

論文審査の要旨

報告番号	総研第 353 号	学位申請者	塚原 飛央
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位
	副査	宮脇 正一	副査
	副査	西村 正宏	副査
			博士 (歯学)
			齋藤 充
			田松 裕一

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⁻ 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)

精神疾患の発症には、環境要因としてストレスが大きく関わっており、GABA 神経機構がストレス制御に関与すること、海馬が多く精神疾患に関与することが報告されている。しかし、GABA による抑制性作用に必須である、Cl⁻ トランスポーター、K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 (KCC2) と Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 (NKCC1) の海馬での発現がストレスによりどのように影響されるのかは、雌性動物において不明であった。それゆえ、学位申請者らは 8 週齢の C57/BL6J の雌マウスに胃管チューブによるストレスを 1 日 1 回与え、ストレス負荷 21 日後より、マウスの行動変化および GABA 神経機構関連分子を免疫染色により解析した。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

<GABA 神経機構関連分子の組織化学的解析>

- 1) 明視野 DAB 染色により、ストレスは GABA 合成酵素 (GAD67)、GABA_A 受容体 $\alpha 1$ subunits、および NKCC1 発現を海馬 CA3 領域でのみ増加させた。KCC2 発現は CA3 と CA1 領域で減少した。
- 2) Microtubule-associated protein 2 (MAP2) と KCC2、NKCC1 との二重染色の single plane 解析によると、ストレスは、海馬歯状回顆粒細胞の KCC2 の総量には影響を与えなかったが、MAP2 との共局在領域を増加させ、膜への発現量を減少させた。CA3 と CA1 錐体細胞層では、ストレスにより総タンパク量が減少し、MAP2 との共局在量が変化せず、KCC2 膜タンパク量は減少した。一方、ストレスは、CA3 でのみ NKCC1 総タンパク量を増加させたが、MAP2 共局在量の減少があり、NKCC1 膜タンパク量を増加させた。

<反復ストレスによるマウスの行動変化の解析>

- 1) Open Field Test では、ストレスは自発運動量、中心滞在時間および進入回数に影響しなかったが、Rearing 回数を減少させた。
- 2) Novel Object Recognizing Test では、ストレスは総探索時間を増加させ、新奇物質の識別率を減少させた。
- 3) Elevated Plus Maze Test において、ストレスは、Open arm の滞在時間と進入回数を増加させた。
- 4) Sociability Test では、ストレスは、Stranger マウスの匂い嗅ぎ時間、Stranger chamber 滞在時間/ 総探索時間および Stranger chamber 進入回数 / Empty chamber 進入回数を減少させた。
- 5) Forced Swim Test では、ストレスは、無動時間に影響しなかった。

以上の結果より、反復ストレスは雌マウス海馬の KCC2 膜タンパクを減少させ、NKCC1 膜タンパクを増加させた。これらにより、神経細胞の Cl⁻ の電気化学勾配が逆転し、GABA 神経系の機能変化の可能性が示唆された。この機能変化は、海馬機能に影響し、新奇環境での探索の注意力低下にもとづく認知機能障害、さらには、社会性試験の低下につながったことが考えられる。

今まで独立した現象として捉えられていた、ストレスによる GAD67、GABA_A-R $\alpha 1$ の増加が KCC2 と NKCC1 発現バランス変化の代償性作用として説明できる可能性を *in vivo* で初めて報告した点においても学術的貢献度が高い。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。