

令和2年度 学位論文内容要旨

論文題目

(邦文)

ストレス負荷マウスの情動行動における
プロテインキナーゼC媒介性の
セロトニン輸送体機能に関する研究

(欧文)

Study on serotonin transporter function
regulated by protein kinase C activity in
emotional behaviors of stressed mice

名城大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程

氏 名

伊 藤 貴 博

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。ストレス刺激が過剰（自然災害、事故、犯罪被害など）な場合には、脳の機能や構造に大きな影響を与える程の病的状態の原因となる (Weger & Sandi 2018)。そのため、心的外傷後ストレス障害 (PTSD)、大うつ病性障害、あるいは不安障害などストレス関連精神疾患の病因につながる (Park *et al.* 2019; Shadrina *et al.* 2018; Wu *et al.* 2013)。ストレス関連精神疾患の治療目標は、「病前の適応状態」に回復し、社会復帰することである。しかし、治療中のストレスの蓄積や再負荷は症状の悪化や再発の誘因となり、様々なストレスがかかる現代社会においてその再発率は約 50%にのぼり、ストレス関連精神疾患患者はストレスに対して脆弱であることが明らかになっている (Qaseem *et al.* 2016)。したがって、ストレス脆弱性に関連する生体分子機構を探索することは、ストレス関連精神疾患の発症あるいは新規治療や再発予防法確立に繋がると考えられる。

ストレス関連精神疾患は身体的、心理社会的ストレスなど様々なストレスによって惹起されることから、それらを模したモデル動物が作製されている (Ménard *et al.* 2016)。身体的ストレスのひとつとして、水泳ストレス負荷は、その曝露の時間（強度）や回数（頻度）を調整することができ (Browne *et al.* 2014)、いずれのマウスにも同等のストレスを負荷することができる。Tsunekawa らは、15 分間の比較的長い水泳ストレスを負荷したマウスに 6 分間の水泳ストレスを再負荷すると、意欲や社会性行動の低下が発現することから、水泳ストレスマウスモデルはヒト PTSD 様の抑うつ症状や不安症状に外挿性の高い生物反応を再現できることを報告している (Tsunekawa *et al.* 2008)。したがって、水泳ストレスはストレス負荷の強度や頻度によって変化するストレス関連分子の探索に適していると考えられる。

そこで第 1 章では、水泳ストレス負荷の強度や頻度を組み合わせた水泳ストレスマウスモデルのストレス関連精神疾患モデル動物としての妥当性を検証した。その結果、15 分間の水泳ストレス負荷（強ストレス負荷）マウスは、ストレス負荷から 24 時間後、6 分間の水泳ストレス負荷（再ストレス負荷）した時の無動時間が非ストレス負荷マウスのそれと比較して有意に延長しており、意欲の低下が認められた。その程度は 1 分間の水泳ストレス負荷（弱ストレス負荷）マウスより増悪しており、ストレス負荷の強度に依存していた。弱ストレス負荷ではなく強ストレス負荷マウスの社会性行動時間は、ナীবマウスのそれと比較して有意に短縮しており、社会性行動の低下が認められた。さらに強ストレス負荷マウスに認められた社会性行動の低下は、再ストレス負荷により有意に増悪した。強ストレス負荷かつ再ストレス負荷したマウス（再ストレス負荷マウス）に認められた情動行動（意欲・社会性行動）の低下は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）セルトラリンにより緩解された。再ストレス負荷マウスの前頭前皮質において、セロトニン（5-HT）含量が有意に減少していた。以上の結果から、水泳ストレスの強度や頻度を組み合わせてマウスに負荷することで、ストレスに対する耐性や脆弱性を制御できることが示唆された。本ストレスマウスモデルにおける情動行動の低下は、ストレス関連精神疾患の病態仮説（モノアミン仮説）や治療反応性を反映することが結論付けられた。

脳内 5-HT 神経系の神経伝達物質である 5-HT 量は、セロトニントランスポーター (SERT) によって制御され (Klein Gunnewiek *et al.* 2018)、その機能はストレス脆弱性や大うつ病性障害、PTSD や不安障害などストレス関連精神疾患の病態生理に深く関与している (Karg *et al.* 2011; Park *et al.* 2019)。臨床において、SSRI は大うつ病性障害、PTSD や不安障害の抑うつ症状や不安症状に対する第一選択薬となり、長期使用は症状の再発を予防する (Southwick *et al.* 2005)。基礎研究において、マウスのうつ様行動はストレス負荷後の SERT の機能亢進あるいは局在変化 (細胞表面での増加) によって悪化し、ストレスによる症状と SERT 発現との間に関連性が認められている (Bruchas *et al.* 2011)。したがって、ストレス脆弱性に関わる SERT の機能制御因子を探索することは、「病前の適応状態」に回復させるための鍵となり、また治療反応性に乏しい病態の新たな治療ターゲットとなる。

SERT は、プロテインキナーゼ C (PKC) によってセリン (Ser) 残基をリン酸化されると固有特性である 5-HT 再取り込み能を消失し、それに続きスレオニン (Thr) 残基をリン酸化されると内在化により細胞膜局在の SERT を減少させ、細胞内局在として機能を消失する (Jayanthi *et al.* 2005)。PKC は SERT 活性の重要な調節因子であるが、PKC による SERT リン酸化制御機構が精神症状の発現に関与しているかどうか不明である。一方、PKC 関連シグナル伝達は、ストレスによって引き起こされる抑うつ症状の分子機序 (Chen *et al.* 2012) およびストレス関連精神疾患の治療反応 (Manosso *et al.* 2015; Ramos-Hryb *et al.* 2017; Réus *et al.* 2011) と密接に関連している。PKC のアイソフォーム (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 μ 、 ζ 、および ν / λ) とストレス関連精神疾患との関連として、大うつ病性障害患者の死後脳解析で前頭前皮質における PKC β I および PKC ϵ の発現量減少が報告されている (Shelton *et al.* 2009)。PKC 関連シグナル伝達がストレスに応答しているにも関わらず、SERT の機能調節を担う PKC アイソフォームとマウスの情動行動との関連を明らかにした報告は少ない。

そこで第 2 章では、第 1 章においてストレス関連精神疾患のモデル動物として妥当であることを示した水泳ストレスマウスモデルを用いて、ストレス脆弱性に関わる因子として PKC-SERT 活性制御機構について行動薬理的・神経化学的に検討した。その結果、再ストレス負荷マウスの前頭前皮質における PKC β I リン酸化タンパク質および SERT リン酸化 (Ser および Thr) タンパク質の発現が低下していた。PKC 活性化薬 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) の急性投与により、再ストレス負荷マウスに認められた情動行動の低下、および PKC β I と SERT のリン酸化タンパク質の発現低下は緩解された。また、PMA を急性投与したマウスの前頭前皮質において、5-HT 神経機能の指標である 5-HT 代謝回転および細胞外 5-HT 量が増加した。一方、PKC 阻害薬チェレリスリンを連続投与し、PKC 活性を低下させておいたマウスでは弱ストレス負荷に脆弱となり、意欲低下の増悪、社会性行動の低下が認められた。以上の結果より、水泳ストレス負荷による意欲や社会性行動の低下は、前頭前皮質における PKC β I の活性低下による SERT リン酸化制御機構の不全から 5-HT 神経機能が低下したことによるものと示唆される。

本研究により得られた知見は、PKC の活性化を介した SERT リン酸化機能制御が水泳ストレス負荷によるマウスの情動障害に関与し、ストレス脆弱性に関連する生体分子機構として可能性のあることを明らかにした。また、PKC β I 活性がマウスのストレス脆弱性に関与することが示唆されたことから、PKC β I 関連シグナルや関連因子の探索はストレス関連精神疾患の新規治療・再発予防法確立の一助になると思われる。