

## 論 文 要 旨

**Repeated stress-induced expression pattern alterations of the hippocampal chloride transporters KCC2 and NKCC1 associated with behavioral abnormalities in female mice**

反復ストレスは雌性マウスの海馬の Cl<sup>-</sup> トランスポーター、  
KCC2 と NKCC1 の発現パターンを変化させ、行動異常を伴う

塚原 飛央

**【序論及び目的】**

ストレス社会と言われる現代社会において、ストレスが気分障害や精神疾患の引き金になっていることが報告されている。また、ストレスの生体応答として GABA 神経機構が大きな役割を果たしていることがわかってきたが、雌性動物においては、性周期による行動のバラツキが実験解析を困難にするため、研究は遅れているのが現状である。これは、女性が男性に対して、気分障害などの精神疾患への罹患率が高いという臨床データが基礎研究に適正に反映されないことを示している。

一方、過剰なストレスが慢性的に負荷されることで、GABA 神経機構の抑制機能に異常が生じることが、疾患発症に関与すると報告されているが、ほとんどが GABA 合成酵素や受容体の異常を示すものであった。しかし、近年、神経細胞のクロライドイオン (Cl<sup>-</sup>) のホメオスタシスを調節している K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 共輸送体 (KCC2) と Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 共輸送体 (NKCC1) の発現パターンが変化することで、細胞内外の Cl<sup>-</sup> 濃度勾配が変化し、結果、抑制性である GABA 作用が興奮性に変化していることを示唆する所見がうつ病患者で認められたことが報告された。ゆえに、申請者は、反復ストレスが上記輸送体と他の GABA 神経伝達機構に関与する因子を情動や認知機能に関与する海馬において組織化学的に検討するとともに、それらに付随する行動変化を解析し、雌性動物におけるストレスが与える影響の基礎的知見を得ることを目的とした。

**【材料及び方法】**

Days 1-7 間に 8 週齢の C57/BL6J 雌マウス 33 匹を 7 日間の馴化期間を置き、コントロール群とストレス群に分け、ストレス群には、21 日間マウスがストレスを感じる幅計の胃管チューブにより一日一回 10g/kg の水を投与した。ストレス負荷時以外はストレス群もコントロール群と同様に飲食は自由に行えた。

**1. GABA 神経伝達機構関連タンパクの組織化学的検討:** Day 28 にコントロール群 (n = 6) ストレス群 (n = 5) を還流固定し、免疫染色を行った。GAD67、GABA<sub>A</sub>-R $\alpha_1$ 、KCC2、NKCC1 の DAB 染色を行い海馬の諸領域における発現強度を測定した。KCC2 と NKCC1 は、トランスポーターとして機能するには、細胞膜に存在することが必須であるので神経細胞マーカーである (microtubule-associated protein) MAP2 との 2 重染色を行い共焦点顕微鏡で、局在領域を調べた (二値化を行い、単位面積あたりの総発現量、共局在量、膜発現量 (%) を測定した)。

**2. 行動科学的検討：**コントロール群 (n = 13) ストレス群 (n = 8) を行動解析に使用した。

オープンフィールド試験 (OFT; Day 28): 自発運動量、中心滞在時間、中心侵入回数、rearing の回数を測定。新奇物質認識 (NOR) 試験 (Days 29-30): 探索時間、新奇物質の識別率を測定。高架十字迷路試験 (EPM; Day 31): オープンアームの滞在時間、侵入回数を測定。社会行動試験 (SAT; Day 32): 強制水泳試験 (FST; Day 33): 無動時間の測定をそれぞれ試行・検討した。行動実験を試行したストレス群は最後の試験の前日までストレス負荷を行った。

## 【結果】

### 1. ストレスが海馬の GABA 神経伝達機構関連タンパクの発現強度に与える影響

反復ストレスにより、海馬の CA3 領域錐体細胞層において GABA 合成酵素である GAD67、GABA<sub>A</sub>R- $\alpha_1$  および NKCC1 の発現が増加した。逆に KCC2 の発現強度は CA3 と CA1 領域錐体細胞層において減少した。

### 2. ストレスが海馬の KCC2 と NKCC1 の発現パターンに与える影響

反復ストレスにより、KCC2 の総発現量が CA3 と CA1 領域錐体細胞層において減少した。ストレスにより歯状回の顆粒細胞においてのみ、KCC2 と MAP2 の共局在量が増加し、KCC2 の内在化が生じ細胞膜上の KCC2 が減少した。CA3 と CA1 領域においては、内在化量は変化せず、総発現量自体が減少したため、膜発現量は減少した。

NKCC1 においては、ストレス負荷により CA3 領域においてのみ総発現量が増加した。一方で、全ての領域で MAP2 との共局在量が減少したため膜発現量は増加した。

### 3. ストレスがマウスの行動に与える影響

OFT においてストレスは、自発運動量、中心滞在時間、中心侵入回数に影響しなかったが、rearing の回数は有意に減少させた。NOR 試験においてストレスは探索時間を増加させ、新奇物質の識別率は減少させた。EPM においてオープンアームの滞在時間、侵入回数をともに増加させた。SAT において stranger マウスに対する匂い嗅ぎ行動、stranger マウスでの滞在時間、stranger チャンバー/empty チャンバーの侵入回数も減少した。FST においてストレスは無動時間には影響しなかった。

## 【結論及び考察】

反復ストレスによって、海馬神経細胞の Cl<sup>-</sup> を細胞外に輸送する KCC2 の膜発現量が減少し、Cl<sup>-</sup> を細胞内に輸送する NKCC1 の膜発現量が増加した。これは、細胞内の Cl<sup>-</sup> 濃度が増加することを示唆しており、GABA<sub>A</sub> 受容体の Cl<sup>-</sup> チャンネルが開口した際に Cl<sup>-</sup> の濃度勾配が逆転あるいは、減少することによって、GABA の抑制性の反応が減少することが考えられる。また、ストレスにより、GAD67 と GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha_1$  サブユニットは、むしろ増加したので基質と受容体は、十分にあると考えられる。

また、行動実験ではストレスにより rearing の減少、NOR 試験において総探索時間が増加したにも関わらず、新奇物質の認識率が低下したことから注意力および認知機能の低下が示唆された。新奇環境における探索行動や認知機能は、海馬と密接に関係するため、本実験の組織科学的所見を支持する結果が得られた。さらに、ストレスにより EPM においてオープンアームの滞在時間が増加したことも注意力の欠如を支持し、SAT における成績の低下を含めると統合失調症やてんかん患者と類似した表現型となることが示唆された。

結論として、雌性動物においてストレス負荷が GABA 神経伝達機構の抑制機能の低下を生じ、興奮と抑制のバランスが海馬において崩れている可能性があり、それは、KCC2 や NKCC1 の発現量だけでなく局在変化が生じていることが示唆された。

