i.p.）を投与することにより有意に抑制された。また、この DR4004 の抑制効果は、すくみ行動の総出現時間の解析によっても確認された（Fig. 1A-2 および 1B-2）。

2. 文脈的恐怖条件付けにより誘発される扁桃体および海馬における ERK 活性の変化に対する DR4004 の効果

文脈的恐怖条件付けにより誘発される扁桃体および海馬における ERK 活性の変化に対する DR4004 の効果を Fig. 2 に示した。文脈的恐怖反応を示したマウスの扁桃体および海馬では、総 ERK 量は変化することなく（Fig. 2A-2 および 2B-2）、リン酸化 ERK 量の有意な増加が認められた（Fig. 2A-1 および 2B-1）。これらの変化のうち、扁桃体におけるリン酸化 ERK 量の増加は、条件づけ直後の DR4004（5 mg/kg, i.p.）の投与により抑制されたが（Fig. 2A-1）、海馬におけるリン酸化 ERK 量はさらに増加した（Fig. 2B-1）。さらに、リン酸化 ERK 量を同じ試料中の総 ERK 量で除することにより算出した ERK 活性の解析においても、DR4004 の相反する効果が確認された（Fig. 2A-3 および 2B-3）。

3. 音依存性恐怖条件付けにより誘発される扁桃体および海馬における ERK 活性の変化に対する DR4004 の効果

音依存性恐怖条件付けにより誘発される扁桃体および海馬における ERK 活性の変化に対する DR4004 の効果を Fig. 3 に示した。音依存性恐怖反応を示したマウスの扁桃体では、総 ERK 量は変化することなく (Fig. 3A-2) リン酸化 ERK 量が増加し (Fig. 3A-1)、ERK 活性の有意な上昇 (Fig. 3A-3) が認められた。また、これらリン酸化 ERK 量および ERK 活性の変化は、条件付け直後に DR4004 (5 mg/kg, i.p.) を投与することにより有意に抑制された (Fig. 3A-1 および 3A-3)。一方、海馬では、リン酸化 ERK 量、総 ERK 量および ERK 活性いずれにおいても、特筆すべき変化は観察されなかった (Fig. 3B-1、3B-2 および 3B-3)。

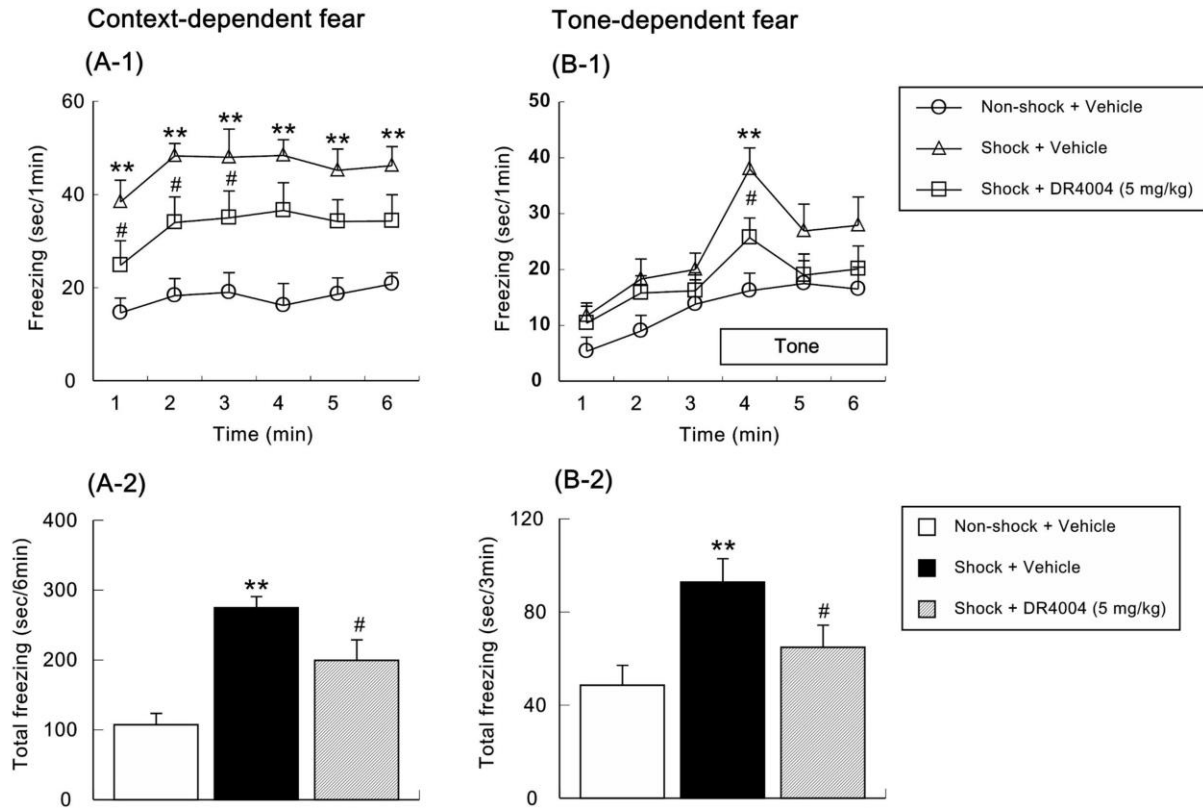


Fig. 1. Effects of DR4004 on context- and tone-dependent fear conditioning in mice. In the context-dependent fear test session, the mouse was exposed to the same chamber that had been used in the conditioning session, and the duration of freezing behavior was recorded for 360 sec. In the tone-dependent fear test session, the mouse was exposed to a novel context, and a 180-sec pause without stimulation preceded a 180-sec period of auditory stimulation. The duration of freezing behavior was recorded for 180 sec during exposure to auditory stimulation. The duration of freezing behavior in each 1-min segment in the context- and tone-dependent fear test sessions is shown in panels A-1 and B-1, respectively. The total duration of freezing behavior in the context- and tone-dependent fear test sessions is shown in panels A-2 and B-2, respectively. DR4004 (5 mg/kg) or vehicle was injected intraperitoneally (i.p.) immediately after conditioning was finished. Each point and column represents the mean with S.E.M. of 10-13 mice. ** $P < 0.01$ vs. non-shock plus vehicle group. # $P < 0.05$ vs. shock plus vehicle group.

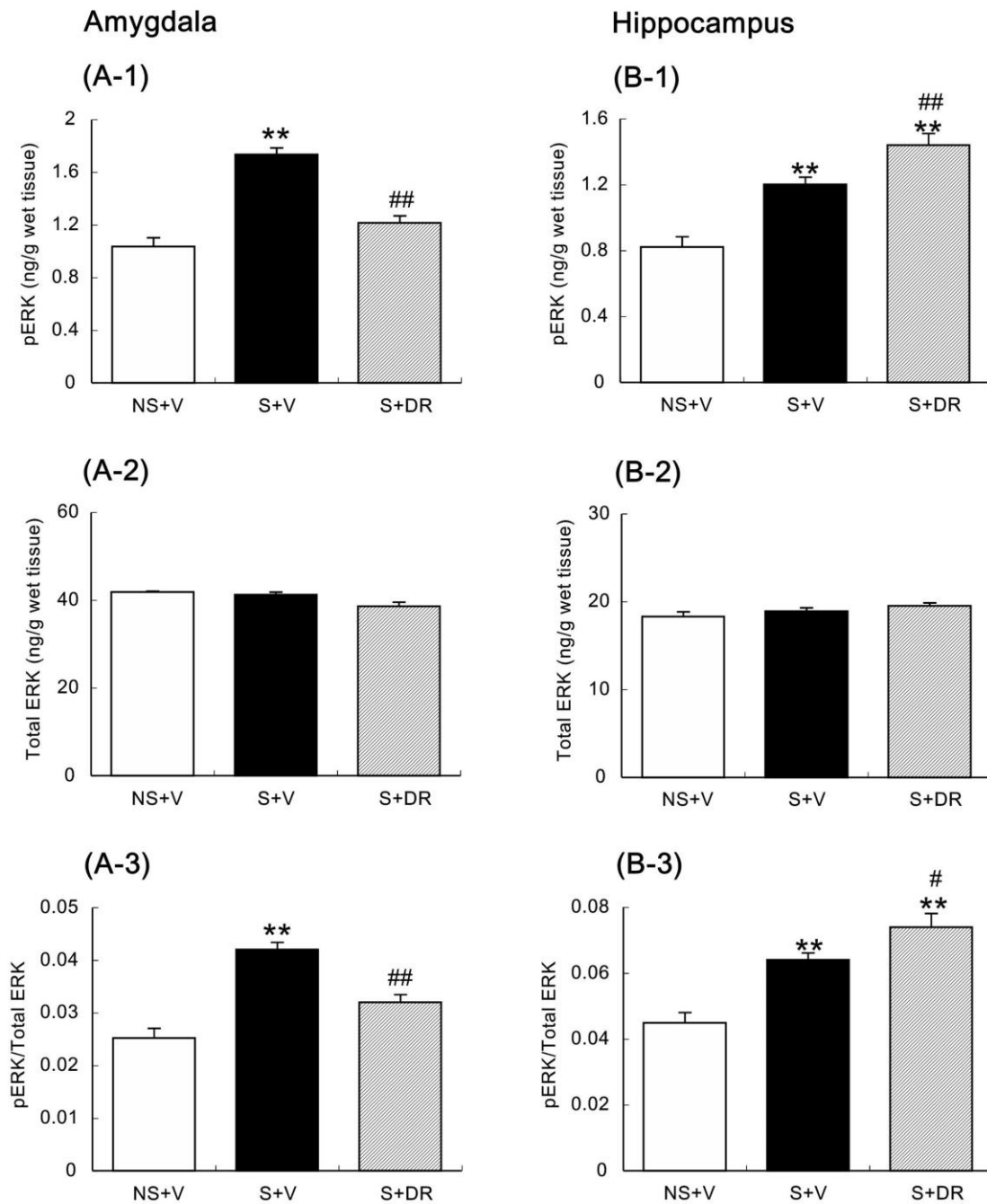


Fig. 2. Effects of DR4004 on the changes in ERK activity in the amygdala and hippocampus of mice that displayed context-dependent fear responses in mice. To evaluate ERK activity (A-3 and B-3), the phosphorylated ERK (pERK) levels (A-1 and B-1) were normalized with respect to the total ERK levels (A-2 and B-2) in the same samples. DR4004 (5 mg/kg) or vehicle was injected intraperitoneally (i.p.) immediately after conditioning was finished. Each point and column represents the mean with S.E.M. of 11-13 mice. ** $P < 0.01$ vs. non-shock (NS) plus vehicle (V) group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. shock (S) plus vehicle (V) group.

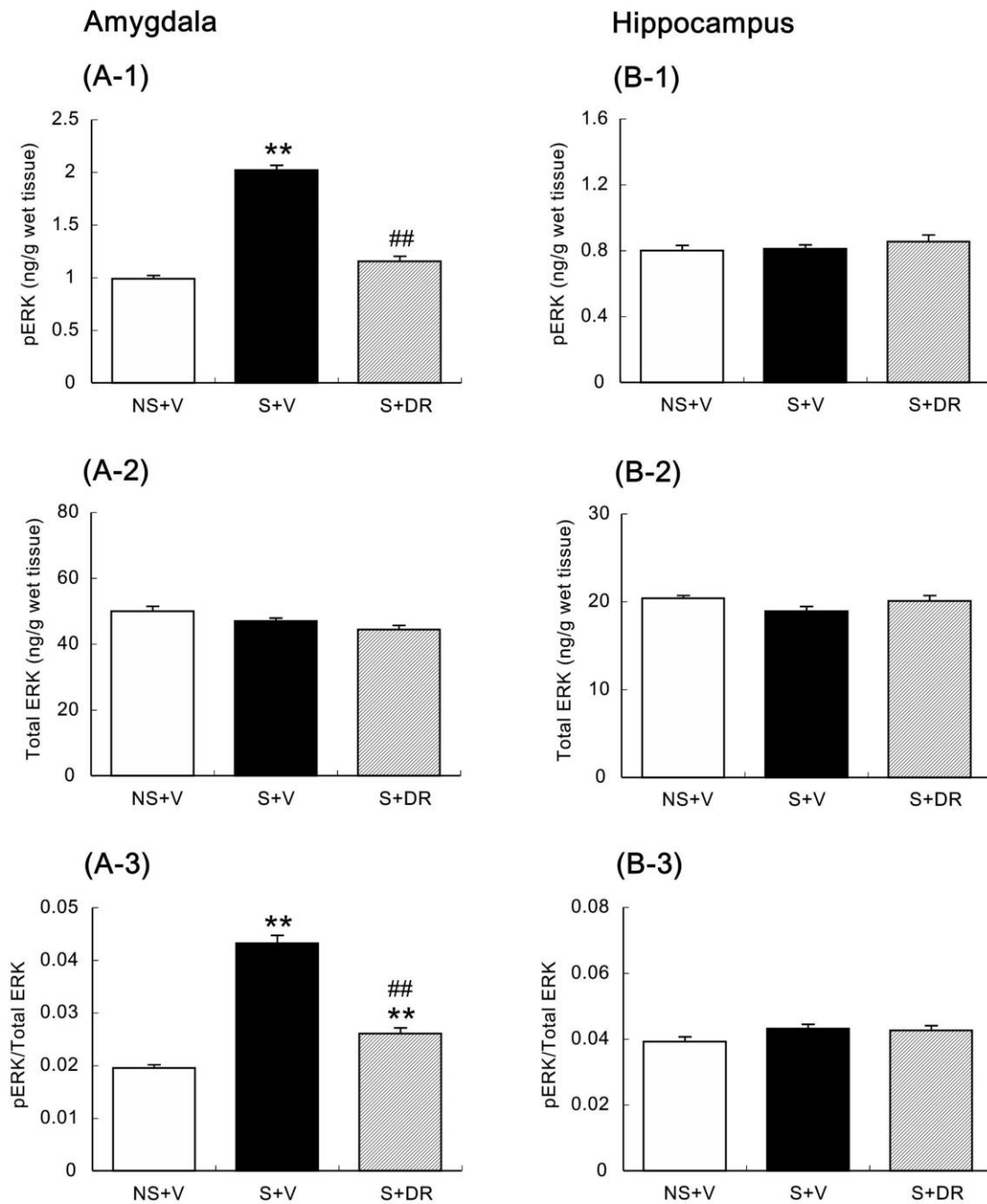


Fig. 3. Effects of DR4004 on the changes in ERK activity in the amygdala and hippocampus of mice that displayed tone-dependent fear responses in mice. To evaluate ERK activity (A-3 and B-3), the phosphorylated ERK (pERK) levels (A-1 and B-1) were normalized with respect to the total ERK levels (A-2 and B-2) in the same samples. DR4004 (5 mg/kg) or vehicle was injected intraperitoneally (i.p.) immediately after conditioning was finished. Each point and column represents the mean with S.E.M. of 10-12 mice. ** $P < 0.01$ vs. non-shock (NS) plus vehicle (V) group. ## $P < 0.01$ vs. shock (S) plus vehicle (V) group.

【考察】

恐怖条件付けにおける脳内 5-HT 神経系の役割の重要性は、薬理的²⁴⁾あるいは遺伝的²⁵⁾操作により 5-HT を欠損させたマウスを用いたこれまでの研究において証明されている。一方、5-HT が作用する 14 種類の 5-HT 受容体サブタイプのうち、情動記憶との関連で注目されてきた受容体としては 5-HT₁ および 5-HT₂ 受容体サブタイプが挙げられるが²⁶⁾、他の 5-HT 受容体サブタイプの役割についてはほとんど解明されていない。本研究では、以前の我々の研究結果¹³⁾に一致して、条件付け直後に選択的 5-HT₇ 受容体拮抗薬である DR4004 を投与することにより、文脈的および音依存性恐怖反応がともに抑制された。これまでに、5-HT₇ 受容体を強制発現させた COS 細胞において、DR4004 は cAMP の基底レベルには影響を与えないものの、5-HT により誘発される cAMP レベルの上昇を抑制することが報告されている²⁷⁾。このことは、DR4004 が、5-HT₇ 受容体に対する拮抗薬であることを示したものである。また、受容体結合実験においては、DR4004 は、5-HT₇ に対する高い親和性と、5-HT_{1A} 受容体、5-HT₂ 受容体、5-HT₄ 受容体、5-HT₆ 受容体および D₂ 受容体に比べて少なくとも 50 倍の選択性を有することが明らかにされている²⁸⁾。したがって、本研究の結果より、文脈的および音依存性恐怖条件付けにおいて、5-HT₇ 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆される。尚、上記した DR4004 の受容体選択性に関する報告²⁸⁾を考慮すると、文脈的および音依存性恐怖条件付けにおける他の 5-HT 受容体サブタイプの関与を完全に否定することはできないため、この点については今後さらなる詳細な検討が必要と考える。

文脈的および音依存性恐怖条件付けに関与する脳領域として、扁桃体の役割の重要性が示唆されている³⁾。本研究では、文脈的および音依存性恐怖反応を示したマウスの扁桃体において、総 ERK 量は変化することなく、リン酸化 ERK 量の増加が認められた。この結果は、恐怖記憶の想起時に、扁桃体において ERK 活性が上昇することを示したこれまでの報告^{29,30)}と一致する。一方、本研究で認められた扁桃体における ERK 活性の上昇は、恐怖条件づけの直後に DR4004 を投

与することにより抑制された。扁桃体は、縫線核からの 5-HT 神経系の入力を密に受けており³¹⁾、この脳領域には 5-HT₇ 受容体が豊富に発現している^{6,8-10)}。また、ラット脳組織由来の初代培養細胞あるいはヒト 5-HT₇ 受容体を強制発現させた細胞株を用いた *in vitro* 研究では、5-HT₇ 受容体の活性化により ERK シグナル伝達が促進することが明らかにされている¹⁶⁻¹⁹⁾。今後、個体レベルでの *in vivo* 研究において 5-HT₇ 受容体と ERK 情報伝達系との連関を明らかにすることが必要であるが、これまでの報告を踏まえると、本研究結果は、文脈的および音依存性恐怖記憶の獲得あるいは想起において、扁桃体における 5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系が重要な役割を担っていることを示唆する。尚、5-HT 受容体ファミリーのうち、5-HT₇ 受容体と同様に、連関する Gs タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼの活性化と cAMP の産生増加を引き起こす受容体として、5-HT₄ 受容体および 5-HT₆ 受容体が挙げられる^{32,33)}。また、これら両受容体を介した細胞内情報伝達に、ERK が関与していることも明らかにされている^{17,34)}。さらに、DR4004 は、5-HT₇ 受容体に加えて、5-HT₄ 受容体および 5-HT₆ 受容体にも親和性を有することが報告されている²⁸⁾。したがって、本研究で認められた ERK 活性上昇の発現機序にも、5-HT₇ 受容体とともに 5-HT₄ 受容体および 5-HT₆ 受容体が関与している可能性が考えられる。

また、音依存性恐怖反応を示したマウスの海馬における ERK 活性を測定したところ、扁桃体にける ERK 活性の上昇とは異なり、特筆すべき変化は認められなかった。同様の知見³⁰⁾が以前に報告されていることを考慮すると、本研究結果は、音依存性の恐怖記憶における海馬の関与は少ないとするこれまでの見解³⁵⁾を支持するものと考えられる。また、興味深いことに、文脈的恐怖反応を示したマウスの扁桃体における ERK 活性の上昇への効果とは対照的に、海馬における ERK 活性の上昇は、恐怖条件づけの直後に DR4004 を投与することにより増強した。現在のところ、本知見の意義を完全に説明することは困難であるが、1 つの可能性として、文脈的恐怖記憶を調節する役割において、海馬と扁桃体は相補的な関係にあることが想定される。すなわち、文脈的恐怖記憶に重要な扁桃体における 5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系の役割の低下を補完するために、

海馬における ERK 活性がさらに増強した可能性が考えられる。近年、扁桃体の 5-HT₇ 受容体を遮断することにより、ERK の下流に存在する標的分子である activity-regulated cytoskeleton-associated protein が海馬において増加することが報告されており³⁶⁾、この知見は我々の仮説を支持するものである。また、文脈的恐怖条件付けにおける海馬-扁桃体間の神経伝達の重要性は、扁桃体基底核への神経投射の存在が確認されている腹側海馬³⁷⁾を破壊することにより、文脈的恐怖条件付けが障害されることで証明されている³⁸⁾。加えて、海馬におけるアセチルコリン情報伝達が、海馬-扁桃体神経回路内における ERK 活性の調節に関わっていることも見出されており³⁹⁾、このような両脳部位間に存在するメカニズムが、本研究で得られた知見に関係している可能性が考えられる。今後、特定の脳領域に薬物を直接注入する技術を用いるなど、より詳細な検討を行うことにより、文脈的恐怖条件付けにおける海馬 5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系の機能的意義が明らかになると考える。

5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系による情動記憶の調節メカニズムについては未だ不明であるが、脳神経細胞の可塑的変化の関与が示唆される。例えば、ごく最近の報告では、5-HT₇ 受容体作動薬が、tropomyosin-related kinase B (TrkB) 受容体の発現とリン酸化を促進させることが示されている⁴⁰⁾。TrkB 受容体は、脳神経細胞の可塑性に関与することが知られている brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の受容体であるため、5-HT₇ 受容体の活性化により、BDNF-TrkB 受容体情報伝達系を介した脳神経細胞の可塑性の促進が示唆される。これまでに、海馬および扁桃体における BDNF の TrkB 受容体を介した情報伝達が、恐怖条件付において重要な役割を果たしていることが明らかにされている^{41,42)}。これらの知見を踏まえると、5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系が調節する脳神経細胞の可塑性に焦点を当てた研究が、情動記憶のメカニズムの解明の一助となることが期待される。

以上、本研究で得られた知見は、扁桃体および海馬における 5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系が、情動記憶において多様かつ重要な役割を担っていることを示唆するものである。近年、扁桃

体および海馬における ERK 情報伝達は、恐怖記憶の獲得とともに消去にも関与していることが報告されている^{43,44)}。また、恐怖記憶の消去の障害は、重篤かつ持続的な不安の発現につながることを想定される。したがって、外傷後ストレス障害のような過度のストレス経験への不応が関係する精神障害に対する新たな治療法を開発する上でも、5-HT₇ 受容体は注目すべき機能分子であると考える。

第 2 章

ストレスに対する適応機構における

5-HT₇ 受容体の役割

【緒言】

生体は、外界からのストレス刺激に抵抗し恒常性を維持するための生理機構（ストレス適応機構）を有しており、この機構の減弱や破綻がストレス性疾患の発症を助長すると考えられている。したがって、ストレス適応機構に関与する脳機能を考究することは、ストレスが主要なリスクファクターと考えられている各種精神疾患の病態解明のみならず、これらの疾患の予防や治療を行う上での新たな展開をもたらすことが期待される。一方、多大な研究成果の累積により、情動性の調節やストレス性精神疾患の発症には、脳内 5-HT 神経系が深く関与していることが広く示唆されている。また、我々はこれまでに、ストレス適応の形成に関与する脳内メカニズムを考究し、5-HT 受容体サブタイプの 1 つである 5-HT_{1A} 受容体が重要な役割を担っていることを明らかにしている⁴⁵⁻⁴⁸⁾。

以前より、抗精神病薬、抗不安薬、抗うつ薬など既存の向精神薬の中に 5-HT₇ 受容体に対して高い親和性を有するものが存在することや⁴⁹⁻⁵¹⁾、抗うつ薬の投与、電気痙攣刺激の負荷あるいはストレス刺激の負荷が 5-HT₇ 受容体の機能変化を引き起こすこと⁵²⁻⁵⁴⁾が明らかにされている。これらの知見は、前述した 5-HT₇ 受容体が大脳辺縁系に高密度に発現しているとの報告^{6,8-10)}と相まって、情動調節における 5-HT₇ 受容体の関与を強く示唆するものである。実際に、これまでの行動薬理学的研究において、選択的 5-HT₇ 受容体拮抗薬が、抗不安様効果^{55,56)}や抗うつ様効果⁵⁵⁻⁵⁸⁾を示すことが報告されている。さらに、興味深い知見として、5-HT_{1A} 受容体が存在する脳部位に 5-HT₇ 受容体が共発現しており、さらに両受容体は 2 量体を形成して機能的に相互作用していることが見出されている⁵⁹⁾。これらの報告と我々のこれまでの知見⁴⁵⁻⁴⁸⁾を考慮すると、脳内 5-HT₇ 受容体がストレス適応の形成に関与していることが推察される。

ストレス適応に関する基礎研究を行う上では、研究目的に見合ったモデル動物を創生することが重要である。1980 年代中頃、Kennett ら⁶⁰⁻⁶²⁾は、ラットに同一のストレス刺激を慢性的に負

荷すると、急性負荷時に惹起される種々のストレス反応が減弱することを見出し報告している。また、同様の現象は、他の複数の研究グループにおいても確認されている⁶³⁻⁶⁵。このようなストレス反応の減弱は、ストレス刺激に対して生体の恒常性維持機構が機能した結果生じる適応現象と捉えることができることから、ストレス適応の形成機構を考究する上で有用なモデルと考えられる。そこで、最近我々は、本モデルの特徴をより明確にすることを目的として、負荷するストレス刺激の強度と適応形成との関連性について、マウスを用いて詳細に検討した⁶⁶。その結果、ホールボード試験により新奇環境における情動行動を指標としてストレス反応を評価したところ、1時間の拘束ストレス刺激の単回負荷により誘発される穴のぞき行動の減少が、1日1回14日間の繰り返し負荷により消失し、ストレスへの適応形成が認められた。しかしながら、4時間の拘束ストレス刺激の繰り返し負荷では穴のぞき行動の低下は消失せず、加えて胸腺の萎縮や副腎の肥大が確認された。すなわち、ストレス刺激の負荷強度を変えることにより、ストレス適応モデルと非適応モデルの作成が可能であることが明らかとなっている。

本研究では、これらストレス適応および非適応モデルマウスを用いて行動薬理学的および生化学的検討を行うことにより、ストレス適応の形成機構における脳内 5-HT₇ 受容体の役割について考究した。

【方法】

本研究は、実験動物に対する動物愛護上の問題に配慮し、「国際医療福祉大学動物実験規定」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守し、国際医療福祉大学動物実験委員会の承認のもと、適正な実験動物の飼育と動物実験を実施した。

1. 実験動物および飼育条件

実験には、体重 30~35 g (実験開始時) の ICR 系雄性マウス (日本エスエルシー) を使用した。動物は恒温恒湿室 (23 ± 1 °C, 50 ± 5 %) にて金網ケージ内で個別飼育し、7:00 点灯、19:00 消灯の 12 時間サイクルの明暗条件下で飼育した。尚、摂餌 (ラボ MR ストック (粉末飼料)、日本農産工業) および飲水 (水道水) はともに自由とした。

2. 使用薬物および薬物の投与方法

実験には、選択的 5-HT₇ 受容作動薬である 4-(2-Diphenyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-1-piperazinehexanamide (LP 12; Tocris Bioscience, MN, USA) を使用した。薬物は生理食塩液 (大塚製薬) に溶解し、4 μ l/mouse の容量で脳室内 (i.c.v.) に投与した。

3. 拘束ストレス刺激の負荷と情動性の評価

マウスを 50 ml の注射筒に閉じ込めることにより、1 日 1 回 1 時間または 4 時間の拘束ストレス刺激を 1 日あるいは 14 日間負荷した。また、ストレス群のマウスに拘束ストレス刺激を負荷している時間帯、非ストレス群のマウスは飼育ケージに放置した。拘束ストレス刺激の最終負荷直後に、ホールボード試験によりマウスの情動性を評価した。尚、LP 12 の効果を検討する実験では、1 日 1 回 4 時間の拘束ストレス刺激を負荷する期間中、連日、ストレス刺激を負荷した直後に、

LP 12 (3 および 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, i.c.v.) または生理食塩液を投与した。

4. ホールボード試験

ホールボード試験では、新規環境におけるマウスの探索行動を、自動ホールボード試験装置 (model ST-1、室町機械)^{45-48,66,67)}を用いて多角的かつ客観的に定量評価した。マウスを床面の中央から等距離に4箇所穴 (直径3 cm) を設けた灰白色角型のオープンフィールド (50 × 50 × 50 cm) 内に入れ、装置内でマウスが示す種々の探索行動 (総移動距離、立ち上がり行動の回数と継続時間、穴のぞき行動の回数、継続時間および潜時) を5分間測定した。各探索行動は装置の上方に設置したデジタルカメラおよび壁面に設置した赤外線センサーにより検出し、専用のデータ解析ソフト (室町機械) を用いて数値化した。

5. Western blot 法

5.1. サンプルの作製

行動試験終了後にマウスの脳を摘出し、各脳部位 (前頭前皮質、海馬、扁桃体、視床下部、中脳) 組織を分画・採取した。脳組織を 20 mM トリス塩酸 (pH 7.4; 和光純薬工業 (株)、大阪)、2 mM エチレンジアミン四酢酸 (和光純薬工業)、エチレンジアミン四酢酸 (2-アミノエチルエーテル) -N,N',N',N'-四酢酸 (和光純薬工業)、250 mM スクロース (和光純薬工業)、1 % トリトン (Calbiochem-Novabiochem, CA, USA) およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete®; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を含む 6 倍量の冷却した緩衝液とともにホモジナイズし、遠心分離 (1,000 x g, 10 min, 4 °C) により得られた上清を western blot 用サンプルとした。

5.2. 標的タンパク質の検出・定量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE法) に従って、

5-20 %の濃度勾配のゲル (Bio-Rad Laboratories, Co., Ltd., CA, USA) 中の各レーンにサンプル緩衝液 (Bio-Rad Laboratories) と上記の方法で調整したサンプル (総タンパク質量50 µg (5-HT₇受容体検出時) あるいは20 µg (総ERKおよびリン酸化ERK検出時)) を注入し、電気泳動によりサンプル中の抗原タンパク質を分子量の差に基づいて分離した。分離完了後に速やかにゲルを取り出し、セミドライプロット式トランスプロットSDセル (Bio-Rad Laboratories) を用いて、電気泳動した抗原タンパク質を、20 %メタノール (和光純薬工業) を含むトリスグリシン緩衝液 (Bio-Rad Laboratories) に浸したポリフッ化ビニリデン膜 (Bio-Rad Laboratories) に電氣的に移行させた。抗原タンパク質を移行させた膜を3 %ウシ血清アルブミン (BSA) (SIGMA-Aldrich) と0.05 % Tween 20 (和光純薬工業) を含むトリス緩衝生理食塩液 (TBS) (Bio-Rad Laboratories) 中でブロッキングし、さらに、3 % BSA中で300倍希釈した5-HT₇受容体抗体 (IMGENEX, Co., Ltd., CA, USA)、1000倍希釈したリン酸化ERK抗体 (Cell Signaling Technology, Co., Ltd., MA, USA) あるいは1000倍希釈したERK抗体 (Cell Signaling Technology) と一晩4 °Cにてインキュベートした。その後、膜をTBSで洗浄し、3 % BSA中で2000倍希釈したホースラディッシュペロオキシダーゼ標識の二次抗体 (Jackson Immuno research laboratories, Co., Ltd., PA, USA) と室温にて1時間インキュベートした。インキュベート終了後に再度膜をTBSで洗浄し、ケミルミノエッセンス法に従い蛍光発色性の基質 (Santa cruz biotechnology, Co., Ltd., CA, USA) を用いて、目的とするタンパク質をChemi Doc XRS (Bio-Rad Laboratories) にて検出した。検出したタンパク質の濃度は、専用の解析ソフト (Quantity One, Bio-Rad Laboratories) を用いて算出した。

6. 免疫組織化学的染色法

6.1. 凍結脳切片の作成

ペントバルビタールナトリウム (70 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて、マウスの左心室より0.6 %ヘパリン (扶桑薬品工業 (株)、大阪) を含む生理食塩液 (大塚製薬) を25 ml 注入し、右心耳に切

り込みを入れて脱血させた。続いて、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩液(PBS; pH 7.4) (和光純薬工業) を10分間全身灌流させた後にマウスの全脳を摘出し、帯状回あるいは海馬を含む脳組織を分画した。分画した脳組織は4%パラホルムアルデヒドを含むPBS中に2時間浸して後固定し、その後、低温室の回転振盪機上にて20%スクロース(和光純薬工業)を一晩浸透させた。翌日からは30%スクロース(和光純薬工業)に置換してさらに二晩放置し、得られた脳組織はドライアイスで冷却した包埋剤(サクラファインテックジャパン(株)、東京)の中で凍結させ-30°Cで保存した。

6.2. 標的タンパク質の局在の検討

クライオスタット(サクラファインテックジャパン)を用いて、凍結させた脳組織より帯状回あるいは海馬を含む厚さ10µmの脳切片を作成し、APSコート化スライドガラス(松波硝子工業(株)、大阪)に貼付した。スライドガラスに貼付した脳切片は、0.01 M PBS(和光純薬工業)で10%に希釈した正常ヤギ血清(NGS; Vector Laboratories Co., Ltd., CA, USA)で60分間ブロッキングした。その後、10% NGSを含む0.01 M PBSで100倍に希釈した5-HT₇受容体抗体(IMGENEX)およびリン酸化ERK抗体(Cell Signaling Technology)を切片上に添加し、4°Cで二晩インキュベートした。インキュベート後は0.01 M PBSで5分間の洗浄を3回行い、10% NGSを含む0.01 M PBSで500倍希釈したAlexaTM488標準抗ウサギIgG抗体(Vector Laboratories)およびAlexaTM546標準抗マウスIgG抗体(Vector Laboratories)を切片上に添加して、室温で遮光しながらさらに2時間インキュベートした。その後、遮光下にて0.01 M PBSで5分間の洗浄を4回行い、スライドガラス上に封入剤(Perma Fluor Aqueous mounting medium (immunonTM); Thermo, Co., Ltd., PA, USA)を添加した後に、カバーガラスで脳切片を封入した。脳切片における5-HT₇受容体およびリン酸化ERKの局在は、共焦点顕微鏡(FV1000、オリンパス(株)、東京)を用いて観察した。

7. 統計処理

値は全て平均±標準誤差で表示した。統計学的有意差検定は、一元配置分散分析および Student-Newman-Keuls 多重比較検定を用いて行い、危険率 5 %未満 ($P<0.05$) を有意差ありと判定した。

【結果】

1. ホールボード試験におけるマウスの情動行動に及ぼす拘束ストレス刺激の影響

ホールボード試験におけるマウスの情動行動に及ぼす拘束ストレス刺激の影響を Fig. 4 および 5 に示した。拘束ストレス刺激を 1 時間単回負荷することにより、穴のぞき行動の回数および持続時間の有意な減少 (Fig. 4D および 4E) と潜時の延長 (Fig. 4F) が誘発されたが、これらのストレス応答は、同強度 (1 時間) の拘束ストレス刺激を 1 日 1 回 14 日間繰り返し負荷することにより消失し (Fig. 4D、4E および 4F)、ストレス適応の形成が認められた。一方、拘束ストレス刺激の負荷時間を 4 時間に延長した場合ではストレス適応の形成は認められず、単回負荷により誘発される穴のぞき行動の回数および持続時間の有意な減少は、1 日 1 回 14 日間繰り返し負荷しても持続した (Fig. 5D および 5E)。

2. ストレス適応および非適応モデルマウスの脳内における 5-HT₇受容体発現レベルの変化

ストレス適応および非適応モデルマウスの脳内における 5-HT₇受容体発現レベルの変化を Fig. 6 に示した。海馬組織を用いて western blot 法により 5-HT₇受容体タンパク質を検出したところ、約 45 および 50 kD の分子量の 2 つのバンドが認められた (Fig. 6A)。したがって、5-HT₇受容体タンパク質の発現量は、両分子量のものを合わせて定量した。また、5-HT₇受容体の発現レベルは、GAPDH を内部標準としてタンパク質量で標準化することにより評価した。その結果、1 日 1 回 1 時間の拘束ストレス刺激を 2 週間繰り返し負荷されたストレス適応モデルマウスの脳内では、他の脳領域 (扁桃体、視床下部、中脳) では特筆すべき変化が生じなかったものの、前頭前皮質 (Fig. 6B) および海馬 (Fig. 6C) において 5-HT₇受容体の発現レベルが有意に増加した。一方、1 日 1 回 4 時間の拘束ストレス刺激を 2 週間繰り返し負荷されたストレス非適応モデルマウスでは、

前頭前皮質 (Fig. 6B) および海馬 (Fig. 6C) いずれにおいても、5-HT₇受容体の発現レベルに有意な変化は認められなかった。

3. 帯状回および海馬 CA2 / CA3 領域における 5-HT₇受容体およびリン酸化 ERK の局在

マウスの帯状回および海馬 CA2 / CA3 領域における 5-HT₇受容体およびリン酸化 ERK の局在を Fig. 7 に示した。免疫組織化学的染色法を用いて検討した結果、帯状回 (Fig. 7A) および海馬 CA2 / CA3 (Fig. 7B) の両領域に存在する多くのリン酸化 ERK 陽性細胞に、5-HT₇受容体の存在が確認された。

4. ストレス適応および非適応モデルマウスの前頭前皮質および海馬における ERK 活性の変化

ストレス適応および非適応モデルマウスの前頭前皮質および海馬における ERK 活性の変化を Fig. 8 に示した。ERK 活性は、リン酸化 ERK 発現量を総 ERK 発現量で除することにより評価した。その結果、5-HT₇受容体の発現レベルの変化に類似して、1日1回1時間の拘束ストレス刺激を2週間繰り返し負荷されたストレス適応モデルマウスの前頭前皮質 (Fig. 8A) および海馬 (Fig. 8B) では、ERK 活性が有意に亢進した。一方、このような ERK 活性の変化は、1日1回4時間の拘束ストレス刺激を2週間繰り返し負荷されたストレス非適応モデルマウスでは認められなかった (Fig. 8A および 8B)。

5. ストレス非適応モデルマウスの情動行動の低下に対する 5-HT₇受容体作動薬 LP 12 の効果

ストレス非適応モデルマウスの情動行動の低下に対する 5-HT₇受容体作動薬 LP 12 の効果を Fig. 9 に示した。1日1回4時間の拘束ストレス刺激を14日間繰り返し負荷したストレス非適応モデルマウスでは、ホールボード試験における穴のぞき行動の回数および持続時間の有意な減少が認められた (Fig. 9D および 9E)。一方、このストレス非適応モデルマウスの情動行動の低下

は、連日、拘束ストレス刺激を負荷した直後に LP 12 (3 および 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, i.c.v.) を投与することにより、用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 9D および 9E)。

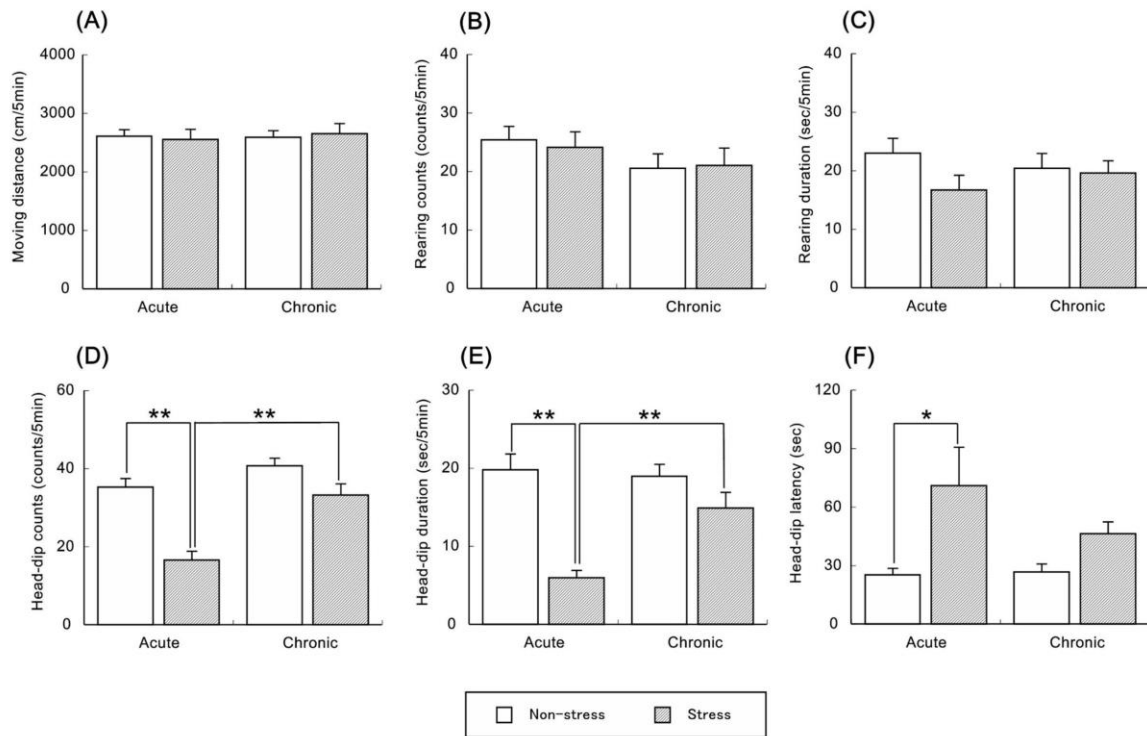


Fig. 4. Effects of exposure to adaptable repeated restraint stress on the exploratory behaviors of mice (A: moving distance; B: number of rearing; C: duration of rearing; D: number of head-dips; E: duration of head-dips; F: latency to head-dips) in the hole-board test. Each column represents the mean with SEM of 12-16 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

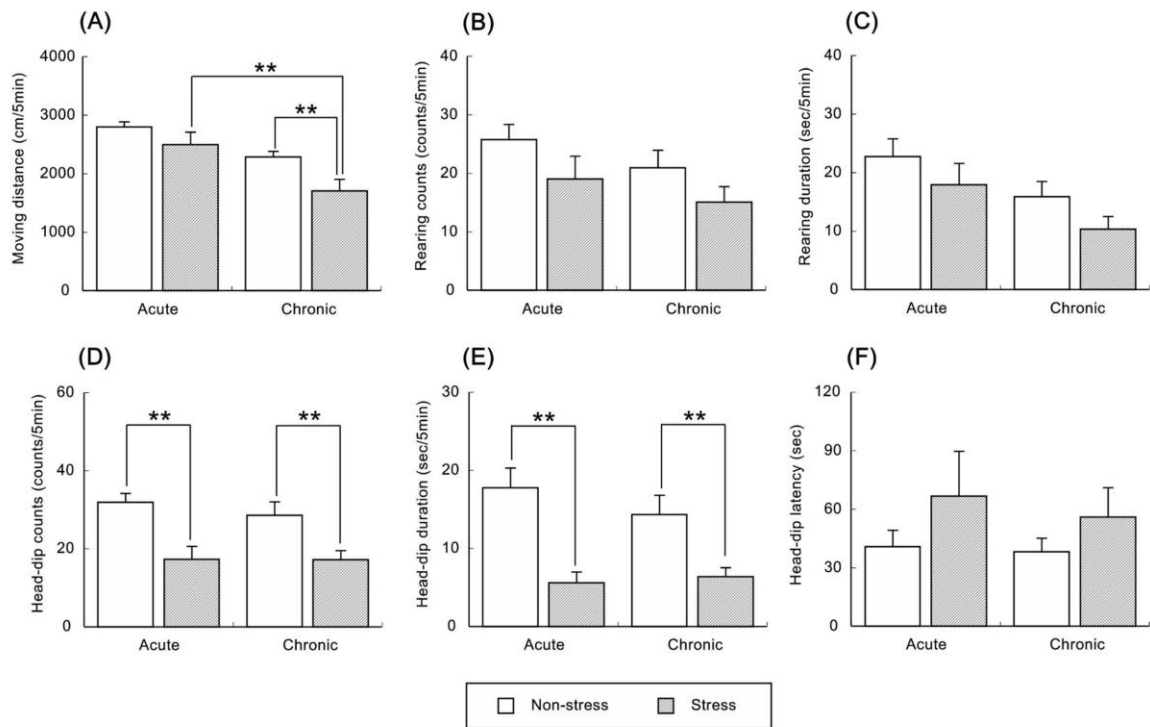


Fig. 5. Effects of exposure to unadaptable repeated restraint stress on the exploratory behaviors of mice (A: moving distance; B: number of rearing; C: duration of rearing; D: number of head-dips; E: duration of head-dips; F: latency to head-dips) in the hole-board test. Each column represents the mean with SEM of 8-15 mice. ****** $P < 0.01$.

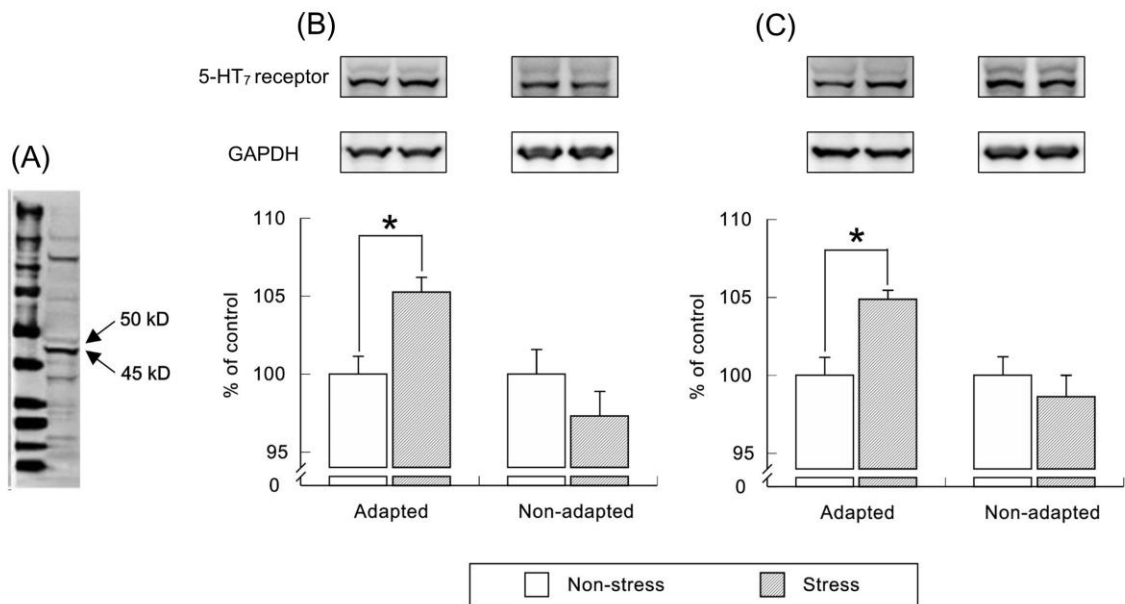


Fig. 6. Changes in 5-HT₇ receptor expression in the frontal cortex and hippocampus of mice exposed to adaptable or unadaptable stress. Immunoblots of hippocampal tissues showing 5-HT₇ receptor (A). The expression level of 5-HT₇ receptor was assessed in terms of the combination of two molecules in the same tissue; frontal cortex (B) and hippocampus (C), and is expressed as the percentage of values measured in the corresponding non-stressed group. Each column represents the mean with SEM of 8-10 mice. * $P < 0.05$.

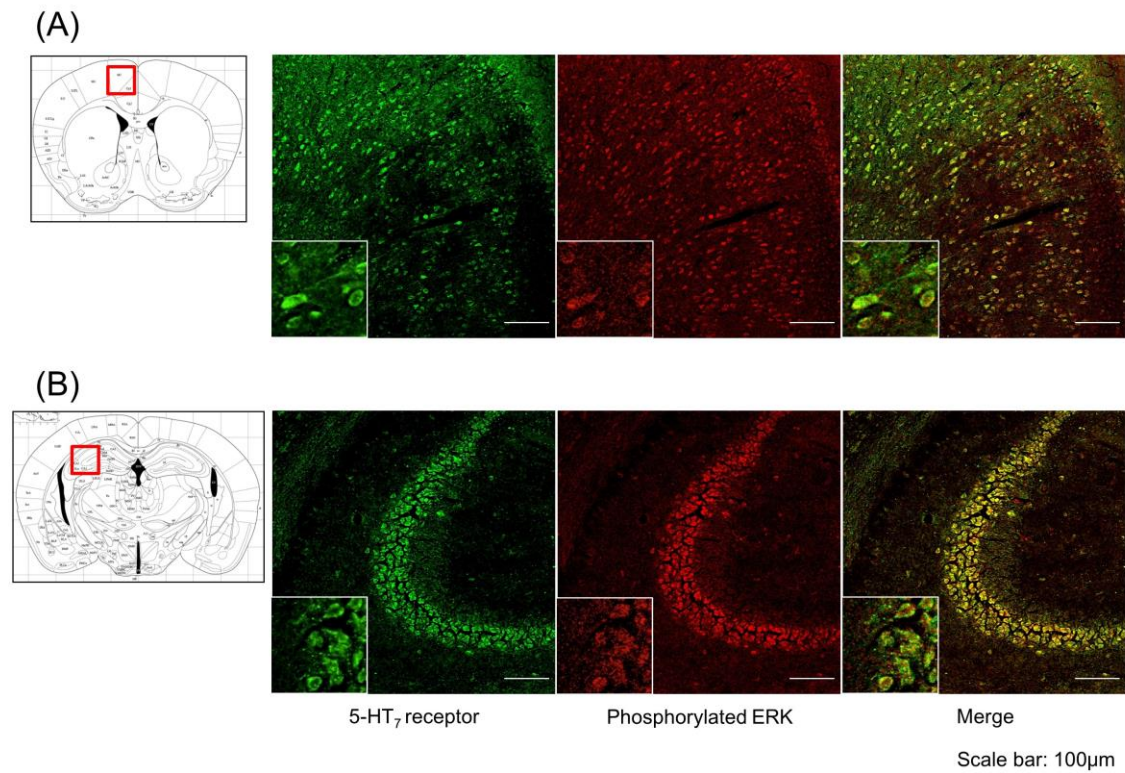


Fig. 7. Localization of 5-HT₇ receptor and phosphorylated ERK in the anterior cingulate cortex (A) and hippocampal CA2/CA3 subfields (B) in mice. 5-HT₇ receptor (green) and phosphorylated ERK (red) are almost co-localized. High-magnification images suggest that 5-HT₇ receptor is localized in membrane of phosphorylated ERK positive cells. Scale bars: 100 µm.

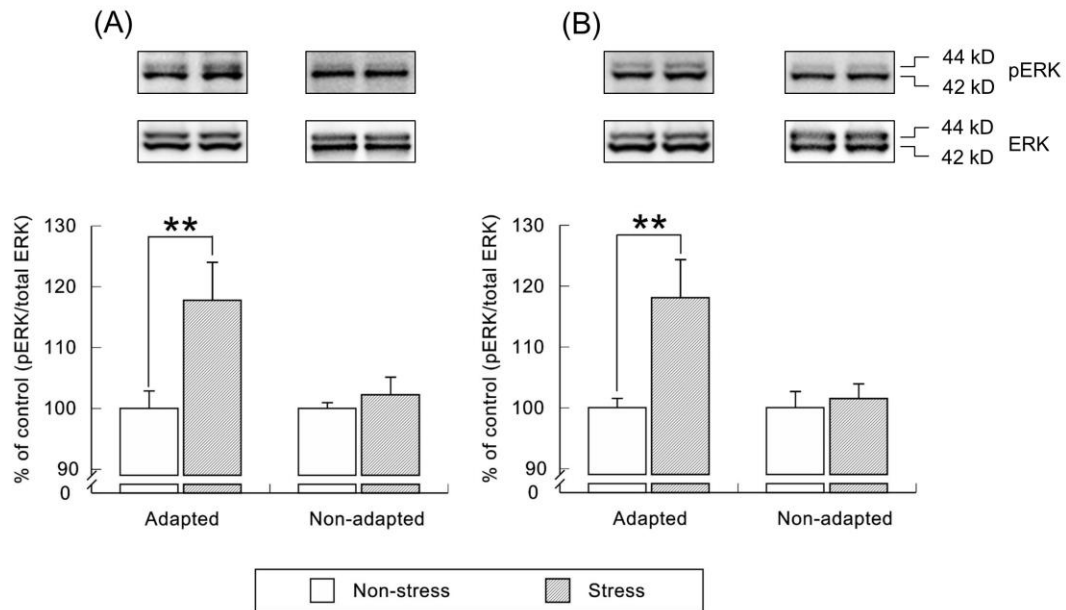


Fig. 8. Changes in ERK phosphorylation in the frontal cortex and hippocampus of mice exposed to adaptable or unadaptable stress. The level of ERK phosphorylation was measured as the intensity of phosphorylated ERK (pERK) normalized with respect to that of total ERK in the same tissue; frontal cortex (A) and hippocampus (B). ERK phosphorylation is expressed as the percentage of values measured in the corresponding non-stressed group. Each column represents the mean with SEM of 8-10 mice. ** $P < 0.01$.

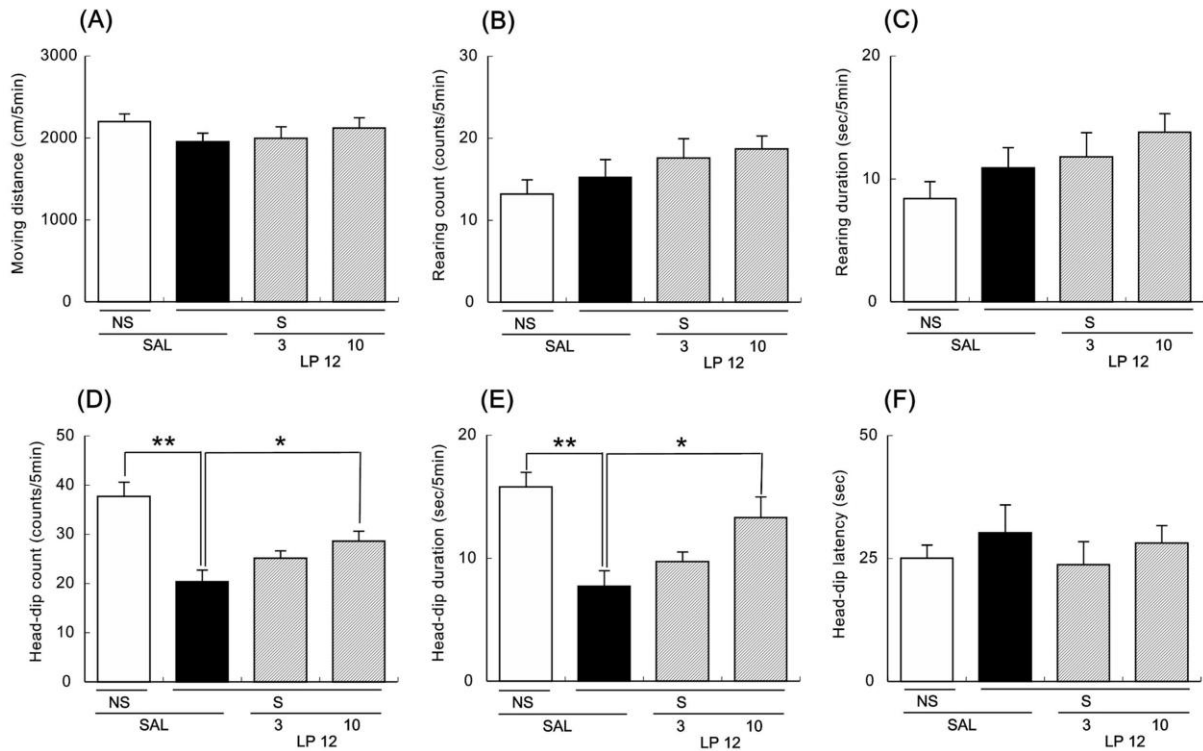


Fig. 9. Effects of LP 12 on the changes in exploratory behaviors of mice (A: moving distance; B: number of rearing; C: duration of rearing; D: number of head-dips; E: duration of head-dips; F: latency to head-dips) in the hole-board test. Mice were either exposed to repeated restraint stress for 240 min/day (stressed group: S) or left in their home cage (non-stressed group: NS) for 14 days. LP 12 (3 or 10 µg/mouse, i.c.v.) or saline (SAL) was injected immediately after the daily exposure to restraint stress. Each column represents the mean with SEM of 16-19 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

【考察】

ホールボード試験は、新奇環境においてマウスあるいはラットが示す探索行動を指標にして情動性を評価するものであり、探索行動の1つである穴のぞき行動は、ストレス刺激の負荷により抑制されることが知られている⁶⁷⁻⁶⁹。また、我々はこれまでに、不安惹起物質であるベンゾジアゼピン受容体に対する逆性作動薬の投与や拘束ストレス刺激の単回負荷により、ホールボード試験におけるマウスの穴のぞき行動が減少することを見出している^{45-48,66,67}。したがって、ホールボード試験における穴のぞき行動は、マウスの情動変化を評価する上で有用な指標と考えられる。本研究では、1時間の拘束ストレス刺激の単回負荷により、ホールボード試験におけるマウスの穴のぞき行動が減少したが、この急性的に生じる情動性の低下は、1時間の拘束ストレス刺激を14日間繰り返し負荷することにより消失し、ストレス適応の形成が認められた。一方、繰り返し負荷する拘束ストレス刺激の時間を4時間に延長した場合にはストレス適応が形成されず、依然、穴のぞき行動の減少が認められた。これらの結果は、我々の以前に得ている知見⁶⁶と一致するものであり、異なる強度の拘束ストレス刺激を繰り返し負荷することにより、ストレス適応および非適応モデルを作製できることを確認した。

これまでに、5-HT₇受容体に対する特異的抗体を用いた western blot 解析では、5-HT₇受容体を強制発現させたチャイニーズハムスター卵巣細胞、ヒト神経膠芽腫細胞株およびヒトミクログリア細胞株いずれにおいても、2つの異なった分子量（約45 kD および50 kD）の5-HT₇受容体が検出されている^{70,71}。これら検出された分子量は想定される5-HT₇受容体の分子量の範囲内にあり、その差異は5-HT₇受容体タンパク質のグリコシル化あるいはリン酸化によるものと考えられている⁷²。そこで、上記既報^{70,71}で採用されているものと同じ抗体を用いて海馬組織に発現する5-HT₇受容体の検出を試みたところ、同様に約45および50 kDの分子量の2つのバンドが認められた。これらの知見より、本研究では、両分子量のものを合わせて5-HT₇受容体タンパク質の発

現量を定量することとした。その結果、1日1回1時間の拘束ストレス刺激を2週間繰り返し負荷されたストレス適応モデルマウスでは、前頭前皮質および海馬において 5-HT₇ 受容体の発現レベルが増加した。一方、1日1回4時間の拘束ストレス刺激を2週間繰り返し負荷されたストレス非適応モデルマウスでは、前頭前皮質および海馬いずれにおいても、5-HT₇ 受容体の発現レベルに変化は認められなかった。これらの知見より、前頭前皮質または海馬における 5-HT₇ 受容体を介した情報伝達の亢進が、ストレス適応の形成に一部関与していることが示唆される。

5-HT₇ 受容体刺激は、連関する G_s タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP の産生増加とそれに続くプロテインキナーゼ A の活性化を引き起こすことが明らかにされている⁶⁾。一方、ERK は、細胞膜に存在する G タンパク質共役型受容体あるいは成長因子受容体が受容した情報を集積し、核内に伝達する役割を担っている⁷³⁾。ERK は哺乳動物において高度に保存されており、元来、細胞の増殖や分化に重要な機能分子として知られていたが、様々な研究成果の累積により、抑うつ、不安あるいは恐怖などの情動性の調節にも関与していることが示唆されている⁷⁴⁾。本研究における免疫組織化学的検討では、帯状回および海馬 CA2 / CA3 に存在する多くのリン酸化 ERK 陽性細胞に、5-HT₇ 受容体の存在が確認された。このことより、ERK が 5-HT₇ 受容体を介する細胞内情報伝達に関与している可能性が示唆され、これまでの報告¹⁶⁻¹⁹⁾と一致する。さらに、重要な知見として、ストレス適応モデルマウスの前頭前皮質および海馬では ERK 活性が亢進していたのに対し、ストレス非適応モデルマウスの両脳部位では全く変化が認められなかった。このように、ストレス適応および非適応モデルマウスの脳内において、5-HT₇ 受容体の発現レベルと ERK の活性化が変動することから、5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系の活性化がストレス適応形成の一因であることが示唆される。

さらに、本研究の最後では、ストレス非適応モデルの情動性の低下に対する選択的 5-HT₇ 受容体作動薬 LP 12 の効果について検討した。ホールボード試験において、1日1回4時間の拘束ストレス刺激を14日間繰り返し負荷したストレス非適応モデルマウスが示す穴のぞき行動の減

少は、連日、拘束ストレス刺激を負荷した直後に LP 12 を脳室内投与することにより抑制された。

これまでに、LP 12 は、モルモット回腸において substance P が誘発する収縮作用を抑制し、強力な作動活性を示すことが報告されている⁷⁵⁾。また、受容体結合実験においては、LP 12 は、5-HT₇ に対する高い親和性と、5-HT_{1A} 受容体、5-HT₂ 受容体、5-HT₄ 受容体、5-HT₆ 受容体および D₂ 受容体に比べて 400 倍以上の選択性を有することが明らかにされている⁷⁵⁾。したがって、本研究の結果より、ストレス適応の形成に脳内 5-HT₇ 受容体の活性化が重要であることが示唆され、前述の生化学的知見に基づいた考察を裏付けるものとなった。

近年、5-HT₇ 受容体作動薬が、数種神経精神疾患の新規治療薬に成り得る可能性を示唆する報告が複数なされている。例えば、気分障害を伴う遺伝性知的障害である脆弱 X 症候群のモデルマウスで認められる抑うつ様行動やシナプス形成異常が、5-HT₇ 受容体作動薬の投与により改善することが報告されている^{76,77)}。また、認知、感覚、運動および自律機能の障害が認められるレット症候群のモデルマウスにおいても、5-HT₇ 受容体作動薬が、運動協調性、空間参照記憶および海馬シナプス可塑性の障害に対して改善効果を示すことが見出されている⁷⁸⁾。これらの報告に加えて、本研究結果は、適応障害に代表されるストレスへのコーピング異常に起因する精神症状に対する新規治療薬として、5-HT₇ 受容体作動薬が有効であることを示唆するものとする。

以前の行動薬理学的研究において、5-HT₇ 受容体拮抗薬が抗不安および抗うつ様効果を有することが明らかにされており⁵⁵⁻⁵⁸⁾、不安障害やうつ病の治療への応用が期待されている。一方、ストレス適応および非適応モデルマウスを用いた本研究で得られた知見は、いずれも 5-HT₇ 受容体を刺激することが、ストレス性精神疾患の治療に有益であることを示唆するものである。これら矛盾する結果に関する考察として、5-HT₇ 受容体拮抗薬の抗不安および抗うつ様効果を示した以前の研究⁵⁵⁻⁵⁸⁾は、いずれも急性ストレスモデルに対する単回投与の効果を検討したものであることが挙げられる。すなわち、慢性ストレスモデルに対する 5-HT₇ 受容体作動薬の効果を検討した本研究は新たな試みであり、得られた成果は、生体のストレス応答機構あるいはストレス性精

神疾患の病態や治療における 5-HT₇ 受容体の役割の多様性を反映しているのかもしれない。この考察を支持する知見として、海馬における 5-HT₇ 受容体依存性の神経活動が、三環系抗うつ薬であるイミプラミンや選択的 5-HT 再取り込み阻害薬であるシタロプラムの慢性投与により低下する⁷⁹⁾のに対し、治療抵抗性のうつ病に有効とされている電気痙攣刺激によっては逆に上昇する⁸⁰⁾ことが報告されている。

ストレス適応形成における脳内 5-HT₇ 受容体の役割に関与する詳細なメカニズムは未だ不明であるが、脳神経細胞の可塑性および形態変化の関与が示唆される。その根拠として、第 1 章においても述べたように、5-HT₇ 受容体作動薬は TrkB 受容体の発現およびリン酸化を増加させ、脳神経細胞の可塑性やリモデリングに関与している BDNF の情報伝達を促進することが明らかにされている⁴⁰⁾。また、5-HT₇ 受容体が、mammalian target of rapamycin、cell division cycle 42、cyclin-dependent kinase 5 および ERK 等の多様な細胞内情報伝達系を介して、脳神経細胞の形態調節に寄与していることも示唆されている⁸¹⁾。さらに、ごく最近では、5-HT₇ 受容体を刺激することにより海馬神経における cAMP response element-binding protein のリン酸化が亢進し、その結果、GluA1 サブユニットのリン酸化を伴うグルタミン酸 AMPA 受容体の活性化が生じることが見出されている⁸²⁾。重要なことは、これら 5-HT₇ 受容体との連関が明らかにされた分子機構はいずれも、最近、ストレス性精神疾患の病態や治療への関与が示唆されているメカニズムと一致することである。したがって、5-HT₇ 受容体が調節する脳神経細胞の可塑性あるいは形態変化に焦点を当てたさらなる詳細な研究が、ストレスへの適応機構やその障害により生じる精神症状の発症メカニズムの解明につながると考えられる。

以上、本研究では、ストレス適応モデルマウスでは、前頭前皮質および海馬において 5-HT₇ 受容体発現の増加とともに ERK 活性の亢進が認められるが、これら変化はストレス非適応モデルでは生じないことを明らかにした。さらに、ストレス非適応モデルが示す情動性の低下は、5-HT₇ 受容体作動薬の投与により抑制されることも明らかにした。これらの知見より、前頭前皮質およ

び海馬における 5-HT₇ 受容体-ERK 情報伝達系が、ストレス適応形成において重要な役割を果たしており、この機構の障害が過度のストレス状況下で生じる情動異常の一因となる可能性が示唆される。また、5-HT₇ 受容体の機能促進に主眼をおいた研究のさらなる推進が、各種ストレス性精神疾患の病態解明や新たな治療法開発の一助となることが期待される。

【総括】

1 章で論述した研究においては、ストレスを認知・記憶する過程において 5-HT₇ 受容体が重要な役割を担っており、その機構に扁桃体における ERK 情報伝達系が関与していることが示唆された。さらに、これら扁桃体の役割に対して、海馬における ERK 情報伝達系は相補的な機能を担っている可能性も併せて示唆された。

2 章で論述した研究においては、ストレスへの適応形成には、前頭前皮質および海馬における 5-HT₇ 受容体および ERK が関与しており、これら機能分子を介した情報伝達の障害がストレスへの非適応につながることを示唆された。また、ストレスへの非適応に起因する情動性の低下に対して、5-HT₇ 受容体作動薬が有効であることも併せて示唆された。

以上、本研究で得られた知見より、ストレスに対する認知・適応機構において、脳内 5-HT₇ 受容体-ERK 連関係が重要な役割を担っており、この機構の障害が過度のストレス状況下で生じる情動異常の一因となる可能性が示唆された。したがって、今後、ストレス性精神疾患の病態生理の解明や新たな治療法の開発を推進する上で、5-HT₇ 受容体は注目すべき機能分子の 1 つであると考えられる。

【出版目録】

本論文は、次の論文を基礎とするものである。

第 1 章

Kotaro Takeda, Minoru Tsuji, Kazuya Miyagawa, Hiroshi Takeda. 5-HT₇ receptor-mediated fear conditioning and possible involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Neuroscience Letters* 638, 69-75, 2017.

第 2 章

Kotaro Takeda, Minoru Tsuji, Kazuya Miyagawa, Hiroshi Takeda. Involvement of brain 5-HT₇ receptors in the formation of stress adaptation in mice. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, in press.

【謝辞】

本稿を終えるに臨み、本研究に際し、終始厳しく暖かいご指導とご助言を賜り、本稿のご閲覧を頂きました国際医療福祉大学 薬学部 薬理学分野の 武田 弘志 教授 に深く感謝しますとともに、謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、格別たるご指導とご鞭撻を賜り、本稿のご校閲を頂きました 辻 稔 准教授 に深く感謝いたしますとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究遂行ならびに本稿作成にあたり、適切なお助言とご指導さらにはお心強い励ましを賜りました 加藤 英明 講師 に深く感謝いたしますとともに、心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、お心強い励ましとご協力を賜りました 宮川 和也 講師 に深く感謝しますとともに心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、ご協力を賜りました 宮岸 寛子 助教 ならびに 齋藤 淳美 助手 に深く感謝しますとともに心より御礼申し上げます。

本研究遂行に多大なご協力をいただきました、大学院生ならびに卒論生諸氏に深く感謝申し上げます。

また、本研究により失われた多くの命に哀悼の意を表し、心よりご冥福を御祈り致します。

最後に、4年間の貴重な大学院生活の場を与えて下さり、いかなる時も慈しみの心を持って、温かく見守って下さった両親をはじめ、家族の皆様にご心より感謝致します。

【引用文献】

- 1) Selye H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936;138:32
- 2) Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1946;6:117-230
- 3) Kim JJ, Jung MW. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2006;30:188-202
- 4) Bauer EP. Serotonin in fear conditioning processes. *Behav. Brain. Res.* 2015;277:68-77
- 5) Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002;71:533-554
- 6) Ruat M, Traiffort E, Leurs R, et al. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90:8547-8551
- 7) Shen Y, Monsma Jr FJ, Metcalf MA, et al. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 1993;268:18200-18204
- 8) Gustafson EL, Durkin MM, Bard JA, et al. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 1996;117:657-666
- 9) Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, et al. Localization of 5HT₇ receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J. Chem. Neuroanat.* 2004;21:63-73
- 10) Bonaventure P, Nepomuceno D, Kwok A, et al. Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptor distribution using [³H]5-carboxamidotryptamine and [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetraline: analysis in brain of 5-HT_{1A} knockout and 5-HT_{1A/1B} double-knockout mice. *J. Pharmacol.*

- Exp. Ther. 2002;302:240-248
- 11) Roberts AJ, Krucker T, Levy CL, et al. Mice lacking 5-HT₇ receptors show specific impairments in contextual learning. *Eur. J. Neurosci.* 2004;19 :1913-1922
 - 12) Sarkisyan G, Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. *Behav. Brain Res.* 2009;202:26-31
 - 13) Matsushita M, Tahara M, Tsuji M, et al. Role of 5-HT₇ receptors in context- and tone-dependent fear conditioning in mice. *J. Tokyo Med. Univ.* 2009;51:326-333
 - 14) Chwang WB, O'Riordan KJ, Levenson JM, et al. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn. Mem.* 2006;13:322-328
 - 15) Gupta-Agarwal S, Jarome TJ, Fernandez J, et al. NMDA receptor- and ERK-dependent histone methylation changes in the lateral amygdala bidirectionally regulate fear memory formation. *Learn. Mem.* 2014;21:351-362
 - 16) Lin SL, Johnson-Farley NN, Lubinsky DR, et al. Coupling of neuronal 5-HT₇ receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac. *J. Neurochem.* 2003;87:1076-1085
 - 17) Norum JH, Hart K, Levy FO. Ras-dependent ERK activation by the human Gs-coupled serotonin receptors 5-HT_{4(b)} and 5-HT_{7(a)}. *J Biol Chem.* 2003;278:3098-3104
 - 18) Norum JM, Méthi T, Mattingly RR, et al. Endogenous expression and protein kinase A-dependent phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Ras-GRF1 in human embryonic kidney 293 cells. *FEBS J.* 2005;272:2304-2316
 - 19) Errico M, Crozier RA, Plummer MR, et al. 5-HT₇ receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 2001;102:361-367

- 20) Manuel-Apolinar L, Meneses A. 8-OH-DPAT facilitated memory consolidation and increased hippocampal and cortical cAMP production. *Behav. Brain Res.* 2004 Jan;148:179-184
- 21) Meneses A Effects of the 5-HT₇ receptor antagonists SB-269970 and DR 4004 in autoshaping Pavlovian/instrumental learning task. *Behav. Brain Res.* 2004;155:275-282
- 22) Horikawa K, Fuji K, Fukazawa Y, et al. Two distinct serotonin receptors co-mediate non-photic signals to the circadian clock. *J. Pharmacol. Sci.* 2013;123:402-206.
- 23) Stiedl O, Misane I, Spiess J, et al. Involvement of the 5-HT_{1A} receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice. *J. Neurosci.* 2000;20:8515-8527
- 24) Archer T, Ögren SO, Ross SB. Serotonin involvement in aversive conditioning: reversal of the fear retention deficit by long-term p-chloroamphetamine but not p-chlorophenylalanine. *Neurosci. Lett.* 1982;34:75-82
- 25) Dai JX, Han HL, Tian M, et al. Enhanced contextual fear memory in central serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105:11981-11986
- 26) Homberg JR. Serotonergic modulation of conditioned fear, *Scientifica* 2012;2012:821549
- 27) Kikuchi C, Nagaso H, Hiranuma T, et al. Tetrahydrobenzindoles: selective antagonists of the 5-HT₇ receptor. *J. Med. Chem.* 1999;42:533-535
- 28) Kikuchi C, Hiranuma T, Koyama M. Tetrahydrothienopyridylbutyl-tetrahydrobenzindoles: new selective ligands of the 5-HT₇ receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002;12:2549-2552
- 29) Besnard A, Laroche S, Caboche J. Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct. Funct.* 2014;219:415-430
- 30) Cannich A, Wotjak CT, Kamprath K, et al. CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn. Mem.* 2004;11:625-632

- 31) Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. Serotonin-immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Comp. Neurol.* 2007;505:314-335
- 32) Gerald C, Adham N, Kao HT, et al. The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J.* 1995;14:2806-2815
- 33) Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, et al. A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993;193:268-276
- 34) Koizumi K, Nakajima H. Serotonin induces the migration of PC12 cells via the serotonin receptor 6/cAMP/ERK pathway. *Biomed Rep.* 2014;2:29-33
- 35) LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 2000;23:155–184
- 36) Zhang F, Feng X, Zeng Q, et al. Sevoflurane induced amnesia inhibits hippocampal Arc expression partially through 5-hydroxytryptamine-7 receptors in the bilateral basolateral amygdala in rats. *Neurosci. Lett.* 2014;562:13-18
- 37) Canteras NS, Swanson LW. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1992;324:180-194
- 38) Maren S, Fanselow MS. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation *in vivo*. *J. Neurosci.* 1995;15:7548-7564
- 39) Calandreau L, Trifilieff P, Mons N, et al. Extracellular hippocampal acetylcholine level controls amygdala function and promotes adaptive conditioned emotional response. *J. Neurosci.* 2006;26:13556-13566
- 40) Samarajeewa A, Goldemann L, Vasefi MS, et al. 5-HT₇ receptor activation promotes an increase in TrkB receptor expression and phosphorylation. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:391
- 41) Liu IY, Lyons WE, Mamounas LA, et al. Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in

- contextual fear conditioning. *J. Neurosci.* 2004;24:7958-7963
- 42) Rattiner LM, Davis M, French CT, et al. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning, *J. Neurosci.* 2004;24:4796-4806
- 43) Herry C, Trifilieff P, Micheau J, et al. Extinction of auditory fear conditioning requires MAPK/ERK activation in the basolateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 2006;24:261-269
- 44) Fischer A, Radulovic M, Schrick C, et al. Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2007;87:149-158
- 45) Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Different effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: a study using hole-board test. *Psychopharmacology* 2000;152:157-166
- 46) Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Protective effects of 5-HT_{1A} receptor agonists against emotional changes produced by stress stimuli are related to their neuroendocrine effects. *Br J Pharmacol* 2001;134:585-595
- 47) Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Brain 5-HT_{1A} receptors as important mediators in the development of stress adaptation. *Curr Neuropharmacol* 2003;1:315-324
- 48) Tsuji M, Miyagawa K, Takeda H. Epigenetic regulation of resistance to emotional stress: possible involvement of 5-HT_{1A} receptor-mediated histone acetylation. *J Pharmacol Sci* 2014;125:347-354
- 49) Eglen RM, Jasper JR, Chang DJ, et al. The 5-HT₇ receptor: orphan found. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:104-107
- 50) Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE. 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000;21:70-77
- 51) Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, et al. Serotonin 5-HT₇ receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacol.*

- Ther. 2011;129:120-148
- 52) Yau JLW, Noble J, Seckl JR. Acute restraint stress increases 5-HT₇ receptor mRNA expression in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 2001;309:141-144
- 53) Tokarski K, Zahorodna A, Bobula B, et al. Repeated administration of citalopram and imipramine alters the responsiveness of rat hippocampal circuitry to the activation of 5-HT₇ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; 524:60-66
- 54) Pitra P, Tokarski K, Grzegorzewska M, et al. Effects of repetitive administration of tianeptine, zinc hydroaspartate and electroconvulsive shock on the reactivity of 5-HT₇ receptors in rat hippocampus. *Pharmacol. Rep.* 2007;59:627-635
- 55) Wesołowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K, et al. Effect of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology* 2006;51:578-586
- 56) Wesołowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K. Potential anxiolytic and antidepressive effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2006;553:185-190
- 57) Wesołowska A, Tatarczyńska E, Nikiforuk A, et al. Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;555:43-47
- 58) Bonaventure P, Kelly L, Aluisio L, et al. Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007;321:690-698
- 59) Renner U, Zeug A, Woehler A, Niebert M, Dityatev A, Dityateva G, et al. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci* 2012;125(Pt10):2486–2499

- 60) Kennett GA, Dickinson SL, Curzon G. Enhancement of some 5-HT-dependent behavioral responses following repeated immobilization in rats. *Brain Res.* 1985;330:253-263
- 61) Kennett GA, Dickinson SL, Curzon G. Central serotonergic responses and behavioral adaptation to repeated immobilization: The effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur. J. Pharmacol.* 1985;119:143-152
- 62) Kennett GA, Chaouloff F, Margaret M, et al. Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: The possible role of serotonin. *Brain Res.* 1986;382:416-421
- 63) Ohi K, Mikuni M, Takahashi K. Stress adaptation and hypersensitivity in 5-HT neuronal system after repeated foot shock. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989;34:603-608
- 64) Haleem DJ, Parveen T. Brain regional serotonin synthesis following adaptation to repeated restraint. *Neuroreport* 1994;5:1785-1788
- 65) Haleem DJ. Adaptation to repeated restraint stress in rats: Failure of ethanol-treated rats to adapt in the stress schedule. *Alcohol Alcohol.* 1996;31:471-477
- 66) Tsuji M, Takeuchi T, Miyagawa K, et al. Yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, alleviates the emotional abnormality induced by maladaptation to stress in mice. *Phytomedicine* 2014;21:363-371
- 67) Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1998;350:21-29
- 68) Rodríguez Echandía EL, Broitman ST, Fóscolo MR. Effect of the chronic ingestion of chlorimipramine and desipramine on the hole board response to acute stresses in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1987;26:207-210
- 69) Yamauchi R, Wada E, Yamada D, et al. Effect of beta-lactotensin on acute stress and fear memory. *Peptides* 2006;27:3176-3182

- 70) Mahé C, Bernhard M, Bobirnac I, et al. Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cell lines. *Br. J. Pharmacol.* 2004;143:404-410
- 71) Mahé C, Loetscher E, Dev KK, et al. Serotonin 5-HT₇ receptors coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells. *Neuropharmacology* 2005;49:40-47
- 72) Boess FG, Martin IL. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 1994;33:275-317
- 73) Grewal SS, York RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signaling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1999;9:544-553
- 74) Galeotti N, Ghelardini C. Regionally selective activation and differential regulation of ERK, JNK and p38 MAP kinase signalling pathway by protein kinase C in mood modulation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2012;15:781-793
- 75) Leopoldo M, Lacivita E, Contino M, et al. Structure-activity relationship study on *N*-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-4-aryl-1-piperazinehexanamides, a class of 5-HT₇ receptor agents. *J. Med. Chem.* 2007;50:4214-4221
- 76) Costa L, Spatuzza M, D'Antoni S, et al. Activation of 5-HT₇ serotonin receptors reverses metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic plasticity in wild-type and *Fmr1* knockout mice, a model of Fragile X syndrome. *Biol. Psychiatry* 2012;72:924-933
- 77) Costa L, Sardone LM, Lacivita E, et al. Novel agonists for serotonin 5-HT₇ receptors reverse metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression in the hippocampus of wild-type and *Fmr1* KO mice, a model of Fragile X Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* 2015;9:65
- 78) De Filippis B, Chiodi V, Adriani W, et al. Long-lasting beneficial effects of central serotonin receptor 7 stimulation in female mice modeling Rett syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* 2015;9:86
- 79) Tokarski K, Zahorodna A, Bobula B, et al. Repeated administration of citalopram and imipramine alters the responsiveness of rat hippocampal circuitry to the activation of 5-HT₇ receptors. *Eur. J.*

Pharmacol. 2005;524:60-66

- 80) Pitra P, Tokarski K, Grzegorzewska M, et al. Effects of repetitive administration of tianeptine, zinc hydroaspartate and electroconvulsive shock on the reactivity of 5-HT₇ receptors in rat hippocampus.

Pharmacol. Rep. 2007;59:627-635

- 81) Speranza L, Giuliano T, Volpicelli F, et al. Activation of 5-HT₇ receptor stimulates neurite elongation through mTOR, Cdc42 and actin filaments dynamics. Front. Behav. Neurosci. 2015;9:62

- 82) Andretta F, Carboni L, Grafton G, et al. Hippocampal 5-HT₇ receptors signal phosphorylation of the GluA1 subunit to facilitate AMPA receptor mediated-neurotransmission *in vitro* and *in vivo*. Br. J.

Pharmacol. 2016;173:1438-1451