

論文審査の要旨

報告番号	総研第 444 号	学位申請者	古川 みなみ
審査委員	主査	後藤 哲哉	学位
	副査	山崎 要一	副査
	副査	齋藤 充	副査
			八木 孝和

Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression

(新生児母子分離は KCC2 の発現を抑制することで、GABA の興奮性から抑制性への機能スイッチを遅らせる)

育児放棄といった幼少期ストレスは発達障害などの脳機能障害の発症に関与することが報告されている。齧歯類では特に生後1～2週間のストレスがそのリスクを大幅に高めるとされている。この時期には神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)が大半のニューロンに対して興奮性から抑制性へと機能変化(GABA スイッチ)すること、そして、この機能変化が適切な時期に生じることが正常な脳内神経回路の構築に必須であることから、幼少期のストレスは GABA スイッチのタイミングを変化させ、中枢神経の正常な生後発達を妨げることが想定される。そこで学位申請者らは、C57BL/6J 雄性マウスを、幼少期ストレスとして生後1～21日に1日3時間の母子分離(MS)を施した群と施さなかった対照(Ctl)群に分け、以下の実験を行った。(1)生後7・14・21・35日の海馬体歯状回(DG)顆粒細胞・CA3錐体細胞・CA1錐体細胞における K^+ - Cl^- 共輸送体2型(KCC2)及び Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ 共輸送体1型(NKCC1)の膜発現量を免疫組織化学的に解析した。(2)生後2・8・11・15日で急性単離したCA3細胞にGABA_A受容体作動薬ムシモールを投与して細胞内 Ca^{2+} 濃度を観察しGABA スイッチの時期を調べた。(3)生後35日のDGで、幼若ニューロンのマーカーであるカルレチニン、成熟ニューロンのマーカーであるカルビンジンの免疫染色を行い、各マーカー陽性の顆粒細胞の割合を求めた。(4)生後35～38日に①オープンフィールド試験・②新奇物質探索試験・③高架十字迷路試験・④攻撃行動試験を実施した。その結果、以下の知見を得た。

- (1)生後7・35日のDGを除き、Ctl群と比較してMS群ではKCC2の膜発現量が有意に低かった。一方、NKCC1の膜発現量は両群間に有意差を認めなかった。
- (2)急性単離CA3細胞におけるムシモール投与に対する Ca^{2+} 反応は、Ctl群で生後11日、MS群で同15日にほぼ消失したことから、母子分離によりGABA スイッチが数日遅れることが示唆された。
- (3)生後35日にて、Ctl群と比較してMS群ではDG顆粒細胞におけるカルレチニン陽性細胞の割合は高く、逆にカルビンジン陽性細胞の割合は低かった。
- (4)Ctl群と比較してMS群では、①オープンフィールド試験で、自発運動量が有意に大きかった。②新奇物質探索試験で、総探索時間が長かったが識別率は低かった。③高架十字迷路試験で、オープンアームへの進入時間が長く回数も大きかった。④攻撃行動試験で、咬む強さと回数が大きかった。

以上より、母子分離ストレスは雄性マウス海馬体細胞のKCC2の膜発現を減少させ、生後発達に伴う細胞内 Cl^- 濃度低下を正常に比して遅らせることで、GABA スイッチを遅延させた。母子分離を終えた後の生後35日の時点でも、CA1及びCA3細胞におけるKCC2の膜発現量はキャッチアップしておらず、免疫組織化学的手法によるニューロンの成熟度の分析結果も成熟遅延傾向を示していることから、海馬体に不可逆的な変化が生じた可能性がある。この変化が、行動解析実験でみられた多動・認知能力低下・注意力欠陥・攻撃性増加に繋がったと考えられる。

難治性の発達障害や精神疾患のヒト患者の前頭前野や海馬においてKCC2の減少が報告されている。本研究の成果は、そういった疾患のKCC2を標的とする新規治療法・予防法開発の基礎となり得るものであり、臨床的意義も高いと考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。