

## 題目：ストレスに対する認知・適応機構における 5-HT<sub>7</sub> 受容体の役割

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 副研究指導教員：加藤英明

キーワード：ストレス 認知・適応 5-HT<sub>7</sub> 受容体 マウス

### 【背景と目的】

元来、脳内には、ストレスを認知・記憶し、適切に対処するための巧妙な生理機構（ストレス適応機構）が存在し、この機構の減弱や破綻が、うつ病をはじめとするストレス性精神疾患の発症に関係していると考えられている。したがって、ストレス適応機構に関する脳内メカニズムを考究することは、ストレス性精神疾患の発症要因や予防因子を明らかにするための重要な課題である。一方、これまでに、脳内セロトニン（5-HT）神経系が、ストレスに対する認知あるいは適応機構において重要な役割を担っていることが示唆されている。現在、5-HT 受容体は、5-HT<sub>1</sub> から 5-HT<sub>7</sub> の 7 種のタイプに大別され、さらにこれら受容体タイプには計 14 種類のサブタイプが存在することが明らかにされている。5-HT<sub>7</sub> 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、ストレス反応や情動調節、あるいは精神疾患発症との密接な関連が示唆されている脳部位に高密度に発現しているが、その生理的意義については未だ不明な点が多い。本研究では、ストレスに対する認知・適応機構における 5-HT<sub>7</sub> 受容体の役割を明らかにし、ストレス性精神疾患の病態解明や新たな治療法開発への応用につなげることを目的とした。

### 【方法】

#### 1. 使用動物

全ての実験には ICR 系雄性マウス（6 週齢）を用いた。

#### 2. ストレスの認知・記憶機構における 5-HT<sub>7</sub> 受容体の役割に関する検討

##### 1) 恐怖条件付けストレス試験

ストレスの認知・記憶に関する評価は、恐怖条件付けストレス試験を用いて行った。マウスをショック箱に入れ、音刺激（80 dB, 1 min）とそれに続く電撃刺激（1 mA, 2 sec）の負荷を 3 回繰り返すことで条件付けを行った。条件付け 24 時間後では、再度ショック箱にマウスを入れ、すくみ行動の出現時間を 6 分間測定した（文脈的恐怖条件付けの評価）。その 24 時間後では、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、音刺激を 3 分間負荷してすくみ行動の出現時間を測定した（音依存性恐怖条件付けの評価）。すくみ行動の出現時間の延長を、ストレスの認知・記憶の指標とした。選択的 5-HT<sub>7</sub> 受容体拮抗薬である DR4004 は、条件付け終了後に腹腔内投与した。

##### 2) Extracellular signaling-regulated kinase 1/2（ERK）活性化レベルの測定

恐怖条件付けストレス試験が終了した直後に海馬および扁桃体を摘出し、各脳組織におけるリン酸化 ERK および総 ERK の発現量を ELISA 法により定量した。ERK 活性化レベルは、リン酸化 ERK 発現量を総 ERK 発現量で除することにより算出した。

#### 3. ストレスに対する適応機構における 5-HT<sub>7</sub> 受容体の役割に関する検討

##### 1) ストレス適応および非適応モデルマウスの作成

マウスに 1 時間あるいは 4 時間の拘束ストレスを 1 日 1 回 14 日間繰り返し負荷し、最終ストレス負荷直後にホールボード試験にて情動行動を評価した。拘束ストレスの急性負荷により誘発される情動行動の低下が消失することをストレス適応の指標とし、依然認められるかあるいはさらに増悪することをストレス非適応の指標とした。選択的 5-HT<sub>7</sub> 受容体作動薬である LP 12 は、拘束ストレス負荷を開始した 3 日目より、連日、ストレス負荷直後に脳室内投与した。

## 2) 5-HT<sub>7</sub>受容体およびリン酸化 ERK の分布と局在の検討

全脳より帯状回あるいは海馬を含む脳切片を作成し、両脳部位における 5-HT<sub>7</sub>受容体およびリン酸化 ERK の分布と局在を、免疫組織化学染色法により検討した。

## 3) 5-HT<sub>7</sub>受容体発現量および ERK 活性化レベルの測定

上記のホールボード試験が終了した直後に各脳部位（前頭前皮質、海馬、扁桃体、視床下部、中脳）を摘出した。各脳組織における 5-HT<sub>7</sub>受容体、リン酸化 ERK および総 ERK の発現量を Western Blot 法により定量した。ERK 活性化レベルは、リン酸化 ERK 発現量を総 ERK 発現量で除することにより算出した。

### 【倫理上の配慮】

実験の実施に当たっては、実験動物に対する動物愛護上の問題に配慮し、本学の動物実験委員会承認のもと、「国際医療福祉大学動物実験規程」ならびに「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して、適切な実験動物の飼育と動物実験を行った。

### 【結果および考察】

#### 1. ストレスの認知・記憶機構における 5-HT<sub>7</sub>受容体の役割に関する検討

- ・ 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は、ともに DR4004 を条件付け終了直後に投与することにより抑制された。
- ・ 文脈的恐怖条件付けによるすくみ行動を示すマウスの扁桃体および海馬では、ERK リン酸化レベルの上昇が認められた。DR4004 を条件付け終了直後に投与することにより、扁桃体における ERK リン酸化レベルの上昇は抑制されたが、海馬における ERK リン酸化レベルはさらに上昇した。
- ・ 音依存性恐怖条件付けによるすくみ行動を示すマウスにおいては、扁桃体においてのみ ERK リン酸化レベルが上昇し、この変化は条件付け終了直後の DR4004 の投与により抑制された。
- ・ 以上の結果より、ストレスを認知・記憶する過程において 5-HT<sub>7</sub>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. ストレスに対する適応機構における 5-HT<sub>7</sub>受容体の役割に関する検討

- ・ 1時間の拘束ストレスを1日1回14日間繰り返し負荷したマウスでは、急性負荷時に認められる情動行動（ホールボード試験における穴のぞき行動）の低下が消失し、ストレスへの適応形成が確認された。一方、繰り返し負荷する拘束ストレスを4時間に延長した場合ではストレス適応が形成されず、依然、情動行動の低下が認められた。
- ・ 帯状回および海馬において、5-HT<sub>7</sub>受容体とリン酸化 ERK の共局在が確認された。
- ・ 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-HT<sub>7</sub>受容体発現量および ERK 活性化レベルの上昇が生じた。一方、このような変化は、ストレス非適応モデルマウスでは認められなかった。
- ・ ストレス非適応モデルマウスが示す情動行動の低下は、拘束ストレスの繰り返し負荷期間中に LP 12 を投与することにより抑制された。
- ・ 以上の結果より、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-HT<sub>7</sub>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-HT<sub>7</sub>受容体作動薬が有効であることも併せて示唆された。

### 【結語】

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-HT<sub>7</sub>受容体-ERK 情報伝達系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、5-HT<sub>7</sub>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を期待する。