

P-1-1

アルコール依存マウスの休薬時における認知機能障害 -ガラス玉覆い隠し試験による評価-

○加藤 英明、辻 稔、武田 弘志

国際医療福祉大学薬学部薬理学分野

【目的】アルコール依存症の病態解明や新規治療法の開発には、アルコール依存マウスの行動変化を適切に評価することが重要となる。これまでに我々は、アルコール依存マウスでは休薬時において、情動性の異常あるいは認知機能の低下を示唆する行動変化が生じることを明らかにしている。本研究では、不安様行動の評価法として知られている高架式十字迷路試験およびガラス玉覆い隠し試験を用いて、アルコール休薬時に認められる行動変化のさらなる意味づけを試みた。【方法】本研究は、国際医療福祉大学動物実験規程を遵守して実施した。実験にはICR系雄性マウスを使用した。アルコール依存マウスは、4%エタノール混入液体飼料のみを7日間摂取させることにより作製した。エタノール休薬は、エタノール混入液体試料をエタノール非含有液体試料に置換することで行い、休薬24および48時間後に高架式十字迷路試験およびガラス玉覆い隠し試験を実施した。試験実施後には、胸腺、脾臓および副腎を摘出し重量を測定した。【結果および考察】高架式十字迷路試験では、対象群およびエタノール慢性処置群いずれにおいても、休薬時におけるオープンおよびクローズドアーム滞留時間に有意な差は認められなかった。一方、ガラス玉覆い隠し試験では、エタノール慢性処置群の休薬24時間後において、対象群と比較して試験15および30分後のいずれにおいても、ガラス玉覆い隠し数の有意な減少が認められた。また、休薬48時間後においても同様の結果が認められた。一般にガラス玉隠し行動は、新奇で奇異な異物の認識に基づく防御反応と考えられている。また、我々は以前に実施した新奇物体認識試験において、休薬時のアルコール依存マウスでは、新奇物体を認識する能力が低下していることを示唆する知見を得ている。これらのことを踏まえると、本研究で認められたガラス玉覆い隠し行動の減少は、アルコール休薬時の認知機能の低下を反映するものと考えられる。さらに、エタノール慢性処置群の休薬24時間後においては、対象群と比較して胸腺重量の有意な減少と副腎重量の有意な増加が認められたことから、アルコール休薬に伴う過度のストレス状態が、認知機能低下の一因となっている可能性が示唆される。

悪性腫瘍による不快情動反応の変化

○高橋美有、池田弘子、米持奈央美、清水孝恒、亀井淳三

星薬科大学 薬物治療学教室

悪性腫瘍組織では、サイトカイン等の様々な物質が産生・放出され、これが腫瘍の増殖のみならず血流を介して異所性に働き、がんの転移等を引き起こす一因になることが示唆されている。近年、様々な末梢の因子が脳機能に影響を及ぼすことが報告されていることから、悪性腫瘍由来のサイトカインが中枢機能にも影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究では、不快情動反応に着目し、骨肉腫（AXT）マウスモデルを用いて恐怖記憶に変化が認められるか検討した。また、恐怖記憶の変化に対するサイトカインの関与について明らかにする目的で、脳内サイトカイン量を測定した。さらに、脳内において認められたサイトカイン量の変化が、脳内でのサイトカイン産生の変化によるものかを明らかにするために、脳内におけるサイトカインのmRNA発現量の変化についても検討を加えた。AXT移植マウスを用いて恐怖条件付け試験を行った結果、対照群マウスでは条件付けによるすくみ行動持続率の増加は経日時に低下したのに対し、AXT移植マウスでは条件付けによるすくみ行動持続率の増加は試験期間中低下しなかった。このことから、担がんマウスでは恐怖記憶の消去が障害されていることが示唆された。次に、恐怖記憶に重要な役割を果たすとされる扁桃体、海馬および前頭前皮質における脳内サイトカイン量を測定した。その結果、AXT移植マウスの海馬ではinterleukin (IL) -2、IL-9およびkeratinocyte-derived cytokine (KC) の有意な増加が認められた。そこで、KCに注目し、各脳部位におけるmRNA発現量の変化をRT-PCR法により検討した結果、AXT移植マウスの各脳部位においてKCのmRNA発現量の有意な増加が認められた。この結果より、KCは脳内で産生されている可能性が考えられる。以上の本研究の結果から、担がんマウスでは不快情動反応が亢進していることが明らかになった。また、悪性腫瘍による脳内のサイトカインの増加が精神機能に影響を与えている可能性が示された。

P-1-3



ストレス適応および非適応モデルマウス脳における5-HT_{1A}受容体の細胞内分布の特徴

○新井崇紘、宮岸寛子、廣田賢志、齋藤淳美、宮川和也、辻 稔、武田弘志
国際医療福祉大学 薬学部 薬理学分野

【目的】生体は、外界からのストレス刺激に対して適応する生理機構（ストレス適応機構）を備えているが、過度なストレス刺激によりこの機構が破綻すると様々なストレス性精神疾患の発症リスクが高まると考えられている。これまでに、我々は、ストレス刺激に対して適応し情動行動の低下を示さないストレス適応モデルマウス（適応マウス）、および過度なストレス刺激により適応機構が破綻し、情動行動の低下を示すストレス非適応モデルマウス（非適応マウス）の作成に成功している。また、非適応マウスに5-HT_{1A}受容体完全作動薬であるflesinoxanを慢性投与すると情動行動の低下が回復することから、ストレス適応機構の形成や破綻において5-HT_{1A}受容体が重要な役割を担っている可能性を示唆してきた。一方、5-HT_{1A}受容体は、細胞質から細胞膜へ小胞輸送されることが明らかにされている。そこで、本研究では、適応マウスおよび非適応マウスの海馬と中脳における5-HT_{1A}受容体の細胞内分布の変化について検討した。【方法】ICR系雄性マウスを用い、マウスに1時間あるいは4時間の拘束ストレス刺激を14日間慢性負荷し、適応マウスおよび非適応マウスを作成した。これらマウスの全脳より海馬と中脳を採取し、Subcellular Protein Fractionation Kitを用いて細胞分画を行い、細胞膜画分と細胞質画分に分画した。その後、両画分における5-HT_{1A}受容体の発現量をWestern blot法により定量した。

【結果および考察】適応マウスの海馬では、細胞膜画分において5-HT_{1A}受容体発現量が有意に増加したのに対し、細胞質画分では変化が認められなかった。一方、非適応マウスの海馬では、細胞質画分および細胞膜画分のどちらにおいても、5-HT_{1A}受容体の発現量に変化は認められなかった。また、中脳に関しては、適応マウスでは細胞質画分および細胞膜画分のどちらにおいても5-HT_{1A}受容体の発現量に変化は認められなかったが、非適応マウスでは有意に増加した。以上より、5-HT_{1A}受容体の細胞内分布の変化が、ストレス適応の形成や破綻に関与することが示唆された。

ATP感受性K⁺チャンネルKir6.2欠損マウスにおける急性ストレス応答の特徴

○浅沼 潮¹⁾、齋藤淳美¹⁾、小宮健人¹⁾、宮岸寛子¹⁾、宮川和也¹⁾、辻 稔¹⁾、梅田 啓²⁾、岡田泰昌³⁾、武田弘志¹⁾

¹⁾国際医療福祉大学薬学部薬理学分野、²⁾国際医療福祉大学塩谷病院呼吸器内科、

³⁾独立行政法人国立病院機構村山医療センター内科

ATP感受性K⁺チャンネルの構成サブユニットの一つであるKir6.2は、脳内に広く分布していることが報告されている。我々はこれまでに、Kir6.2遺伝子欠損 (Kir6.2KO) マウスにおいて、自発運動量の低下、一般情動行動の低下、不安様行動の亢進が認められることを確認しており、これらの知見は、Kir6.2が情動調節に重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。そこで本研究では、Kir6.2KOマウスの急性ストレス刺激に対する反応性について、行動学および生化学的に検討した。

実験には、C57BL/6J系雄性・雌性マウスおよびKir6.2KO雄性・雌性マウスを使用した。マウスに急性拘束ストレス刺激を1時間負荷し、直後にhole-board試験に従い情動行動を測定した。その結果、雄性・雌性Kir6.2KOマウスにおいて共に、野生型マウスで認められる急性拘束ストレス刺激負荷による情動行動の低下（穴のぞき回数の減少）が増強することを明らかにした。

また、生体のストレス応答には、視床下部-下垂体-副腎皮質系（HPA系）が重要な役割を担っている。そこで本研究では次に、hole-board試験直後に断頭採血し、遠心分離により得られた血清を用いて、ストレス応答ホルモンであるコルチコステロンの血中濃度をELISA法に従い測定した。その結果、野生型マウスにおいて認められる急性拘束ストレス刺激負荷による血中コルチコステロン濃度の上昇が、雄性・雌性Kir6.2KOマウスで増強すること、また、この反応は雌でより顕著であることを見出した。

以上の結果から、Kir6.2の欠損により、急性ストレス刺激による情動性の低下が増強されること、また、この機構にHPA系の調節機能異常が一部関与している可能性が示唆された。

P-1-5 

Dibutyryl-cAMPによる Neuro2a分化誘導時におけるSNAP25とTyrosine hydroxylase との相互作用についての検討

○高橋 詩織、増子 瑞希、山本 彩佳、大井 ありさ、根本 佳奈、
高木 正史、中谷 善彦、天野 託

国際医療福祉大・薬・薬治

Synaptosomal-Associated Protein25 (snap25) は、神経伝達機構に関与するタンパク質の一つであり、哺乳類の神経終末部位に存在する。このsnap25はVesicle-associated membrane proteinおよびSyntaxinとともにSNARE複合体を形成することで、神経伝達物質を含有するシナプス小胞の開口放出の制御に関与していることが知られている。近年、メタアナリシス解析により、SNAP25のT1065G 対立遺伝子とADHDの間には統計的に有意な関連が見出されており、ADHDの発症に関与している可能性があることが報告されている。そこで本研究では、マウス神経芽細胞種であるNeuro2a細胞を用いて、snap25の発現抑制によるDibutyryl-cAMP分化誘導時への影響について検討した。

Neuro2aを低血清培地条件下でRetinoic acid およびDibutyryl-cAMPにより分化誘導を試みたところ、1mM Dibutyryl-cAMPによりsnap25とTyrosine hydroxylaseの発現が、それぞれ有意に増加した。この時、マウスsnap25のmicroRNA (snap25-miRNA) 配列を挿入したBLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP (Invitrogen) を用いてNeuro2a細胞におけるsnap25のノックダウンを試みたところ、snap25の発現抑制と共にTyrosine hydroxylaseの発現も有意に抑制された。

以上より、Neuro2aにおいてsnap25の発現変化とTyrosine hydroxylaseの発現変化とが相互に関連していることが明らかとなった。このことから、神経細胞の分化とそれに伴う神経細胞のキャラクター化に、snap25の発現変化が関与している可能性が示唆された。

P-1-6 

大脳皮質神経細胞培養系において脱分極刺激により特定のマイクロRNAがエクソソーム中に増加する

田中 智美、高橋 徹、佐々木 幸生

横浜市大院・生命医科学・機能構造科学

【序論】

マイクロRNA (miRNA) は同一細胞内で遺伝子発現制御を行うだけでなく、エクソソームを介して他の細胞の発現調節を行うことが知られている。しかし、中枢神経系におけるエクソソームを介した遺伝子発現制御機構は解明されていない。今回、我々は軸索のmiRNAは神経活動によってエクソソームを介して他の神経細胞に運ばれ、遺伝子発現を制御するのではないかという仮説を立て、エクソソームを介した神経細胞間の情報伝達について検討することを目的として研究を行った。

【方法】

マウス大脳皮質神経初代分散培養系からエクソソーム画分をTotal Exosome Isolation試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出し、その中に含まれるタンパク質をウェスタンブロット法 (WB) で、miRNAをqRT-PCR法で解析した。

【結果・考察】

上記の試薬を用いて沈殿画分を抽出しWBにより解析したところ、エクソソーム特異的タンパク質であるAlixが検出され、エクソソーム画分の抽出を確認した。さらに、qRT-PCR法によるmiRNAの定量的結果、特定のmiRNAが同エクソソーム画分中に有意に多く含まれることが明らかになった。その一つであるmiR-382はKClによる脱分極刺激により、エクソソーム画分中の含有率が5倍上昇することが判明した。miR-382は軸索に多いmiRNAであることから、神経細胞の興奮により、miR-382を含む特定のmiRNAが細胞外に放出され、周辺の細胞の遺伝子発現制御に関わっている可能性が示唆される。miR-382は脆弱X症候群や統合失調症で発現が増減することから、これらの疾患との関連が注目される。