

| | | | |
|---|-----------------------------|----|------------------|
| 所属 (主指導教員) | 塩坂 貞夫 | | |
| 氏名 | 原田 暁子 | 提出 | 平成 20 年 5 月 19 日 |
| 題目 | 急性ストレスにおけるマウス海馬ニューロプシンの発現変化 | | |
| <p>要旨</p> <p>PTSDに見られるように強いストレスを伴う経験は、記憶学習能に影響を与えることが知られている。ラットやマウスにストレスを与えると不安行動が増加し、恐怖条件づけ学習、空間学習といった海馬や扁桃体に依存した学習課題の成果に影響を与えることが報告されている。また、過度のストレスが持続すると、不安や恐怖に重要な領域である扁桃体のシナプスが増加し、記憶に関与する海馬のシナプスが減少するといった形態的な変化も多数報告されている。このようなストレスが誘導する神経可塑性は、ストレスに応答して分泌される副腎皮質ホルモン・グルココルチコイド（ヒト：コルチゾル；齧歯類：コルチコステロン（CORT））が一端を担うことが示唆されている。また近年、記憶の生物学的モデルである長期増強現象（LTP）と類似のシグナル経路が急性ストレス時において惹起されることが報告されているが詳細な作用機序は明らかとなっていない。これまでの研究により NP は成熟マウスの海馬において、LTP を濃度依存的に調節し、作業記憶の獲得過程に関与することが示唆されている。また、神経活動依存的なシナプス形成に重要な役割を担うことが報告されており、ストレスによって誘導される神経可塑的变化にも関与する可能性が考えられる。そこで本研究は、ストレス応答に重要である海馬、扁桃体に局在する神経可塑性関連プロテアーゼ・ニューロプシン（NP）に注目し、ストレスが誘導する神経可塑性の作用機構について検討した。</p> <p>マウスに急性ストレスを与え、NP mRNA の発現を semi quantitative RT-PCR により解析し <i>in situ hybridization</i> により観察した。さらに急性ストレス負荷後に海馬依存的な恐怖条件づけを行い、NP 欠損マウスと NP 野生型マウスの行動変化を比較検討した。その結果、1) マウスに 1 時間の拘束及び尾部への電気ショックを組み合わせた急性ストレスを与えるとストレス負荷終了直後に海馬における NP mRNA の発現が有意に増加した。また、この発現増加はストレス負荷から 6 時間後にはコントロールに比べて約 2.7 倍増加し、24 時間後においても 2.5 倍の高い発現を維持していた。さらに 2) 身体的要因の比較的低いストレスとしてマウスに 1 時間の拘束のみのストレスを与え、NP mRNA の発現について検討したところ、</p> | | | |

1) のストレス負荷と同様に海馬における NP mRNA の発現が有意に増加したことから、海馬における NP mRNA の発現はストレスに応答して発現変化することが示唆された。

また、*in vitro* 及び *in vivo* においてストレスレベルの濃度で CORT を投与すると海馬における NP mRNA の発現は急性ストレス負荷時と同等に有意に増加した。一方、ストレス負荷後の海馬 NP mRNA の発現は CORT 受容体 (MR、GR) 阻害薬による抑制が認められず、CORT 受容体を直接介さない間接的な経路によって調節されることが推察された。

さらに、NP 欠損マウスを用いてストレス負荷後に誘導される行動変化に NP が関与するかを検討した。事前に急性ストレスを与えると、ストレス負荷後の記憶学習や不安行動に影響を与えることが知られており、この種の恐怖条件づけ課題はストレスが誘導する記憶障害の研究によく用いられている。そこで、急性ストレス (拘束 1 時間) を与えた後に恐怖条件づけを行い NP 野生型マウスと NP 欠損マウスにおけるストレスによる影響を比較検討した。マウスを箱に入れ嫌悪刺激として床への通電による foot shock を与え箱との連合学習を行う。再度、同一の箱へマウスを戻し、NP 野生型マウスと NP 欠損マウスにおけるすくみ行動 (Freezing (%)) を不安の指標として測定した。

1) まず NP mRNA が有意に増加している急性ストレス負荷 24 時間後に嫌悪刺激 (foot shock: 2 mA, 1 sec, 3 回) を与え、24 時間後に Freezing (%) を測定したところ、NP 欠損マウスにおいてのみストレスによる影響が顕著に現れ、ストレスを与えた群では不安行動が著しく減少し記憶障害が見られた。

2) 一方、NP mRNA の発現が比較的低いと考えられる急性ストレス 2 時間後に嫌悪刺激 (foot shock: 2 mA, 2 sec, 3 回) を与え、24 時間後に Freezing (%) を測定したところ、NP 野生型、NP 欠損型マウス共に不安行動が著しく減少し、ストレスによる記憶障害が誘導されることが明らかとなった。

以上の結果から NP はストレス負荷による記憶障害からの回復過程に関与する可能性が示唆された。

博士論文番号：0481031

急性ストレスにおける
マウス海馬ニューロプシンの発現変化

原田 暁子
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座
(塩坂 貞夫 教授)

平成20年4月19日提出

序論

1995年に阪神大震災や地下鉄サリン事件が起こった後、被災者に対する心のケア活動が注目され、報道の中でも心的外傷後ストレス障害（Post-traumatic stress disorder: PTSD）という言葉がよく聞かれるようになった。生命に関わるような出来事や配偶者が目の前で亡くなる事故を目撃してしまうなど、心理的に強い衝撃を受けると、事件前後の記憶の想起の回避・忘却、幸福感の喪失、感情の鈍磨や無力感、集中力の低下などが現れる症状を PTSD とよぶ。こうした症状は心理的に過度のストレスがかかった場合に引き起こされ、古くはベトナム戦争の従軍兵が精神的不調を訴え不眠やアルコールの暴飲に走るなどの行動が見られたことが知られている。少なくとも2つのMRI研究によって、戦闘に関する PTSD をもつ退役軍人の海馬に損傷があるという証拠が明らかにされた (Bremner et al., 1995; Gurvits et al., 1996)。Gurvits らによる研究では、海馬の大きさが20%以上も減少し、その減少は退役軍人の戦闘経験期間の長さに比例していた。こうした先行研究は過度の心理的ストレスは海馬に損傷を及ぼすという結果を示してきた。また、ストレス研究の先駆者 Hans Selye は、心理的ストレスが与えられた時に上昇するステロイドホルモン・グルココルチコイドがストレスによる有害な影響を引き起こすことを提唱した (Selye, 1976)。現在も盛んに行われている膠原病やアレルギー性疾患に対するステロイド療法は副作用として極度の集中力の散漫化、不安、不眠症、うつ病、認知障害などが見られることが知られており (Lewis and Smith, 1983)、グルココルチコイドがこうした症状を誘発させると考えられている。

近年、齧歯類を用いた実験により心理学的ストレスは、海馬に依存した記憶学習能や情動行動に影響を与えるだけでなく、海馬の樹状突起の委縮、さらにシナプス密度が減少するなど構造形態的に影響を及ぼすことが明らかになり (Kim and Diamond, 2002; Lisman, 1999; McEwen, 1994; Watanabe et al., 1992b)、PTSD や大うつ病患者で見られる海馬における機能的・形態的变化は、認識障害等を引き起こす原因であると推察されている (Bremner et al., 1995; Gurvits et al., 1996; McEwen, 2000; McEwen, 2001)。実際にラットやマウスにストレスを与えると記憶の生物学的モデル・長期増強現象 (long-term potentiation: LTP) が海馬において顕著に変化し、情動性や不安行動が変化し、空間学習、作業記憶、恐怖条件づけへの影響が顕著に表れる (Bellani et al., 2006; Joels et al., 2006; Korz and Frey, 2003; Rau et al., 2005)。また、記憶学習、不安や情動に重要な領域で

ある、海馬 CA3 領域の樹状突起が萎縮し、扁桃体 (BLA : 基底外側核) の樹状突起が伸長することが知られている。さらにそれに伴いシナプスの密度や構造も変化することが報告されている (Vyas et al., 2002; Watanabe et al., 1992b; Woolley et al., 1990)。

こうしたストレスによって誘導される神経可塑的变化はストレス応答の神経内分泌機構の破綻が一因であることが示唆されており、重要な経路として視床下部-下垂体-副腎皮質経路 (HPA-系) が挙げられる。ストレスが負荷されると HPA 系が働き、副腎皮質よりステロイドホルモン・グルココルチコイド (ヒト : cortison, 齧歯類 : corticosterone(CORT)) が分泌される。本来、分泌された CORT は HPA 系上流に作用しフィードバック機構によって正常レベルに保たれているが、ストレスが対処できないレベルに達するとその均衡が崩れ CORT の過剰状態により海馬における機能的・形態的变化が惹起されることが多数の研究報告から示唆されている (de Kloet et al., 2005; Yehuda et al., 1991; Yehuda et al., 1994)。また、海馬は記憶学習に関連する領域であると共に、CORT 受容体 (ミネラルコルチコイド受容体: MR, グルココルチコイド受容体: GR) を豊富に発現し、ストレス応答の神経内分泌機構の恒常性維持にも重要な役割を担うことが報告されている (Herman et al., 1989; Jacobson and Sapolsky, 1991; Joels, 2006; McEwen et al., 1987; Sapolsky et al., 1991)。ストレスレベルの CORT を作用させると海馬におけるシナプス伝達効率やシナプス構造、海馬に関連した学習行動が変化し (Takahashi et al., 2002; Watanabe et al., 1992a; Woolley et al., 1990)、CORT 受容体を阻害すると、こうした可塑的变化を抑制できることからストレスが誘導する神経可塑的变化に CORT が密接に関与することが示唆されている (de Quervain et al., 1998; Pavlides et al., 1995; Yang et al., 2004)。また、ストレス負荷後に神経可塑性の生物学的モデルである長期増強現象 (LTP) が海馬において抑制され、本来成熟マウスでは誘導されにくいとされる別の可塑性モデルである長期抑制現象 (long-term depression: LTD) が誘導されることや (Xu et al., 1997; Yang et al., 2004)、マウスが自由に行動できる状態で海馬の電気記録を行うと、ストレス負荷直後の LTP 誘導刺激によって LTP レベルが増強される (Ahmed et al., 2006) といった現象が報告され、こうした現象はストレスが誘導する神経可塑性において、LTP に必要なシグナル経路や分子が関与するためであると考えられている。ストレスによって増加した CORT が核内受容体に結合し標的遺伝子の転写を調節することや、膜を透過しない BSA-conjugated CORT を用いた実験により膜受容体を介したシグナル経路が存在することが報告されているが (Funder, 1992; Joels, 2006; Miner and Yamamoto, 1991; Revest et al., 2005; Tronche et al., 1998)、ストレスが誘導する神経可塑的变化に重要な役割を担う標的分子が

何であるのかといった詳細な作用機序は明らかとなっていない (図 1) (de Kloet et al., 2005; Sandi, 2004)。

一方で 2003 年に Pawlak らのマウスを用いた研究により、急性ストレス負荷後に組織型プラスミノゲンアクチベータ (tPA) の発現及びプロテアーゼ活性が扁桃体 (CeA: 扁桃体中心核) で増加することが示された。また、tPA を欠損したマウスではストレス後の不安様行動を示さないことから、tPA は不安様行動を促進することが示唆された。(Pawlak et al., 2003)。tPA は後期 LTP に重要な役割を担う細胞外プロテアーゼとして知られており (Frey et al., 1996; Huang et al., 1996)、記憶学習においても関与することが示されている (Huang et al., 1996)。これまで、記憶学習などの神経可塑的变化に伴うシナプス結合の再構築が、細胞外プロテアーゼによる細胞外マトリックスタンパクや神経接着分子の切断によって生じることが推察されており、Pawlak らによる研究はストレスが誘導する神経可塑的变化においてもプロテアーゼが重要な役割を示す可能性を提起した (Bennur et al., 2007; Pawlak et al., 2003; Pawlak et al., 2005)。

当研究室においてマウス海馬より見出されたカリクレイン (KLK) ファミリーに属するセリンプロテアーゼ・ニューロプシン (NP) (Chen et al., 1995) は神経可塑性関連分子であることが示唆されている。これまでの研究により NP は成熟マウスの海馬や扁桃体 (BLA: 基底外側核) をはじめとした大脳辺縁系に豊富に発現することが明らかとなっている (Chen et al., 1995; Suzuki et al., 1995)。また NP は前駆型として細胞外に分泌された後に N 末端の 4 残基が切断され、活性型 NP としてプロテアーゼ活性を示すことが明らかとなっている (Shimizu et al., 1998)。神経活動が活発になるような刺激として海馬のシャープファー側枝に LTP 誘導刺激を与えると海馬における NP の活性が迅速かつ一過的に上昇すること (Matsumoto-Miyai et al., 2003)、てんかんモデルマウスでは扁桃体における NP mRNA の発現が増加することから (Okabe et al., 1996) 神経活動依存的に NP の発現や活性化が変化することが示唆されている。また、リコンビナント活性型 NP を海馬スライスに添加すると早期 LTP を濃度依存的に調節することや (Komai et al., 2000)、早期 LTP 誘導刺激を与える前に NP を阻害すると早期 LTP が抑制される (Ishikawa et al., 2008) ことから NP は早期 LTP を調節するプロテアーゼであると考えられている。NP プロテアーゼの基質として神経接着分子 L1 を切断することが報告され (Matsumoto-Miyai et al., 2003)、基質の候補である L1 を発現しているシナプスに着目した電子顕微鏡観察により、NP 欠損マウス (NP^{-/-}) は野生型 (NP^{+/+}) に比べて L1 陽性の未成熟なシナプス数が増加することが明らかとなり (Nakamura et al., 2006)、NP は神経活動依存的なシナプス形成に重要な役割を担う可能性が示唆されている。さらに、NP^{-/-}

マウスを用いた行動実験により、NP は海馬依存的な記憶学習に重要であること (Tamura et al., 2006)、不安や恐怖に対する感受性が増し、社会行動の低下を示すことが明らかとなっている (Horii et al., 2008; in press., 堀井博士論文)。

また、ヒト KLK ファミリーの癌に関する研究は盛んに行われており、前立腺癌の検査に用いられることで知られている PSA (KLK3) をはじめ、KLK ファミリーに属するヒト KLK プロテアーゼはステロイドホルモンによって発現が上昇することが報告されている。ヒト NP (KLK8) は乳癌または前立腺癌細胞株 (BT-474, MCF-7, PC-3(AR)₆) を用いた研究からエストラジオール、アルドステロン、合成ステロイド・デキサメサゾン等のステロイドホルモンによって発現が増加することが報告されている (Kishi et al., 2003; Yousef and Diamandis, 2002)。以上のことから、ストレスが誘導する神経可塑的变化に NP が関与するのではないかと推測した。そこで本研究はマウスに急性ストレスを与え、NP mRNA の発現を Semi-quantitative RT-PCR 及び *in situ* hybridization により観察した。さらに急性ストレス負荷後に海馬依存的な恐怖条件づけを行い、NP -/- と NP +/+ の行動を比較検討し NP と不安・情動性との関連を検討した。

材料と方法

1. 実験動物

C57BL/6J 雄性マウス (8-9 週齢, 日本 SLC) と NP 野生型マウス (NP +/) とノックアウト (NP -/) 雄性マウス (8-14 週齢) を用いた (Hirata et al., 2001)。NP -/マウスは、C57BL/6J と 12 回戻し交配を行った。マウスは 5 匹のグループを 1 ケージで 12 時間の明暗サイクル、自由給餌で飼育した。以下に記した全ての動物実験は、奈良先端科学技術大学院大学および日本生理学会の動物実験ガイドラインに従った。

2. ストレス負荷

2-1. 急性ストレス

使用するマウスは実験環境に少なくとも 1 週間慣らし、実験は日内周期の明期に行った。空気孔の開いたプラスチック拘束器にてマウスを 1 時間拘束した。電気刺激を組み合わせたストレスは 1 時間の拘束時に尾部へ 1 mA、1 秒間の電気刺激を 60 秒間隔で 60 発与えた。ストレス負荷終了から 0, 6, 24 時間後にエーテルによる深麻酔下で断頭し、海馬と血液サンプルを採取した。コントロール群はホームケージにて飼育したマウスを用いた。

2-2. その他のストレス及び長期ストレス

使用するマウスは実験環境に少なくとも 1 週間慣らし、実験は日内周期の明期に行った。コントロール群は、長期ストレス実験の実験操作がストレスにならないよう、2 週間ハンドリングを行った。空気孔の開いたプラスチック拘束器にてマウスを拘束した。ストレス負荷群は 30 分間拘束、6 時間拘束、6 時間/日×21 日拘束を行った後、海馬サンプルを採取した。

3. Semi-quantitative RT-PCR

3-1. RNA 抽出

海馬より、TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて total RNA を抽出、精製した。抽出した total RNA の濃度及び純度は、DU 640 Spectrophotometer (BECKMAN) により測定し、純度の高いサンプルのみを以下の実験に用いた。

3-2. cDNA 合成

逆転写反応は、反応液20 μ L中にtotal RNA 500 ngを加え、以下の方法により行なった。反応液10 μ L中、total RNA 500 ng、ランダムプライマー 1 μ L (終濃度400 mM) (TAKARA,Cat.3801) を加え70°C、10分間加熱しRNAを変性させた。これを氷上で10分間インキュベートした後に、2.5 mM dNTP Mixture 4 μ L (終濃度0.5 μ M)、rRNasin (Promega ,Cat.N2111) 40 U M-MLV 5 \times Raction Buffer (Promega ,Cat.M1701) 4 μ Lを加え、室温で5分間静置した。次に M-MLV Reverse Transcriptase (Promega ,Cat.M1701) を200 U加え、37°C、60分間反応させた後に、95°C、3分間の熱処理によりM-MLV Reverse Transcriptase の酵素活性を失活させた。

3-3. Semi-quantative PCR

引き続き行なったPCRは逆転写産物1/20倍量を鋳型とし、NPのプライマー (forward: 5'-GAG AGT GTA TAC CCC ACT C-3' ; reverse: 5'-ACA GAC CAT GCC CTC GGT GA-3') 及び、内在性標準遺伝子として β -actin (forward: 5'-CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA-3' ; reverse: 5'-TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-3') のプライマーを用いた。これらプライマーはイントロンを挟んでデザインされており、増幅されたPCR産物の長さからゲノムDNAの混入をチェックした。mRNAは、NP: 486 bp、 β -actin: 243 bpとして増幅される。PCR反応液20 μ L中の組成、及び反応条件を以下に示す。

反応液組成;逆転写産物 1 μ L、0.5 μ M プライマー、0.2 mM dNTP Mixture、ExTaq (TaKaRa,Cat.RR001A) 0.1 U、10 \times ExTaq Buffer 2 μ L、滅菌蒸留水。

反応条件 ; 94°C 30 秒、[94°C 30 秒、58°C 30 秒、72°C 1 分]、72°C 2 分。

DNA thermal cycler を用いて Cool-Hot Start 法により行った。 サイクル数は、PCR 生成物量がプラトーに達していないリニアレンジ (NP: 35 cycle、 β -actin: 20 cycle) で検討した (図 2, A,B)。 ポジティブコントロールとして full length NP (PcDNA 3.1(+)) を用い、NP 由来の PCR 生成物であることを確認した。 ネガティブコントロールとして Reverse transcription (RT)を行わないサンプル、及び水を用いて試行した。 反応物を 5% アクリルアミドゲルにて電気泳動した後にエチジウムブロマイド染色を行い、Scion Image (Scion, <http://www.scioncorp.com>) を用いてバンドのシグナル強度を測定した。

4. *in situ* hybridization 法

切片を以下の方法で処理し、*in situ* hybridization 法には ^{35}S で標識した cRNA プローブを用い、過去の報告に従って行った(Chen et al., 1995; Horinouchi et al., 2005)。

4-1. cRNA プローブの作成

RNA プローブには NP cDNA の 691-1130 番目に相当する B41 フラグメントを含む pBluescript KS (+) Vector よりアンチセンスプローブ、及びセンスプローブを作成した。 アンチセンスプローブ作製のために EcoR I (TaKaRa) を、センスプローブ作製のために EcoO109 I (TaKaRa) を使用した。 得られた linearized template DNA を ^{35}S -UTP (NEN) を用いて *in vitro* transcription によりアイソトープラベルを行った。 アンチセンスプローブ作製のために T3 RNA polymerase (TaKaRa) を、センスプローブ作製のために T7 RNA polymerase (TaKaRa) を用いた。

4-2. 組織切片の作成

エーテルによる深麻酔下で断頭後、脳を取り出し、ドライアイス中で凍結した。 クリオスタットを用いて 16 μm の切片を作製し、MAS コートスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) 上に乗せた。 これらのスライドガラスは保存箱に入れビニールテープで密閉し、使用するまでは -80°C で保存した。 使用する際は、出した箱をドライヤーで乾かし、室温に戻してから開けた。(標本に水滴がつき反応中にはがれ易くなるのを防ぐためである。) 切片を 4% ホルムアルデヒド・0.1 M リン酸バッファー (PB: pH 7.4) に 20 分間

浸して固定した後に、0.1 M PB に 10 分間浸し、更に新しい 0.1 M PB に 10 分間浸して固定液を洗い去った。

4-3. プレハイブリダイゼーション

固定した組織切片において、タンパク質を分解し脂肪を除くことにより、組織中の mRNA を露出させ、プローブとハイブリダイズしやすい状態にすることを目的として行う。試薬作成に使用した蒸留水は DEPC 処理を行ったものを使用した。反応は室温で染色瓶中にて行った。

切片をスライド立て(ラック)に入れ、Proteinase K 処理 (10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ proteinase K, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA) 5 分間を行った。Proteinase K 処理は RNase の失活と細胞膜を破壊してプローブの透過性を促進するために行った。Proteinase K 活性を停止するため、4-2.で使用した 4% ホルムアルデヒド・0.1 M PB (pH 7.4) に 5 分間浸し、0.1 M PB に 10 分間浸し、更に新しい 0.1 M PB に 10 分間浸して固定液を洗い去った。次にラックを 0.225% $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O} \cdot 0.1 \text{ M}$ Triethanolamine に 5 分間浸した後に、0.1 M PB に 5 分間浸して液を洗い去った。この作業は、プローブの組織への非特異的な吸着によるバックグラウンドを低下させるため、無水酢酸によりタンパク質のアミノ酸残基をアセチル化し、タンパク質の等電点を酸性側にシフトさせることにより、非特異的な吸着を抑制した。その後、エタノール脱水系列を通して脱水し、クロロフォルムに 10 分間浸し脱脂を行い、100% エタノールに 3 分間浸したラックを 30 分程度乾燥させた。

4-4. ハイブリダイゼーションと可視化

スライド 1 枚あたり ^{35}S -labeled cRNA プローブが 2×10^6 cpm / 200 μL Hybridization buffer (H-buffer) になるようにプローブを加え、80°C 3 分間で変性させたものを使用した。スライドガラス 1 枚に対して 220-230 μL のプローブ溶液をかけ、カバーガラスをかぶせたものを湿箱に入れ、55°C のインキュベータ内で 16 時間インキュベートした。H-buffer の組成は以下に示す。

50% formamide, 10% dextran sulfate, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 10% sarcosyl, 1 \times Denhardt's, 2 mM DTT, 0.5 mg / mL yeast tRNA, 0.2 mg / mL salmon sperm DNA.

湿箱よりスライドガラスを取り出しカバーガラスを外した後に、下記の条件で洗浄、RNase 処理を行った。

5×SSC, 5 mM DTT、65°C、30 分間

50% formamide, 2×SSC, 5 mM DTT、65°C、30 分間

RNase Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl)、

37°C、5 分×3 回

2 μg / mL RNaseA in RNase Buffer、37°C、30 分間

50% formamide, 2×SSC, 5 mM DTT、65°C、30 分間

2×SSC、室温、5 分間

0.1×SSC、室温、5 分間

エタノール脱水系列を通した後にドライヤーにて風乾し、NTB-2 乳剤 (Kodak) を塗布した。4°Cで2週間露光した後に現像し暗視野照明下で観察した。

5. 血漿中コルチコステロン濃度測定

ストレス実験に用いたマウスを断頭後、血液を採取した。その後血漿サンプルを EIA-based kit (Active Rat Corticosterone EIA, Diagnostics) により測定した。

6. マウス海馬神経細胞の初代培養

6-1. マウス海馬の単離

生後3日目の C57BL/6 マウスをエーテル麻酔下で70%エタノール入りガラスシャーレに移し、クリーンベンチに運んだ。クリーンベンチ内で Ca^{2+} , Mg^{2+} -free phosphate-buffered saline (CMF-PBS) の入ったガラスシャーレに移した。滅菌濾紙上に胎仔マウスを乗せ、ハサミとピンセットを用いて脳全体を取り出し、D-MEM (Invitrogen, Cat.1330-032) の入ったガラスシャーレに移し、実体顕微鏡下でメスを用いて脳幹と、海馬を含む大脳皮質に分離した。

大脳皮質に付着している脳膜を剥がした後に海馬を切り出し、新鮮な D-MEM の入ったガラスシャーレに移し、脳膜や血管を取り除いた。

6-2. 海馬神経細胞の初代培養

取り出した海馬を、ガラスシャーレ上で細断した後、パストゥールピペットで新鮮な D-MEM の入ったプラスチック遠心管へ移し、4300×g、3 分間の遠心分離を行い、海馬を沈殿させた。上清を除去した後に、papain 45 U（フナコシ, Cat.45-1031-19）、0.2 mg / mL DL-Cysteine HCl、0.2 mg / mL 牛血清アルブミン、1 mg / mL D-glucose、0.01 % DNase1（Sigma）に 0.22 μm 滅菌フィルターを通してろ過滅菌した CMS-PBS 5 mL を加えた。これを 37°C で攪拌しながら 30 分間反応させた後、10% Horse Serum（Invitrogene, Cat.26050-070）-D-MEM を 3 mL 加え反応を停止させ、4300×g、3 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。上清を除去した後、Neurobasal / B27（Invitrogene）を 5 mL 加え、1 mL 用チップを付けたピペットで 15 回ピペッティングを行い、セルストレイナー（BD falcone, Cat.352340）を用いて細胞を分散させた。4300×g、3 分間の遠心分離を行った後に上清を除去し、新鮮な Neurobasal / B27 を 5 mL 加え、合計 5 mL の細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液の一部をトリパンブルー染色し、生細胞のみを血球計算板で数え細胞密度を算出した。あらかじめ、0.2 % ポリエチレンイミンによりコートしたプレートに、 2.5×10^5 cells / cm^2 になるように細胞懸濁液を加え 37°C、5% CO₂ 条件下で培養を開始した。

6-3. 薬物刺激

海馬神経細胞培養 7 日目にコルチコステロン（CORT, Sigma）0.1, 1, 3.2, 5, 10, 32, 100 nM（終濃度）を培養液中へ添加し 24 時間後に RNA を抽出した。この時、溶媒の Ethanol の終濃度は 0.01% になるように添加し、コントロールは 0.01% Ethanol を含む Neurobasal / B27 で同時間培養した。

7. total NP 及び active NP の測定

7-1. 海馬可溶性画分の調整

マウスの海馬を摘出し、Lysis Buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100) および 1 µg/mL Leupeptin (SIGMA, Cat.L-288L) を加えホモジナイザーにより破碎した。4°C、12000×g、30 分間遠心し、上清を回収した。BCA Protein Assay Reagent (PIERCE) によりタンパク質濃度を定量した (手順は同キットユーザーマニュアルに従った)。

7-2. 免疫沈降法

1 mg total protein / mL に調整したサンプル 300 µL に Rat anti- NP モノクローナル抗体 (mAbF12 : MBL) を 100 ng 加え、4°C で穏やかに回転させながら 12 時間反応させた。さらに、50% Protein G Sepharose (Amersham Biotech, Cat.17-0618-01) 懸濁液を 10 µL 加え、4°C で穏やかに回転させながら、4 時間反応させた後、4°C、1000×g、5 分の遠心を行い、得られた Sepharose beads を Lysis Buffer で洗浄した。(以下の活性化を行うものは 3 回、行わないものは 6 回洗浄した。)

7-3. 前駆型 NP の活性化

免疫沈降物にリジルエンドエペプチダーゼ溶液 20 µL (アクロモバクタープロテアーゼ I : 和光純薬, Cat.129-02541) (5 µg / mL リジルエンドペプチダーゼ, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) を加え、37°C、5 分間反応させ前駆型 NP の活性化を行い、Lysis Buffer で 3 回洗浄した。活性型 NP のみを測定する際にはこの操作を省略した。

7-4. NP 酵素活性測定法

活性型 NP は、組織カリクレインの合成基質である Pro-Phe-Arg-MCA に対して酵素活性を示す (Shimizu, C., et al., 1998)。これを基質に用いて酵素活性測定を行った。Rat anti- NP モノクローナル抗体により免疫沈降を行った免疫沈降物、及びリジルエンドペプチダーゼ処理をした免疫沈降物に基質溶液 (0.5 mM Boc-Pro-Phe-Arg-MCA (PEPTIDE INSTITUTE. INC, Cat.3096-v) , 50

mM Tris-HCl pH 8.0) を 50 μ L 加え、37°C、18 時間反応させた。反応後、450 μ L の反応停止液(100 mM Sodium acetate, 100 mM monochloroacetic acid, pH 4.3) を加え、蛍光強度を F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (日立製作所) で測定した (励起波長 370 nm, 測定波長 460 nm)。

8. 副腎摘出とコルチコステロン投与

マウスを麻酔し (ketamine: 32.5 mg / kg B.W. and xylazine: 8.2 mg / kg B.W.) 両側の副腎を背側より摘出した。摘出後の傷は縫合し 1 週間ホームケージで回復させた。回復期間中は 0.9% NaCl を水の代わりに与えた。手術からの回復後、ストレスレベルの CORT を皮下投与した (10 mg / kg B.W.) (Hansson et al., 2000)。コントロール群は溶媒に使用した propylene glycol を同用量投与した。投与から 1 時間後に断頭し海馬サンプルを採取した。

9. MR、GR 阻害剤の投与

9-1. 皮下投与

RU38486 (mifepristone: GR antagonist, Sigma) 及び RU28318 (MR antagonist, Sigma) を皮下投与量が 3 mL / kg B.W.になるよう調整し propylene glycol に溶解した。RU38486 は 7.5 mg / kg B.W. RU28318 は 50 mg / kg B.W にて皮下投与し、コントロール群には溶媒を同量投与した (Kim et al., 1998; Pavlides et al., 1995)。投与 1 時間後にストレス (1 時間拘束+尾部への電気刺激) を与え、ストレスセッション終了後に海馬、及び血液サンプルを採取した。

9-2. 側脳室投与

マウスの右側脳室にカニューレーション手術を行い、手術から 1 週間回復させた後に RU28318: 100 ng / μ L を 1 μ L / min の速度で側脳室に投与した。溶媒には人工脳脊髄液 (ACSF: NaCl 135 mM, KCl 5.4 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 5 mM. pH 7.4) を用いた。投与から 5 分後にストレス (1 時間拘束+尾部への電気刺激) を与え、ストレスセッション終了 5 分後に海馬及び、血液サンプルを採取した。コントロール群には ACSF を同量投与

したものを用い、手術による影響を確かめるため、偽手術群のサンプルも採取した。

10. 行動実験

行動実験に使用するマウスは少なくとも1週間は実験環境に慣れさせ、明期に全ての実験を行った。

10-1. 予備実験 (Cordero et al., 2003)

急性ストレス（1時間拘束）を負荷し2時間、または3時間後にマウスを装置に入れ（無条件刺激）、嫌悪刺激として床への通電による foot shock: 0.7 mA, 2 sec を1回与え、24時間後に同様の刺激環境下（嫌悪刺激を与えた装置）に再暴露し、その際に生じるすくみ行動 (freezing) を不安の指標とした。再暴露時は foot shock は与えず、freezing の発現率 (%) を Image FZ software (O'Hara & Co., Tokyo, Japan) を用いて解析した。マウスの行動画像データ取得は1秒毎に1フレーム行われ、それぞれのフレームについてマウスの動いた面積を測定した。

10-2. NP +/+ と NP -/- マウスの比較：

ストレス負荷から24時間後の恐怖条件づけ1

NP +/+及びNP -/-雄性マウス（8-14週齢）に急性ストレス（1時間拘束）を負荷し、ホームケージに24時間戻した後に恐怖条件づけを与えた。マウスを装置に入れ（無条件刺激）、嫌悪刺激として foot shock: 0.4 mA, 1 sec を3回与え、24時間後に同様の刺激環境下（嫌悪刺激を与えた装置）に再暴露し、その際生じるすくみ行動 (freezing) を不安の指標とした。再暴露時は foot shock は与えず、freezing の発現率 (%) を Image FZ software (O'Hara & Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した。マウスの行動画像データ取得は1秒毎に1フレーム行われ、それぞれのフレームについてマウスの動いた面積を測定した。

10-3. NP +/+ と NP -/- マウスの比較 :

ストレス負荷から 2 時間後の恐怖条件づけ 2

NP +/+及び NP -/-雄性マウス (8-14 週齢) に急性ストレス (1 時間拘束) を負荷し、ホームケージに 2 時間戻した後に恐怖条件づけを与えた。マウスを装置に入れ (無条件刺激)、嫌悪刺激として foot shock: 0.4 mA, 2 sec を 3 回与え、24 時間後に同様の刺激環境下 (嫌悪刺激を与えた装置) に再暴露し、その際生じるすくみ行動 (freezing) を不安の指標とした。再暴露時は foot shock は与えず、freezing の発現率 (%) を Image FZ software (O'Hara & Co., Tokyo, Japan)を用いて測定した。マウスの行動画像データ取得は 1 秒毎に 1 フレーム行われ、それぞれのフレームについてマウスの動いた面積を測定した。

11. データ解析

全てのデータは解析ソフト R (<http://www.r-project.org/>) を用いて解析した。データは *t*-test を用いて比較した。図表データは平均値 \pm SEM として表示した。有意水準は $P < 0.05$ とし、図表には †: $P < 0.1$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ と表記した。

結果

海馬における NP mRNA の発現は急性ストレスによって増加する。

ストレスによって誘導される神経可塑的变化に NP が関与するかを検討するため、マウスに急性ストレスを与え海馬における NP mRNA の発現変化を測定した。マウスに1時間の拘束及び尾部への電気刺激 (1 mA for 1 sec; 60 sec apart) を与え、RT-PCR により検討したところ、ストレスセッション終了直後から海馬における NP mRNA がコントロール群に比べて有意に増加した (con: 0.31 ± 0.040 , n = 11; 0 h: 0.64 ± 0.058 , n = 7, $P < 0.001$, vs. con)。ストレスセッション終了から6時間後ではコントロール群に比べて2.7倍増加し (con: 0.31 ± 0.040 , n = 11; 6 h: 0.83 ± 0.057 , n = 7, $P < 0.001$, vs. con)、24時間後においても2.5倍の増加を持続していた (con: 0.31 ± 0.040 , n = 11; 24 h: 0.77 ± 0.076 , n = 4, $P = 0.0043$, vs. con) (図 3. A)。また、著しい増加が見られたストレスセッション終了6時間後の海馬 NP mRNA の発現変化を *in situ hybridization* 法により観察したところ、海馬 CA1 領域及び CA3 領域における NP mRNA の発現が増加していた (図 3. A-a, b)。さらに、以上の結果が痛みなどの侵襲によるものでないことを確認するため、身体的要因が比較的低いストレスとして1時間の拘束のみのストレスを与え、海馬における NP mRNA の発現変化を検討した。その結果ストレスセッション終了後から徐々に増加し (con: 0.079 ± 0.048 , n = 4; 0 h: 0.22 ± 0.071 , n = 4)、6時間後には有意な増加が見られ (con: 0.079 ± 0.048 , n = 4; 6 h: 0.34 ± 0.071 , n = 4, $P = 0.027$, vs. con)、24時間後においても NP mRNA の発現増加は持続していた (con: 0.079 ± 0.048 , n = 4; 24 h: 0.33 ± 0.064 , n = 4, $P = 0.021$, vs. con) (図 3. B)。以上の結果から海馬における NP mRNA の発現増加は痛みなどの侵襲によるものではなく、急性ストレス：生理心理学的ストレスに応答して増加することが示唆された。

次に、それぞれのストレスにおける血漿中 CORT 濃度を測定し、ストレスレベルを検討した。1時間の拘束及び尾部への電気刺激を与えたマウスでは、ストレスセッション終了直後に劇的な増加が見られ (con: 85 ± 36 , n = 5; 0 h: 395 ± 87 ng / mL, n = 6, $P = 0.017$, vs. con)、24時間後にはコントロールレベルと同程度に回復した (24 h: 40 ± 13 , n = 4) (図 4. A)。また、1時間の拘束のみのストレスを与えたマウスでも同様にストレスセッション終了直後に劇的な増加が見られ (con: 35 ± 3.0 , n = 4; 0 h: 244 ± 17 ng / mL, n = 4, $P < 0.001$, vs. con)、24時間後にはコントロールレベルと同程度に下がっていた (24 h: 72 ± 6.4 , n = 4) (図 4. B)。ストレスセッション終了直後に見られた血漿中 CORT 濃度の増加は、尾

部への電気刺激を伴うストレスに比べて拘束のみのストレスにおいて低い値が得られた（拘束のみのストレス: 244 ± 16 ng/mL; 尾部への電気刺激を伴うストレス: 395 ± 87 ng/mL）ことから、CORT レベルはストレスレベルを反映していると考えられた。さらに、ストレス負荷後に見られた NP mRNA の発現増加は血漿中 CORT 濃度と相関する傾向が見られたことから、海馬における NP mRNA の発現はストレスセッション後の血漿中 CORT 濃度に依存する可能性が示唆された。

さらに、ストレス（1時間の拘束及び尾部への電気刺激）によって誘導される海馬 NP mRNA の発現増加が NP タンパク質量の増加または活性化を示しているかを検討するため、酵素活性測定法により測定した。ストレスセッション終了後、同タイムコースで海馬の total NP 量（前駆型 NP + 活性型 NP）を測定したが、コントロールに比べて増加する傾向が見られたものの有意な差は認められなかった（con: $n = 4$; 0 h: 1.19 ± 0.046 , $n = 6$; 6 h: 1.20 ± 0.13 , $n = 4$; 24 h: 1.16 ± 0.17 , $n = 3$ ）（図 5.A）。またストレスセッション終了後、同タイムコースで、海馬における NP の活性を測定したところ、ストレスセッション終了直後に増加し、6 時間後では減少する傾向が見られたが有意な差は認められなかった（con: $n = 4$; 0 h: 1.06 ± 0.13 , $n = 7$; 6 h: 0.90 ± 0.014 , $n = 4$; 24 h: 0.99 ± 0.093 , $n = 3$ ）（図 5.B）。さらに、NP は LTP 誘導時など迅速かつ一過的な活性化を示すことが報告されていることから（Matsumoto-Miyai et al., 2003）、5 分間の拘束及び尾部への電気刺激を与え、ストレスセッション終了直後の活性化レベルを測定したが、増加する傾向が見られたものの有意な差は得られなかった（con: $n = 8$, stress: 1.23 ± 0.076 , $n = 7$ ）（図 6）。

また、その他のストレス条件についても海馬における NP mRNA の発現変化を検討した。長期ストレス実験を行う際のコントロール群として実験操作によるストレスに慣れさせるため、コントロールマウスは 2 週間ハンドリングを行った。拘束ストレス 30 分間、拘束ストレス 6 時間、拘束ストレス 6 時間/日 \times 21 日間の 3 種類のストレスを与えた後に海馬における NP mRNA の発現を検討した（図 7）。コントロール群に比べ、拘束ストレスを 30 分間与えたマウスでは有意な NP mRNA の発現増加が見られた（2w handling: 0.38 ± 0.052 , $n = 3$; rs30m: 0.71 ± 0.11 , $n = 4$, $P = 0.043$ vs. 2w handling)。拘束ストレスを 6 時間与えた群ではコントロール群と同レベルの NP mRNA の発現が見られ、ストレスによる NP mRNA の発現増加は認められなかった（2w handling: 0.38 ± 0.052 , $n = 3$; rs6h: 0.42 ± 0.024 , $n = 4$ ）。一方、拘束ストレス 6 時間/日 \times 21 日間与えたマウスではコントロール群に比べて海馬 NP mRNA の発現は減少する傾向が見られた（2w handling: 0.38 ± 0.052 , $n = 3$; rs6h \times 21 d: 0.20 ± 0.040 , $n = 3$, $P = 0.067$, vs. 2w

handling)。以上の結果からも海馬における NP mRNA の発現は急性ストレスに
応答して増加することが示唆された。

NP mRNA の発現はストレスレベルの CORT によって誘導される。

CORT が NP mRNA の発現にどのような影響を与えるかを検討するため、
C57BL/6 マウスより作成した海馬初代培養細胞に CORT を作用させた。培養 6
日目の海馬初代培養細胞に NP 及び CORT 受容体 (GR, MR) が発現しているこ
とを RT-PCR により確認した (data not shown)。培養 6 日目の海馬細胞に終
濃度が 0.10, 1.0, 3.2, 5.0, 10, 32 nM になるよう CORT をそれぞれ培養液中に添加
し、24 時間後に RT-PCR により NP mRNA の発現変化を検討した。コントロ
ール群は CORT 溶液の溶媒を同量添加した細胞を用いた。その結果、5.0 nM
の CORT を添加すると NP mRNA の発現が著しく増加することが明らかになっ
た (0.0 nM: 0.21 ± 0.10 , n = 6; 5.0 nM: 0.56 ± 0.10 , n = 6, $P = 0.034$, vs. con)。また、
3.2, 10, 32 nM の CORT 添加によっても NP mRNA の発現が増加する傾向が見ら
れた (0.0 nM: 0.21 ± 0.10 , n = 5; 3.2 nM: 0.46 ± 0.091 , n = 6, $P = 0.096$; 10 nM: 0.52
 ± 0.13 , n = 5, $P = 0.087$; 32 nM: 0.43 ± 0.048 , n = 6, $P = 0.091$, vs. con) (図 8)。

次に、*in vivo* においても同様に海馬における NP mRNA が CORT によって
誘導されるかを検討した。内在性の CORT を除去するため、麻酔下でマウス
の両側副腎を摘出 (ADX) し、手術から 1 週間の回復期間を与え内在性の CORT
による影響を除去した。1 週間の回復期間中は 0.9% NaCl を飲料水として与
えた。回復期間後、ADX したマウスにストレスレベルの CORT (10 mg / kg
B.W.) (Hansson et al., 2000) を皮下投与し、1 時間後の海馬における NP mRNA
の発現変化を RT-PCR により検討した (図 9. A)。比較対照群には ADX マウ
スに CORT 溶液の溶媒を同容量皮下投与したマウスを用いた。その結果、ス
トレスレベルの CORT を皮下投与することによって海馬における NP mRNA の
発現はストレス負荷時と同レベルの有意な増加が認められた (ADX + VHE: 0.23
 ± 0.075 , n = 5; ADX + CORT : 0.70 ± 0.011 , n = 5, $P = 0.011$, vs. ADX + VHE) (図 9.
B)。以上の結果から急性ストレス負荷後に見られる海馬における NP mRNA
の発現増加は CORT によって直接、または間接的に誘導される可能性が示唆さ
れた。

急性ストレスによる NP mRNA の発現増加は GR または MR を介さずに誘導される。

急性ストレス負荷によって誘導される NP mRNA の増加が CORT 受容体 (GR, MR) を介して制御されているかを検討するため、マウスに GR 阻害剤: RU38486 (mifepristone) または MR 阻害剤: RU28318 を皮下投与し (Kim et al., 1998; Pavlides et al., 1995)、1 時間後にストレス (1 時間の拘束+尾部への電気刺激) を与え、ストレスセッション終了直後の NP mRNA の発現を測定した (図 10. A)。比較対照群としては各阻害剤の溶解に用いた溶媒を同容量皮下投与したマウスを用いた。溶媒投与群 (VHE) にストレスを与えたところ、無処置マウス (naïve) と同様に海馬における NP mRNA の発現が有意に増加した。また、RU28486 投与群、RU28318 投与群においても同様に、ストレスセッション終了後に海馬における NP mRNA の発現が有意に増加した。また、ストレスによって増加した NP mRNA の発現は全ての群間で有意な差は認められなかった (naïve: 0.33 ± 0.055 , $n = 9$, 0.64 ± 0.056 , $n = 4$, $P = 0.0032$; VHE: 0.25 ± 0.079 , $n = 6$, 0.61 ± 0.080 , $n = 6$, $P = 0.0088$; RU486: 0.28 ± 0.048 , $n = 6$, 0.78 ± 0.065 , $n = 8$, $P < 0.001$; RU318: 0.23 ± 0.071 , $n = 4$, 0.86 ± 0.012 , $n = 6$, $P = 0.0019$, no-stress vs. stress) (図 10. B)。

阻害実験に用いたマウスの血漿中 CORT レベルを測定したところ、全ての群においてコントロールに比べ、ストレスセッション終了直後に有意な血漿中 CORT 濃度の増加が見られ、阻害薬投与によるストレス負荷後の CORT レベルへの影響は認められなかった (naïve: 104.2 ± 37.6 , $n = 8$, 474.6 ± 54.5 , $n = 4$, $P = 0.0014$; VHE: 136.4 ± 35.1 , $n = 5$, 789.5 ± 35.1 , $n = 6$, $P = 0.02$; RU486: 98.1 ± 47.8 , $n = 3$, 474.7 ± 11.3 , $n = 8$, $P = 0.012$; RU318: 108.0 ± 19.5 , $n = 4$, 428.2 ± 24.2 ng / mL, $n = 6$, $P < 0.001$, no-stress vs. stress)。また、ストレスによって増加した血漿中 CORT 濃度は全ての群間で有意な差は見られなかった (図 10. C)。以上の結果から、急性ストレスによって増加する海馬・NP mRNA の発現は GR または MR を直接介さない間接的なシグナル経路によって誘導されることが示唆された。一方、阻害剤によるストレス負荷後の CORT レベルに差がみられなかったことから、GR または MR を直接介さない間接的なシグナル経路を介してストレス負荷後に NP mRNA の発現増加が誘導されることが推察される。

また、両阻害剤の混合液 (RUmix) を皮下投与し、ストレスを与えた群でも同様に、阻害剤による効果は認められず、ストレス負荷後に NP mRNA の発現が増加する傾向が見られた (RUmix-con: AVE: 0.26, $n=2$; RUmix-rtS0: 0.56 ± 0.11 , $n = 3$) (図 11)。さらに阻害剤が脳へ到達し作用していない可能性を考え、マ

ウスにカニューレシオン手術を施し、1週間回復させた後に RU28318 を側脳室へ投与し、ストレスを与えた後に比較検討を行った。しかしながら、溶媒を投与した群においてストレス負荷による海馬 NP mRNA の発現増加が認められず、ストレスを与えていない偽手術 (Sham) 群においても CORT レベルが増加し手術自体がストレスになっていると考えられたため、侵襲性の低い方法によるなど何らかの別の方策をとる必要があるであろう (図 12)。

NP はストレスが誘導する神経可塑的变化を調節する。

マウスに急性ストレスを与えると、ストレス負荷後の記憶学習や不安行動に影響を与えることが知られている。NP+/+及びNP-/-マウスにおいて急性ストレス (拘束 1 時間) を与えた後の恐怖条件づけによる学習課題の成績を比較検討した。恐怖条件づけはマウスを装置に入れ (無条件刺激)、嫌悪刺激として床への通電による foot shock を数回与える。この条件づけにより嫌悪刺激と不快な経験を受けた「環境」が結び付けられ、嫌悪刺激を与えない装置内においてもマウスは不安や恐怖を感じる。条件づけから 24 時間後にマウスを再び同じ装置に入れ (嫌悪刺激は与えない)、恐怖・不安反応の指標としてすくみ行動 (Freezing) 反応を測定し、連合学習が成立しているか否かを判定する。

急性ストレスが恐怖条件づけに影響を与えることはよく知られており、ストレス後の恐怖条件づけが亢進するという報告やまた逆に抑制されるという報告もある (Blank et al., 2002; Cordero et al., 2003; Joels et al., 2006; Rau et al., 2005)。Cordero 等の実験条件を参考に予備実験として急性ストレス (拘束 1 時間) を与えた後に恐怖条件づけを行った。嫌悪刺激として foot shock: 0.7 mA, 2 sec, 1 回を与え、2 又は 3 時間後に同様の刺激環境下に再暴露し (嫌悪刺激無し) その際生じるすくみ行動 (freezing) を不安の指標として測定した。Cordero 等の実験結果は、ストレスを与えてから 2、または 3 時間後に嫌悪刺激を与えたマウスでは、ストレスを与えていないマウスに比べて再暴露時の不安行動 (Freezing の割合) が増加すると報告されたが、今回、同条件で行った行動実験結果においては彼らが報告したストレスによる不安行動の増加は認められなかった。ストレスを与えてから 2 時間 (no-stressed mice: 51.67 ± 18.95 , $n = 3$; stressed mice: $49.87 \pm 9.67\%$, $n = 4$)、及び 3 時間後に嫌悪刺激を与えたマウス (no-stressed mice: 22.92 ± 7.78 , $n = 6$; stressed mice: 16.85 ± 5.51 , $n = 6$) においてストレスによる影響は認められなかった (図 13)。したがって、この条件では NP+/+マウスと NP-/-マウスにおける Freezing の割合 (%) を比較するには適さないと判

断し、以下の条件で行動実験を行い、ストレスが誘導する神経可塑性に NP がどのような役割を果たすかを検討した。

1) まず、拘束ストレス後に発現上昇する NP が恐怖条件づけ学習にどのような影響を与えるか検討するために、NP mRNA が十分増加している拘束ストレスセッション終了から 24 時間後に恐怖条件づけを行った（嫌悪刺激：foot shock: 0.4 mA, 1 sec を 3 回）。条件づけから 24 時間後にマウスを装置の中に入れ同様の刺激環境下に再暴露し（嫌悪刺激無し）Freezing の割合（%）を測定した。その結果、NP +/+マウスではストレスによる不安行動（Freezing）への影響は認められず、ストレス負荷群およびストレスを与えていないコントロール群の間で有意な差は認められなかった（no-stressed NP +/+ : 54.4 ± 6.38 , n = 7; stressed NP +/+ : $62.05 \pm 7.51\%$, n = 8）。一方 NP -/-マウスにおいては、ストレスを負荷するとストレスを与えていないコントロール群に比べて Freezing の割合が有意に減少し、ストレスによる影響が顕著に現れた（no-stressed NP -/- : 68.0 ± 4.03 , n = 9; stressed NP -/- : 30.3 ± 5.56 , n = 9, $P < 0.001$, no-stress NP -/- vs. stressed NP -/-）。ストレスを与えていない群においては NP+/+マウスと NP-/-マウスにおいて Freezing の割合に有意な差は見られなかったが（no-stressed NP +/+ : 54.4 ± 6.38 , n = 7; no-stressed NP -/- : 68.0 ± 4.03 , n = 9）、ストレス負荷群においては、NP -/-マウスの Freezing の割合は NP +/+マウスに比べて減少する傾向が見られた（stressed NP +/+ : $62.05 \pm 7.51\%$, n = 8; stressed NP -/- : 30.3 ± 5.56 , n = 9, $P = 0.056$, stressed NP +/+ vs. stressed NP -/-）（図 14）。以上より、NP-/-マウスはストレスによる影響を受けやすく、ストレス負荷後の関連記憶が障害される可能性が示唆された。また、ストレス負荷による NP mRNA の発現増加はストレス負荷による記憶障害に関与する可能性が考えられたため、海馬における NP mRNA の発現が比較的低いと想定される時間に恐怖条件づけを行い、NP +/+、NP -/-マウスの行動変化について比較検討した。

ストレスセッション終了直後に NP mRNA の発現に有意な差がないことから（図 3）、2) 急性ストレス負荷から 2 時間後に条件づけを行い（嫌悪刺激: foot shock: 0.4 mA, 2 sec を 3 回）、条件づけから 24 時間後にマウスを装置の中に入れ同様の刺激環境下に再暴露し（嫌悪刺激無し）Freezing（%）を測定した。ストレス負荷直後に恐怖条件づけを行うと、ストレスによる鎮痛が誘導されるため（stress-induced analgesia）（Bodnar et al., 1980）、鎮痛から回復していることを確認した（data not shown）ストレス負荷 2 時間後に恐怖条件づけを行った。その結果、ストレスを負荷した NP +/+マウスにおいて、Freezing が顕著に減少し（no-stressed NP +/+ : 50.15 ± 7.28 , n = 7; stressed NP +/+ : $21.21 \pm 3.07\%$, n = 8, $P < 0.001$, no-stress vs. stress）、その Freezing レベルはストレスを負荷した NP -/-マウ

スとほぼ同程度であった (stressed NP -/ -: 29.45 ± 5.45 %, $n = 9$; stressed NP +/-: 21.21 ± 3.07 %, $n = 8$) (no-stressed NP -/ -: 48.48 ± 5.38 %, $n = 9$; stressed NP -/ -: 29.45 ± 5.45 %, $n = 9$, $P = 0.042$, no-stress vs. stress) (図 15)。以上の結果から、NP はストレス負荷による記憶障害からの回復過程に関与する可能性が示唆された。

考察

ストレスを伴う経験は海馬に機能的・構造的変化を引き起こすことが知られている (Kim and Diamond, 2002; Lisman, 1999; McEwen, 1994; Watanabe et al., 1992b)。 KLK ファミリーに属する NP はストレス応答に重要な海馬に発現し、近年の研究により海馬における LTP や神経活動依存的なシナプス新生、海馬依存的な学習に関与することが報告されている (Ishikawa et al., 2008; Komai et al., 2000; Matsumoto-Miyai et al., 2003; Nakamura et al., 2006)。 また癌細胞株を用いた研究により、NP の発現はステロイドホルモンによって変化し (Kishi et al., 2003; Yousef and Diamandis, 2002)、海馬初代培養細胞においてもステロイドホルモンである CORT やエストラジオールによって NP mRNA の発現が変化することが報告された (原田修士論文)。 このことから、神経可塑性関連分子 NP に注目しストレスが誘導する神経可塑的变化の作用機構について検討を行った。

ストレスが誘導する神経可塑的变化に NP が関与するかを検討するため、マウスに急性ストレスを与え海馬における NP mRNA の発現変化を測定した。マウスに1時間の拘束及び尾部への電気刺激 (ストレス 1) を与え、RT-PCR により検討したところ、ストレスセッション終了直後から海馬における NP mRNA の発現がコントロール群に比べて有意に増加した。 ストレスセッション終了から6時間後ではコントロール群に比べて2.7倍増加し、24時間後においても2.5倍の増加が持続していた。 身体的要因が比較的低いストレスとして1時間の拘束のみのストレス(ストレス 2) を与え、海馬における NP mRNA の発現変化を検討したところ、ストレスセッション終了後から徐々に増加し、6時間後には有意な増加が見られ24時間後においても NP mRNA の発現増加は持続したことから、NP mRNA の発現は痛みなどの侵襲ではなく、急性ストレス (生理心理学的ストレス) に応答して増加することが明らかとなった。 また、血漿中 CORT 濃度をそれぞれのストレスセッション終了直後と比較すると、ストレス 2 に比べてストレス 1 で高い値が得られ、CORT レベルはストレスレベルを反映していると考えられた。 さらに、ストレス負荷後に見られた NP mRNA の発現もストレス 2 に比べるとストレス 1 で著しい増加が見られた。 以上のようにストレス負荷後に見られる NP mRNA の発現増加は血漿中 CORT 濃度と比例する傾向が見られたことから、海馬における NP mRNA の発現はストレスセッション後の血漿中 CORT 濃度やストレスレベルに相関して誘導される可能性が示唆された。

さらに、ストレス 1 (1 時間の拘束及び尾部への電気刺激) によって誘導される海馬 NP mRNA の発現増加が NP タンパク量の増加を示しているかを検討するため、酵素活性測定法を用いて測定を行ったが、コントロール群に比べて増加する傾向が見られたものの有意な差は認められなかった。以上の結果からは NP mRNA の増加が NP タンパク量の増加を反映していることを示すことができなかった。NP は分泌された後に活性化されると非可逆的に Serine Protease Inhibitor 3 (SPI3) によって不活性化されることが報告されている (Kato et al., 2001)。今回用いた測定系は前駆型 NP をリジルエンドペプチターゼで活性化させ、間接的に NP タンパク量を測定する系であったため、SPI3 が結合し不活性化されている NP の量は反映されていない。活性型 NP が SPI3 によって不活性化されタンパク分解系へと運ばれる NP 活性化-代謝経路が活発に動いていたため、NP タンパク量の変化をとらえることができなかった可能性も考えられる。またウエスタンブロッティングや免疫染色により検討することができる感度の良い NP の抗体を作成し検討を行えば異なる結果が得られる可能性も考えられる。

今回用いた急性ストレスは海馬における LTP 誘導を抑制し、本来成体マウスでは誘導されない刺激によって LTD が誘導されることが報告されている (Xu et al., 1997; Yang et al., 2004)。こうした現象はストレスによって駆動されるシグナル経路が LTP 成立時に使用される分子と共通であるため、ストレスによって使用された関連分子が枯渇し LTP 誘導が阻害されると考えられている (Ahmed et al., 2006; Korz and Frey, 2003; Xu et al., 1997)。当研究室の報告により NP は早期 LTP の成立に関与し濃度依存的に LTP レベルを調節する分子であることが示唆されている (Ishikawa et al., 2008; Komai et al., 2000; Tamura et al., 2006)。また、早期 LTP 誘導後に海馬において NP の活性化が著しく上昇することが示されていたため、ストレス負荷直後に NP の活性化が見られるのではないかと推測した。しかしながら、ストレスセッション終了後、同タイムコースで海馬における NP の活性化を測定したところ、ストレスセッション終了直後に増加する傾向が見られたが有意な差は認められなかった。これまでに、NP は LTP 誘導時など迅速かつ一過的な活性化を示すことが報告されている (Matsumoto-Miyai et al., 2003; Tamura et al., 2006)。急性ストレス負荷 1 時間の間に NP が一過的に活性化されている可能性も考えられるため、5 分間の拘束及び尾部への電気刺激を与え、ストレスセッション終了直後の活性化レベルを測定したが、増加する傾向が見られたものの有意な差は得られなかった。以上の結果からは、NP がストレス時に活性化しているかを判断するデータにはなり

得なかったが、NP の活性測定法の感度の向上や、NP の活性をリアルタイムに測定できるような手法が確立すれば明らかにすることができるかもしれない。

NP mRNA の発現が CORT 濃度に応答して増加しているかを検討するため、*in vitro* で CORT を作用させ海馬における NP mRNA の発現変化を検討した。NP 及び CORT 受容体 (GR, MR) が発現している海馬初代培養細胞においてストレスレベルの CORT を作用させると NP mRNA の発現が増加し、低い CORT 濃度を作用させても発現変化は認められなかった。以上の結果から CORT 濃度に比例して NP mRNA の発現が変化することが示唆された。また、*in vivo* で内性 CORT を除去した ADX マウスにストレスレベルの CORT を皮下投与するとストレス負荷後と同等の海馬 NP mRNA の発現増加が見られたことから、急性ストレス負荷による海馬 NP mRNA の発現増加は CORT が関与することが示唆された。

CORT は海馬に発現する 2 種類の受容体 (MR, GR) に作用することが知られている。CORT が作用する MR は海馬にほぼ限局して存在し、GR は脳内に広範に存在する。共に CORT に対して親和性を持つが MR は GR に比べて約 10 倍親和性が高く、通常は MR が作用しているがストレス負荷による CORT レベルの上昇時には GR も機能することが報告されている (Joels, 2006)。ストレス負荷後に見られる海馬 NP mRNA の発現増加は GR、または MR を介している可能性が考えられたが、阻害実験による結果はどちらの受容体を阻害しても抑制されないという予想外の結果であった。また、阻害剤が海馬で作用していない可能性も考えられたため、側脳室へ直接阻害剤を投与する実験も検討したが、偽手術処置マウス (Sham) において CORT 濃度が上昇し、手術自体がストレスとなっていたため有益な比較検討を行うことができなかった。今後はさらに海馬初代培養細胞を用いた阻害実験など別の方策により検討を行うことや、皮下投与による阻害剤が海馬において作用しているかを確認する必要性が考えられる。

in vitro、*in vivo* でストレスレベルの CORT を投与すると海馬における NP mRNA の発現が増加した。一方、ストレス負荷による血漿中 CORT レベルの増加は一過的である。ストレス負荷後の NP mRNA の発現増加は、血漿中 CORT 濃度がコントロールレベルまで回復しているにも関わらず 24 時間後も持続していた。これまでの研究により NP mRNA の発現は LTP 誘導時やキンドリング誘発後等、神経活動依存的に変化することから (Chen et al., 1995; Okabe et al., 1996)、ストレス負荷後の NP mRNA の発現増加はストレス負荷による神経活動の増加によって惹起される可能性も考えられる。したがって、ストレスに

よって増加する海馬 NP mRNA の発現は GR または MR を直接介さない間接的なシグナル経路によって誘導されることが推察される。また、急性ストレス負荷時に駆動するシグナル経路は LTP 誘導時に使われる mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル、immediate-early responsive transcription factor やカルシウムチャンネル電流等に影響を与えることが示唆されており (Chameau et al., 2007; Korz and Frey, 2003; Melia et al., 1994) NP mRNA の発現変化もこうした経路に関連するのかもしれない。また、NP cDNA の上流配列に GR、または MR が結合するホルモン応答配列 (HRE) がないことから、間接的な経路によって調節されることが推測される。

急性ストレスは、ストレス負荷後の記憶学習や不安行動に影響を与えることが知られており (Joels et al., 2006)、ストレスが誘導する神経可塑的变化に、NP が関与するかを検討した。今回用いた行動実験は、急性ストレスにより記憶学習、不安行動が変化することでよく用いられている恐怖条件づけを行った。マウスの性質として一般的に恐怖や不安を感じると停止し、すくみ行動 (Freezing) を示すことが知られており、マウスに嫌悪刺激 (床への電気刺激) と無条件刺激 (刺激環境と同様の装置) の関連学習が成立すると、マウスは無条件刺激のみで恐怖・不安を感じ、すくみ行動を起こし Freezing の割合が高くなり、この割合はストレスによって顕著な影響を受ける (Blank et al., 2002; Cordero et al., 2003; Joels et al., 2006; Rau et al., 2005)。Freezing の割合を指標にして恐怖条件づけ「学習」ができていないか、また「不安」を示す割合が変化するか否かを判定した。

拘束ストレス負荷から 24 時間後の恐怖条件づけ 1) では、ストレスによる不安行動への影響は NP +/+マウスでは認められず、嫌悪刺激を経験した環境を記憶し、連合学習が成立していたが、NP -/-マウスにおいては、ストレスを与えた群で不安行動が減少し連合学習が成立していない可能性が考えられた。一方、ストレス負荷から 2 時間回復させた後に条件づけを行った結果においては、NP +/+と NP -/-マウス共にストレスによる影響が見られ、ストレスによって不安行動が著しく減少し、連合学習が成立していない可能性が示唆された。以上の結果は、拘束ストレス負荷後の NP mRNA の発現増加のタイムコースと一致するものであり、ストレス負荷後に記憶を獲得するためには、ある一定期間が必要でありその時間は NP の発現レベルに相関している可能性が考えられる。

また近年、NP -/-マウスの行動試験バッテリーによる解析の結果、NP -/-マウスは不安を感じやすい性質を持つことが示唆されている (Horii et al, 2008 in press)。本研究の行動実験の結果から NP が欠損すると、不安を感じやすい性

質であるが故に、弱いストレス環境（条件づけ 1）においてもストレスによる影響を顕著に受ける可能性も推察される。

一般に、てんかんモデルマウスなどの神経ネットワークが過活動状態である時、恒常的可塑性と呼ばれる現象がネットワークの活動を抑え、恒常性を維持するために機能することが知られている (Turrigiano and Nelson, 2004)。NP はてんかんモデルマウスにおいて発現が増加し、神経活動の過亢進を調節すると考えられている (Okabe et al., 1996)。実際、NP-/-マウスは、カイニン酸投与によって高いレベルのてんかん発作が誘導される (Davies et al., 2001)。本研究結果においても、NP はストレスによる神経ネットワークの過活動状態を調整するため、ストレス負荷後に発現が上昇する可能性が考えられる。NP は、基質の候補分子の一つである L1 などの細胞接着分子をプロセッシングすることにより、シナプスのリモデリングに関与することが示唆されている (Nakamura et al., 2006)。実際、ストレス負荷によって細胞接着分子 L1 の発現が増加することが報告されており (Venero et al., 2002)、ストレスが誘導する神経可塑的变化において、プロテアーゼによる細胞接着分子のプロセッシングに伴うシナプスの構造変化が、ストレスによる神経活動の亢進を対処する重要な役割を担う可能性が考えられる。

近年、Pawlak らの研究により急性ストレスに誘導される神経可塑的变化において扁桃体の組織型プラスミノゲンアクチベータ (tPA) が重要な役割を担うことが見出された (Pawlak et al., 2003)。NP は急性ストレスによって海馬で発現誘導されるのに対し、tPA は扁桃体 (CeA: 扁桃体中心核) で増加し扁桃体依存的な行動タスクに関与する。また、tPA や NP がストレスによって誘導される発現変化は脳領域、時間が異なる (Bennur et al., 2007; Matys et al., 2004; Pawlak et al., 2003)。tPA は慢性ストレス負荷時には海馬で活性が増加し、tPA-/-マウスでは慢性ストレスによる樹状突起のスパインの減少が認められず、ストレスが誘導するシナプス構造変化に関与することが示唆されている (Pawlak et al., 2005)。一方、NP mRNA の発現は慢性ストレス負荷後には海馬において減少する傾向がみられた。今後さらに、NP-/-マウスを用いて慢性ストレスが誘導するシナプス構造変化を観察することにより、ストレスが誘導する神経可塑的变化に NP がどのような役割を担っているのかをより明確にすることができると考えられる。また、NP は扁桃体 (BLA: 扁桃体基底外側核) にも発現していることから、扁桃体における NP の役割についても検討する必要も考えられる。ストレス誘導型神経可塑性において、以上のようなシナプス構造変化を惹起するようなプロテアーゼカスケードが重要な役割を担い、領域、時間によって使い分けられている可能性が考えられる。

謝辞

本研究に携わる機会を与えて下さり、ご指導ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学細胞構造学講座、塩坂貞夫教授に感謝致します。

研究の遂行に際してご助言下さった今泉和則教授、松本-宮井和政助手、奥村雅代助教、石川保幸助教、畠中由美子研究員に感謝致します。

研究に対する惜しみないご助言を下さり、研究に対する情熱と取り組む姿勢をご教授いただきました駒井章治氏、田村英紀氏、中村雪子氏、堀之内和広氏に心から感謝致します。

研究および研究生活に対する貴重なご助言を下さった清水(岡部)千草氏、岡部明仁氏、二宮文子氏、山崎浩誠氏、堀井陽一郎氏に心から厚く御礼申し上げます。

また、ストレス実験の手法に関してご指導ご鞭撻いただいた英国レスター大学 Dr. Robert Pawlak、和歌山県立医科大学仙波恵美子教授、上山敬司助教授に御礼申し上げます。

in situ hybridization の手法に関してご指導ご鞭撻いただいた兵庫県立医科大学山中博樹氏に御礼申し上げます。

研究活動の犠牲となり、研究の振興を助けてくれた実験動物に哀悼の意を表すると共に感謝いたします。

公私に渡り、楽しい学生生活を支えて下さいました、細胞構造学講座の先輩、同期、後輩の皆様心から感謝すると共にお礼申し上げます。

最後に私の奈良先端科学技術大学院大学における長きに渡る奈良での研究生生活を応援し、心から支えて下さいました方々に心から感謝致します。本当にありがとうございました。

参考文献

Ahmed, T., Frey, J. U., and Korz, V. (2006). Long-term effects of brief acute stress on cellular signaling and hippocampal LTP. *J Neurosci* 26, 3951-3958.

Bellani, R., Luecken, L. J., and Conrad, C. D. (2006). Peripubertal anxiety profile can predict predisposition to spatial memory impairments following chronic stress. *Behav Brain Res* 166, 263-270.

Bennur, S., Shankaranarayana Rao, B. S., Pawlak, R., Strickland, S., McEwen, B. S., and Chattarji, S. (2007). Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience* 144, 8-16.

Blank, T., Nijholt, I., Eckart, K., and Spiess, J. (2002). Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *J Neurosci* 22, 3788-3794.

Bodnar, R. J., Kelly, D. D., Brutus, M., and Glusman, M. (1980). Stress-induced analgesia: neural and hormonal determinants. *Neurosci Biobehav Rev* 4, 87-100.

Bremner, J. D., Randall, P., Scott, T. M., Bronen, R. A., Seibyl, J. P., Southwick, S. M., Delaney, R. C., McCarthy, G., Charney, D. S., and Innis, R. B. (1995). MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 152, 973-981.

Chameau, P., Qin, Y., Spijker, S., Smit, G., and Joels, M. (2007). Glucocorticoids specifically enhance L-type calcium current amplitude and affect calcium channel subunit expression in the mouse hippocampus. *J Neurophysiol* 97, 5-14.

Chen, Z. L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., Shiosaka, S. (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 5088-5097.

Cordero, M. I., Venero, C., Kruyt, N. D., and Sandi, C. (2003). Prior exposure to a single stress session facilitates subsequent contextual fear conditioning in rats. Evidence for a role of corticosterone. *Horm Behav* 44, 338-345.

Davies, B., Kearns, I. R., Ure, J., Davies, C. H., and Lathe, R. (2001). Loss of hippocampal serine protease BSP1/neurospisin predisposes to global seizure activity. *J Neurosci* 21, 6993-7000.

de Kloet, E. R., Joels, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-475.

de Quervain, D. J., Roozendaal, B., and McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.

Frey, U., Muller, M., and Kuhl, D. (1996). A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci* 16, 2057-2063.

Funder, J. W. (1992). Glucocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43, 389-394.

Gurvits, T. V., Shenton, M. E., Hokama, H., Ohta, H., Lasko, N. B., Gilbertson, M. W., Orr, S. P., Kikinis, R., Jolesz, F. A., McCarley, R. W., and Pitman, R. K. (1996). Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 40, 1091-1099.

Hansson, A. C., Cintra, A., Belluardo, N., Sommer, W., Bhatnagar, M., Bader, M., Ganten, D., and Fuxe, K. (2000). Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur J Neurosci* 12, 2918-2934.

Herman, J. P., Schafer, M. K., Young, E. A., Thompson, R., Douglass, J., Akil, H., and Watson, S. J. (1989). Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci* 9, 3072-3082.

Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shiosaka, S. (2001). Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17, 600-610.

Horinouchi, K., Nakamura, Y., Yamanaka, H., Watabe, T., and Shiosaka, S. (2005). Distribution of L1cam mRNA in the adult mouse brain: In situ hybridization and Northern blot analyses. *J Comp Neurol* 482, 386-404.

Huang, Y. Y., Bach, M. E., Lipp, H. P., Zhuo, M., Wolfer, D. P., Hawkins, R. D., Schoonjans, L., Kandel, E. R., Godfraind, J. M., Mulligan, R., Collen, D., and Carmeliet, P. (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8699-8704.

Ishikawa, Y., Horii, Y., Tamura, H., and Shiosaka, S. (2008). Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent synaptic tagging in the Schaffer-collateral pathway of mouse hippocampus. *J Neurosci* 28, 843-849.

Jacobson, L., and Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12, 118-134.

Joels, M. (2006). Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends Pharmacol Sci* 27, 244-250.

Joels, M., Pu, Z., Wiegert, O., Oitzl, M. S., and Krugers, H. J. (2006). Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci* 10, 152-158.

Kato, K., Kishi, T., Kamachi, T., Akisada, M., Oka, T., Midorikawa, R., Takio, K., Dohmae, N., Bird, P. I., Sun, J., Scott, F., Miyake, Y., Yamamoto, K., Machida, A., Tanaka, T., Matsumoto, K., Shibata, M., and Shiosaka, S. (2001). Serine proteinase inhibitor 3 and murinoglobulin I are potent inhibitors of neuropsin in adult mouse brain. *J Biol Chem* 276, 14562-14571.

Kim, J. J., and Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3, 453-462.

- Kim, P. J., Cole, M. A., Kalman, B. A., and Spencer, R. L. (1998). Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67, 213-222.
- Kishi, T., Grass, L., Soosaipillai, A., Shimizu-Okabe, C., and Diamandis, E. P. (2003). Human kallikrein 8: immunoassay development and identification in tissue extracts and biological fluids. *Clin Chem* 49, 87-96.
- Komai, S., Matsuyama, T., Matsumoto, K., Kato, K., Kobayashi, M., Imamura, K., Yoshida, S., Ugawa, S., and Shiosaka, S. (2000). Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *Eur J Neurosci* 12, 1479-1486.
- Korz, V., and Frey, J. U. (2003). Stress-related modulation of hippocampal long-term potentiation in rats: Involvement of adrenal steroid receptors. *J Neurosci* 23, 7281-7287.
- Lewis, D. A., and Smith, R. E. (1983). Steroid-induced psychiatric syndromes. A report of 14 cases and a review of the literature. *J Affect Disord* 5, 319-332.
- Lisman, J. E. (1999). Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* 22, 233-242.
- Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., and Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23, 7727-7736.
- Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., and Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16345-16350.
- McEwen, B., Chao, H., Spencer, R., Brinton, R., Macisaac, L., and Harrelson, A. (1987). Corticosteroid receptors in brain: relationship of receptors to effects in stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 512, 394-401.

McEwen, B. S. (1994). Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 746, 134-142; discussion 142-134, 178-139.

McEwen, B. S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886, 172-189.

McEwen, B. S. (2001). Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 933, 265-277.

Melia, K. R., Ryabinin, A. E., Schroeder, R., Bloom, F. E., and Wilson, M. C. (1994). Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J Neurosci* 14, 5929-5938.

Miner, J. N., and Yamamoto, K. R. (1991). Regulatory crosstalk at composite response elements. *Trends Biochem Sci* 16, 423-426.

Nakamura, Y., Tamura, H., Horinouchi, K., and Shiosaka, S. (2006). Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J Cell Sci* 119, 1341-1349.

Okabe, A., Momota, Y., Yoshida, S., Hirata, A., Ito, J., Nishino, H., and Shiosaka, S. (1996). Kindling induces neuropsin mRNA in the mouse brain. *Brain Res* 728, 116-120.

Pavlidis, C., Watanabe, Y., Magarinos, A. M., and McEwen, B. S. (1995). Opposing roles of type I and type II adrenal steroid receptors in hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 68, 387-394.

Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B., and Strickland, S. (2003). Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 6, 168-174.

Pawlak, R., Rao, B. S., Melchor, J. P., Chattarji, S., McEwen, B., and Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18201-18206.

Rau, V., DeCola, J. P., and Fanselow, M. S. (2005). Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 1207-1223.

Revest, J. M., Di Blasi, F., Kitchener, P., Rouge-Pont, F., Desmedt, A., Turiault, M., Tronche, F., and Piazza, P. V. (2005). The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nat Neurosci* 8, 664-672.

Sandi, C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci* 5, 917-930.

Sapolsky, R. M., Zola-Morgan, S., and Squire, L. R. (1991). Inhibition of glucocorticoid secretion by the hippocampal formation in the primate. *J Neurosci* 11, 3695-3704.

Selye, H. (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 115, 53-56.

Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., and Shiosaka, S. (1998). Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J Biol Chem* 273, 11189-11196.

Suzuki, J., Yoshida, S., Chen, Z. L., Momota, Y., Kato, K., Hirata, A., and Shiosaka, S. (1995). Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neurosci Res* 23, 345-351.

Takahashi, T., Kimoto, T., Tanabe, N., Hattori, T. A., Yasumatsu, N., and Kawato, S. (2002). Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 83, 1441-1451.

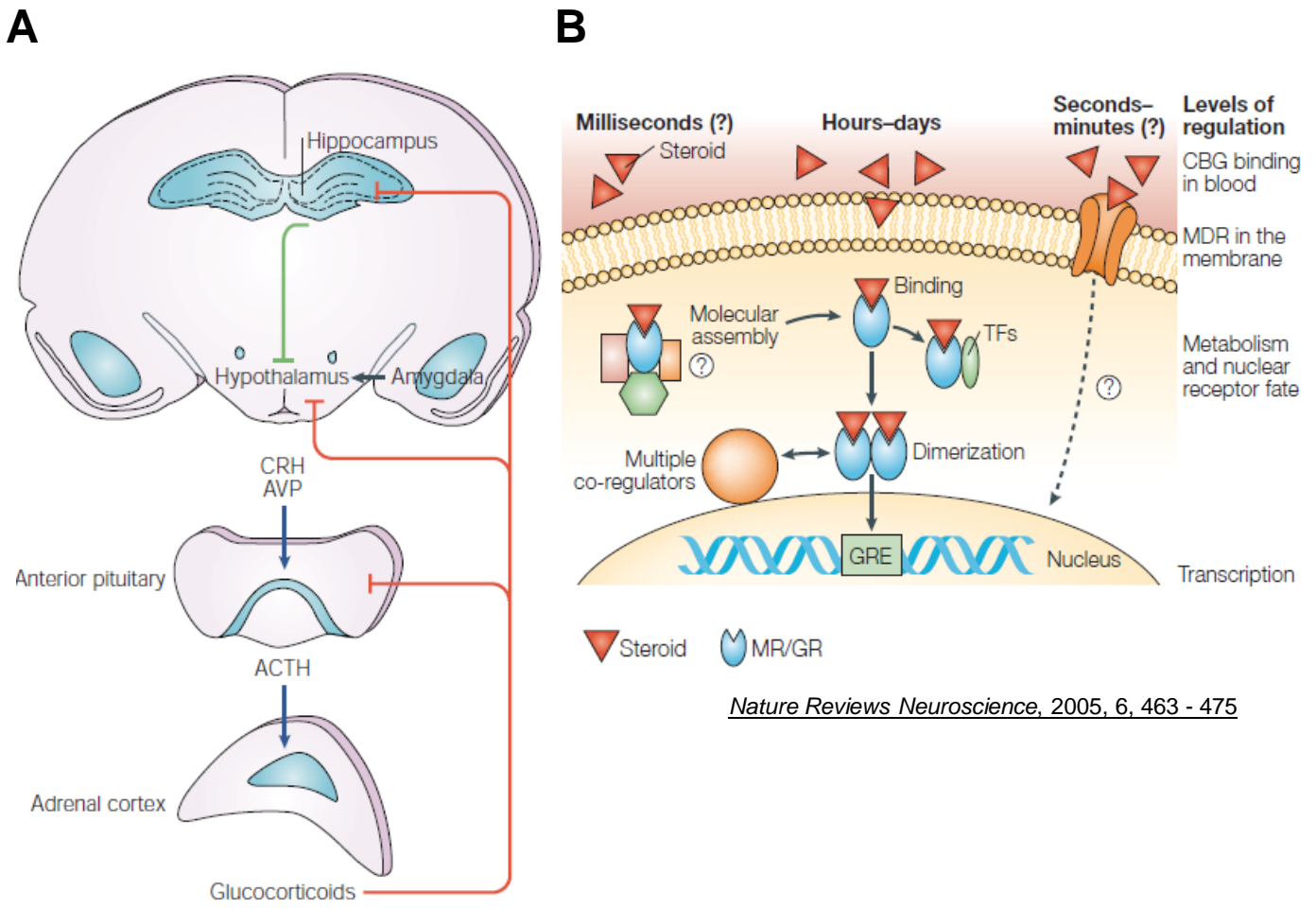
Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S., and Shiosaka, S. (2006). Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo, Vol 570).

Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., and Schutz, G. (1998). Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr Opin Genet Dev* 8, 532-538.

- Turrigiano, G. G., and Nelson, S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5, 97-107.
- Venero, C., Tilling, T., Hermans-Borgmeyer, I., Schmidt, R., Schachner, M., and Sandi, C. (2002). Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neuroscience* 115, 1211-1219.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S., and Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22, 6810-6818.
- Watanabe, Y., Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., and McEwen, B. S. (1992a). Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus* 2, 431-435.
- Watanabe, Y., Gould, E., and McEwen, B. S. (1992b). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588, 341-345.
- Woolley, C. S., Gould, E., and McEwen, B. S. (1990). Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 531, 225-231.
- Xu, L., Anwyl, R., and Rowan, M. J. (1997). Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature* 387, 497-500.
- Yang, C. H., Huang, C. C., and Hsu, K. S. (2004). Behavioral stress modifies hippocampal synaptic plasticity through corticosterone-induced sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci* 24, 11029-11034.
- Yehuda, R., Giller, E. L., Southwick, S. M., Lowy, M. T., and Mason, J. W. (1991). Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 30, 1031-1048.

Yehuda, R., Teicher, M. H., Levengood, R. A., Trestman, R. L., and Siever, L. J. (1994). Circadian regulation of basal cortisol levels in posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci* 746, 378-380.

Yousef, G. M., and Diamandis, E. P. (2002). Kallikreins, steroid hormones and ovarian cancer: is there a link? *Minerva Endocrinol* 27, 157-166.



Nature Reviews Neuroscience, 2004, 5, 917-930

図1. ストレス応答の神経内分泌機構：グルココルチコイド (CORT)

A. 視床下部-下垂体-副腎皮質経路 (HPA-axis)

ストレス刺激により視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) が分泌され、下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌を促し、副腎皮質より副腎皮質ホルモン・グルココルチコイド (ヒト: cortison, げっ歯類: corticosterone (CORT)) が分泌される。分泌されたCORTはHPA系上流に作用しフィードバック機構によって正常レベルに保たれる。海馬はHPA系に対して抑制的に、扁桃体は促進的に作用することが示唆されている。

B. グルココルチコイドの作用機構

-間接経路：CORTが細胞質内に入り細胞質内のタンパクのaggregation-reaggregationを修飾しタンパク複合体の構造を変化させる。

-直接経路：CORTが細胞質内に入りCORT受容体 (MR, GR) に結合した後、核内へ移行しDNA上のプロモータ領域に存在するグルココルチコイド応答配列 (GRE) に直接結合し標的遺伝子の転写を調節する。

-間接経路：CORTは細胞膜に存在することが示唆されているステロイド認識サイト (膜受容体) に作用し、様々なシグナル経路を活性化する。

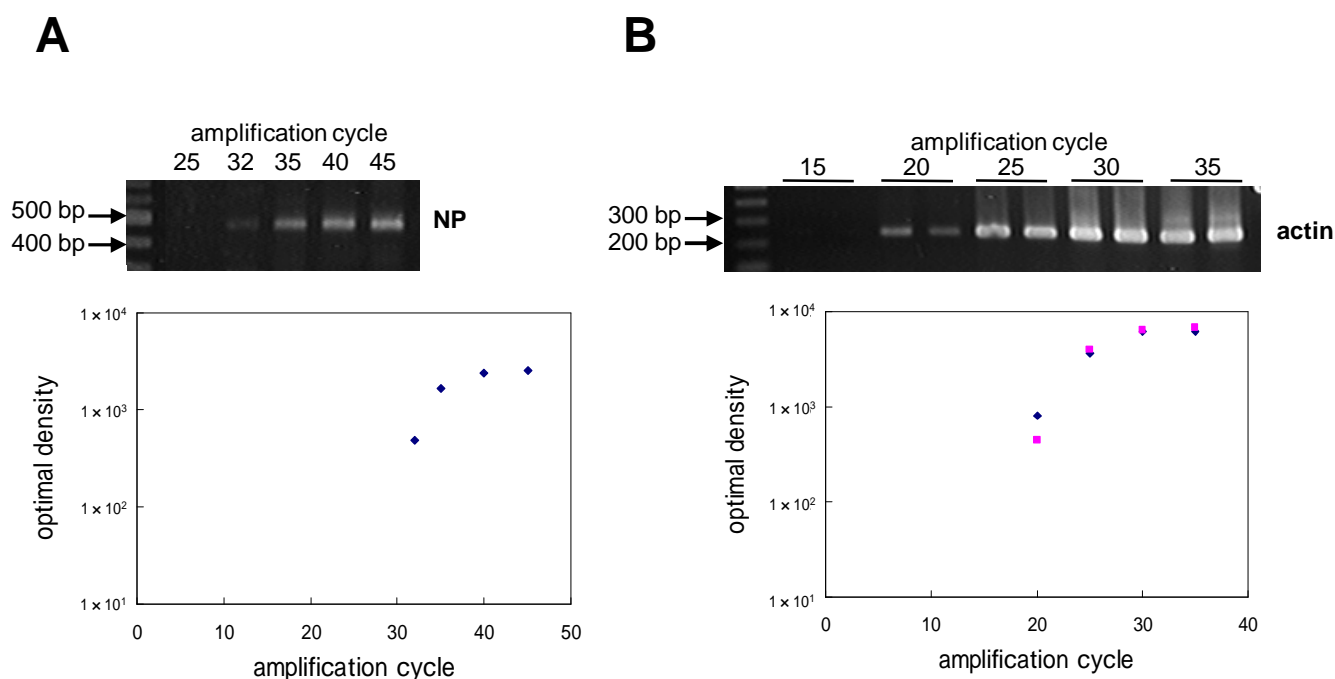


図2. Semi-quantitative RT-PCRの増幅サイクルの検討

- A. total RNA 500 ngより得られた逆転写産物cDNAに対するPCRの最適条件を決定するため、RT-PCRの増幅サイクルを検討した。NPは mRNA由来のPCR生成物（NP:486 bp）を検出した。32 cycleから35cycleではcycle数に依存して増幅され、40 cycle以降はプラトーに達していたため、35 cycleを適用した。
- B. 同様に増幅サイクルの検討を行ったところ、mRNA由来のPCR生成物（actin:243 bp）actinは20 cycleから25 cycleがリニアレンジであり、30 cycleでプラトーに達していた。また、段階希釈をおこなった鋳型cDNA濃度を反映するcycle数が20 cycleであったことからこれを適用した（電気泳動：各サイクル左レーン；5倍希釈, 右レーン；10倍希釈。グラフ： ;5倍希釈, ;10倍希釈。）。

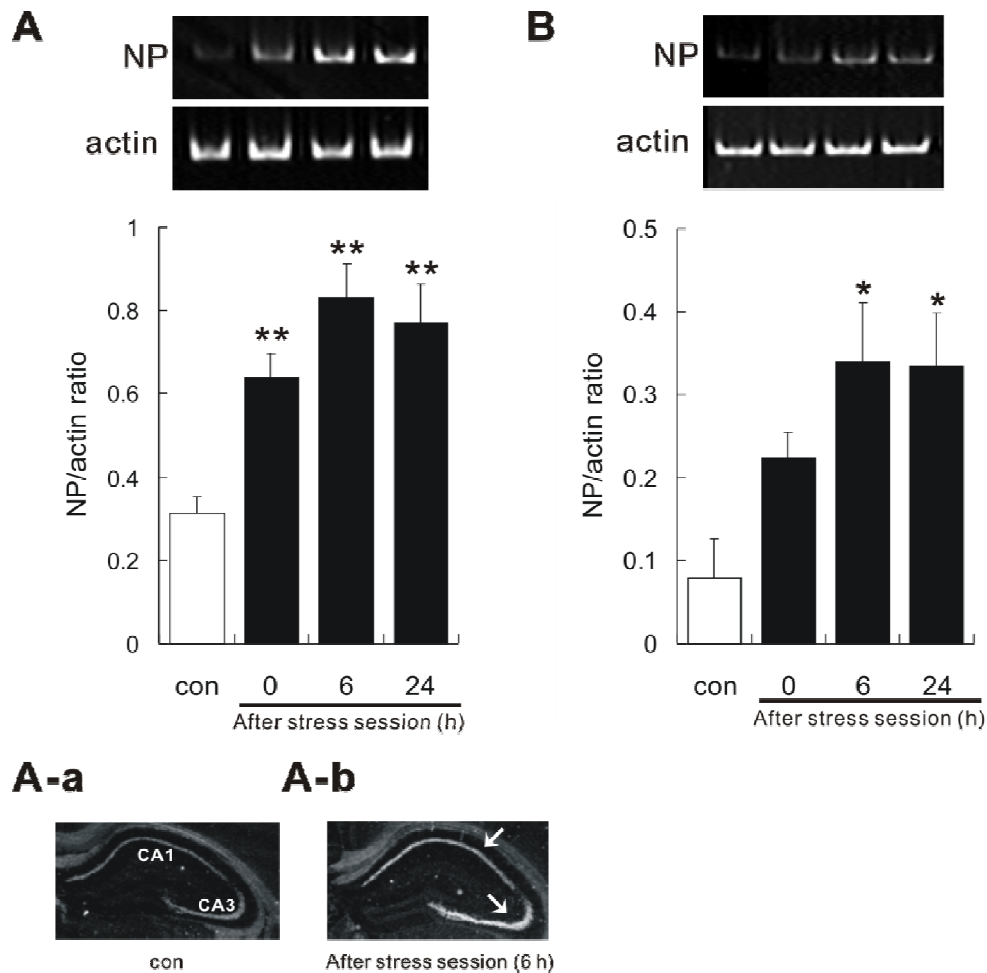


図3. 急性ストレスによって海馬におけるNP mRNAの発現が増加する。

A. 急性ストレスとしてマウスに拘束及び尾部への電気刺激を与えた（1時間の拘束 + 尾部への電気刺激：1 mA for 1 sec; 60 sec apart）。ストレスセッション終了から0, 6, 24時間後に海馬サンプルを採取し、RT-PCRによりNP mRNAの発現変化を検討した。NP mRNAの発現はストレスセッション終了直後から著しく増加し、少なくとも24時間後においても有意な増加が持続した。(con: 0.31 ± 0.040 , $n = 11$; 0 h: 0.64 ± 0.058 , $n = 7$, $P < 0.001$; 6 h: 0.83 ± 0.057 , $n = 7$, $P < 0.001$; 24 h: 0.77 ± 0.076 , $n = 4$, $P = 0.0043$, vs. con)

A-a,b. ストレスセッション終了から6時間後の海馬NP mRNAの発現を *in situ* hybridization により観察した。

B. マウスに拘束1時間のみストレスを与えた。RT-PCRによりNP mRNAの発現変化を検討したところストレスセッション終了後から増加し、6時間後、少なくとも24時間後においても有意な増加が持続した。(con: 0.079 ± 0.048 , $n = 4$; 0 h: 0.22 ± 0.071 , $n = 4$; 6 h: 0.34 ± 0.071 , $n = 4$, $P = 0.027$; 24 h: 0.33 ± 0.064 , $n = 4$, $P = 0.021$, vs. con)

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.001$; NP: ニューロブシン; con: コントロール。

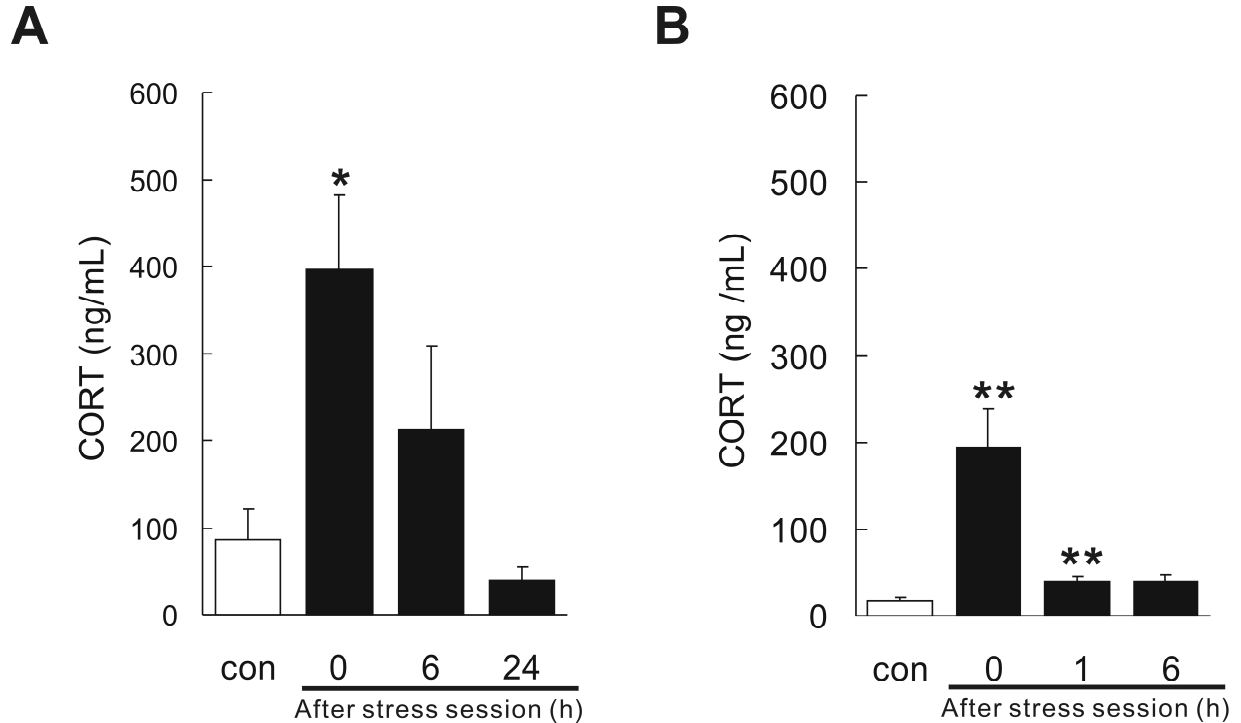


図4. 急性ストレスによって血漿中CORTレベルが増加する。

- A. 急性ストレスとしてマウスに拘束及び尾部への電気刺激を与えた（1時間の拘束 + 尾部への電気刺激：1 mA for 1 sec; 60 sec apart）。ストレスセッション終了から0, 6, 24時間後に血液サンプルを採取し、血漿中CORTレベルを検討したところ、ストレスセッション終了直後に著しい増加が見られた。24時間後には増加した血漿中CORTレベルはコントロールと同等に戻った。(con: 85 ± 36, n = 5; 0 h: 395 ± 87, n = 6, $P = 0.017$; 6 h: 213 ± 94, n = 7; 24 h: 40 ± 13, n = 4, vs. con)
- B. マウスに拘束1時間だけのストレスを与えた後に、血漿中CORTレベルを検討したところ、ストレスセッション終了直後に著しい増加が見られた。ストレスセッション終了から24時間後には血漿中CORTレベルはコントロールと同等に戻った。(con: 35 ± 3.0, n = 4; 0 h: 244 ± 17, n = 4, $P < 0.001$; 6 h: 73 ± 6.4, n = 4, $P = 0.0058$; 24 h: 72 ± 19, n = 4, vs. con)

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.001$; CORT: コルチコステロン; con: コントロール。

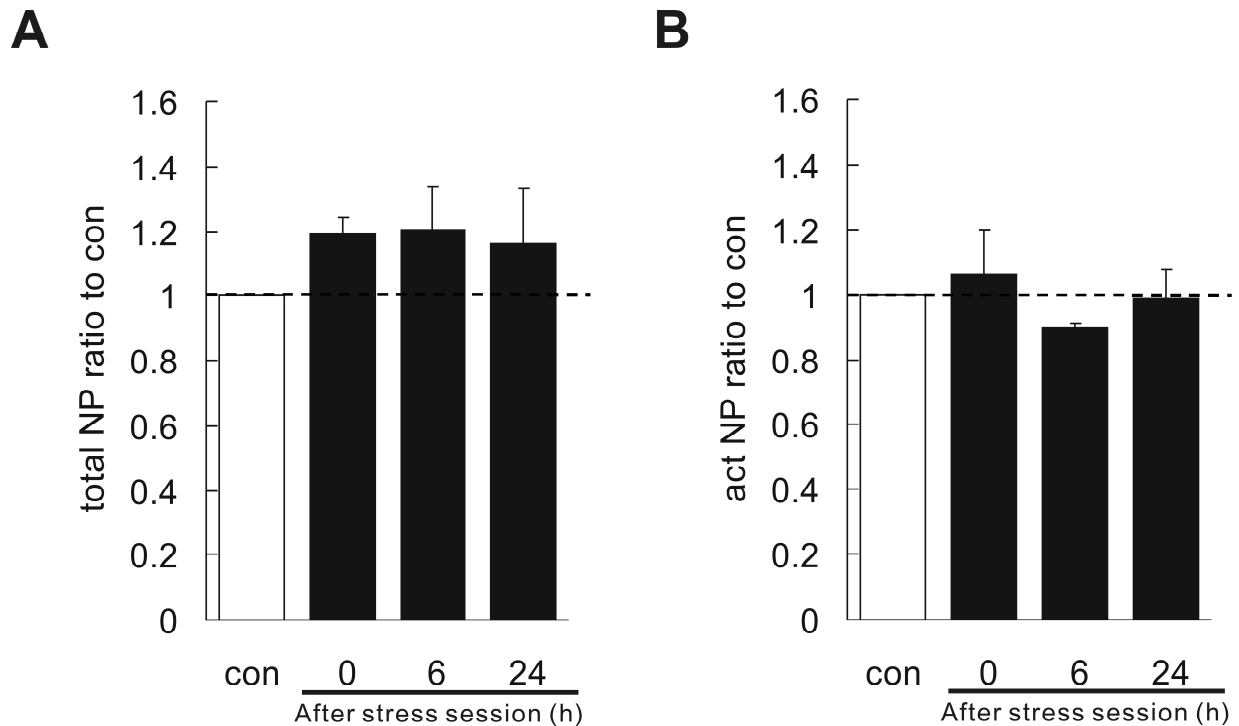


図5. 急性ストレス負荷後のtotal NP発現及びact NPの活性変化

- A. 急性ストレスとしてマウスに拘束及び尾部への電気刺激を与えた（1時間の拘束 + 尾部への電気刺激：1 mA for 1 sec; 60 sec apart）。ストレスセッション終了から0, 6, 24時間後に海馬サンプルを採取し、total NPレベルを検討した。方法は原田修士論文に従って行い、conに対する比率をグラフに表示した。（con, n = 4; 0 h: 1.19 ± 0.046, n = 6; 6 h: 1.20 ± 0.13, n = 4; 24 h: 1.16 ± 0.17, n = 3）
- B. 急性ストレスとしてマウスに拘束及び尾部への電気刺激を与えた（1時間の拘束 + 尾部への電気刺激：1 mA for 1 sec; 60 sec apart）。ストレスセッション終了から0, 6, 24時間後に海馬サンプルを採取し、act NPレベルを検討した。方法は原田修士論文に従って行い、conに対する比率をグラフに表示した。（con, n = 4; 0 h: 1.06 ± 0.13, n = 7; 6 h: 0.90 ± 0.014, n = 4; 24 h: 0.99 ± 0.093, n = 3）

con: control; total NP: non-active form NP + active form NP; act NP: active form NP

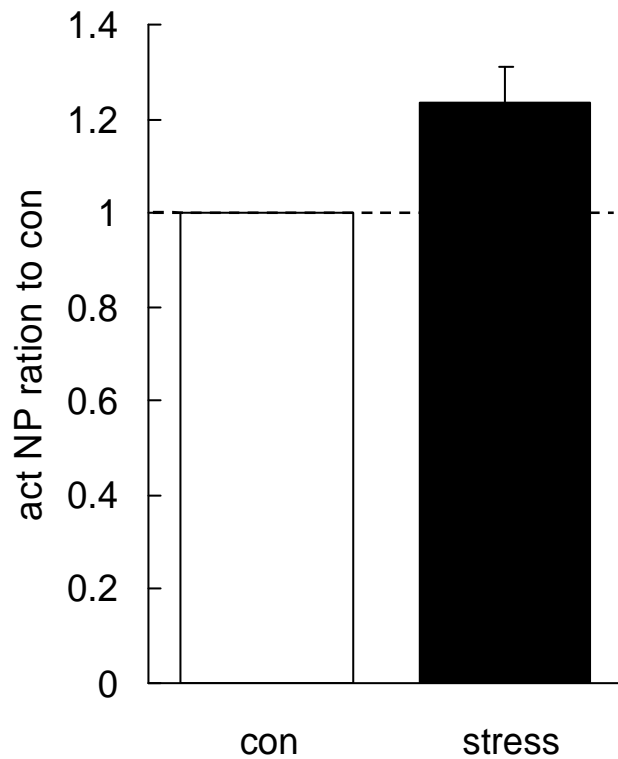


図6. 急性ストレス負荷後のact NPの活性変化

急性ストレスとしてマウスに拘束及び尾部への電気刺激を与えた（5分間の拘束 + 尾部への電気刺激：1 mA for 1 sec; 60 sec apart）。ストレスセッション終了直後に海馬サンプルを採取し、act NPレベルを検討した。

方法は原田修士論文に従って行い、conに対する比率をグラフに表示した。

(con: n = 8, stress: 1.23 ± 0.076, n = 7)

con: control; act NP: active form

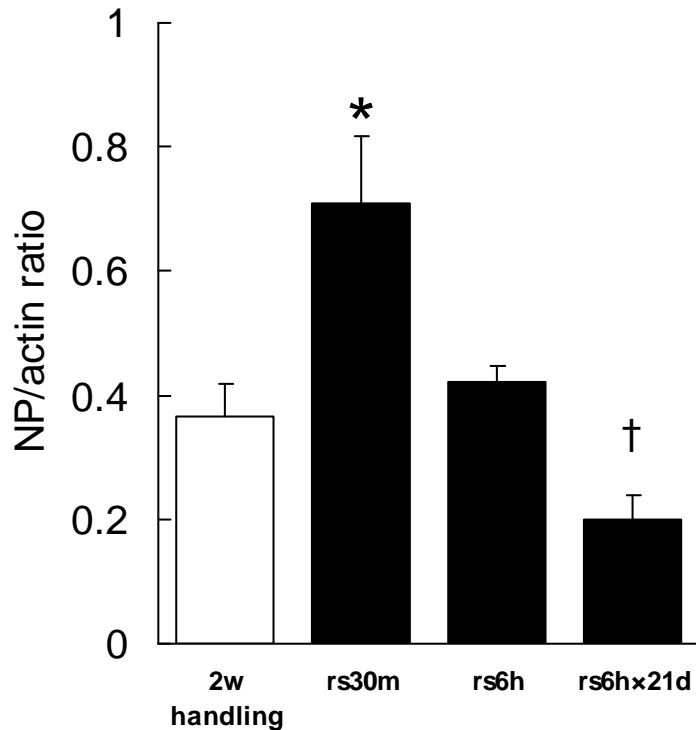


図7. 急性ストレスによって海馬におけるNP mRNAの発現量が増加する。
(その他の条件でのストレス：拘束ストレス時間の検討)

拘束ストレス時間の条件検討として、30分拘束 (rs30m)、6時間拘束 (rs6h) 及び6時間の拘束をに21日間負荷する長期ストレス (rs6h x 21d) を与え、RT-PCRによりNP mRNAの発現変化を検討した。比較対照群としては2週間ハンドリングをし、慣らしたマウスをコントロール (2w handling) として用いた。
(2w handling: 0.38 ± 0.052 , $n = 3$; rs30m: 0.71 ± 0.11 , $n = 4$, $P = 0.043$;
rs6h: 0.42 ± 0.024 , $n = 4$; rs6h x 21 d: 0.20 ± 0.040 , $n = 3$, $P = 0.067$,
vs. 2w handling)

†: $P < 0.1$; *: $P < 0.05$; rs: 拘束ストレス; NP: ニューロプシン

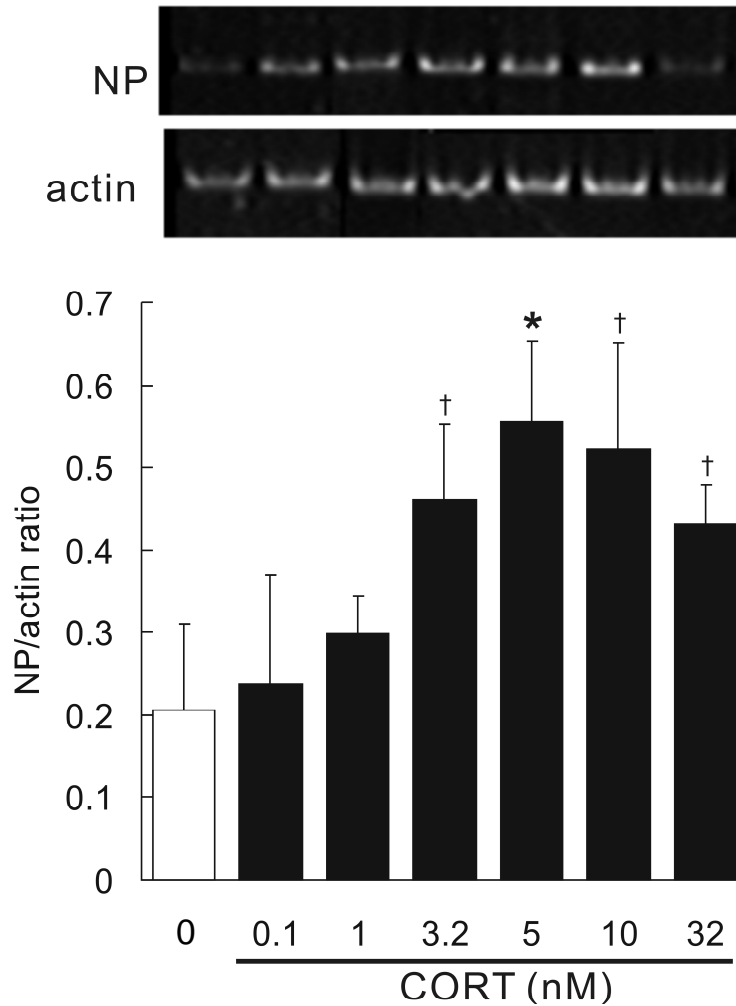


図8. 海馬初代培養細胞にCORTを作用させるとNP mRNAの発現は増加する。

培養6日目にCORT: 0.1, 1, 3.2, 5, 10, 32 nM を培養液中へ添加し、24時間後にRT-PCRによりNP mRNAの発現を検討した。NP mRNAの発現は5 nMのCORTの添加によって有意に増加した。(con: 0.21 ± 0.10 , $n = 6$; 0.1 nM: 0.24 ± 0.13 , $n = 5$; 1 nM: 0.24 ± 0.13 , $n = 6$; 3.2 nM: 0.46 ± 0.091 , $n = 6$, $P = 0.096$; 5 nM: 0.56 ± 0.10 , $n = 6$, $P = 0.034$; 10 nM: 0.52 ± 0.13 , $n = 5$, $P = 0.087$; 32 nM: 0.43 ± 0.048 , $n = 6$, $P = 0.091$, vs. con)

†: $P < 0.1$; *: $P < 0.05$; NP: ニューロプシン; CORT: コルチコステロン;
con: コントロール.

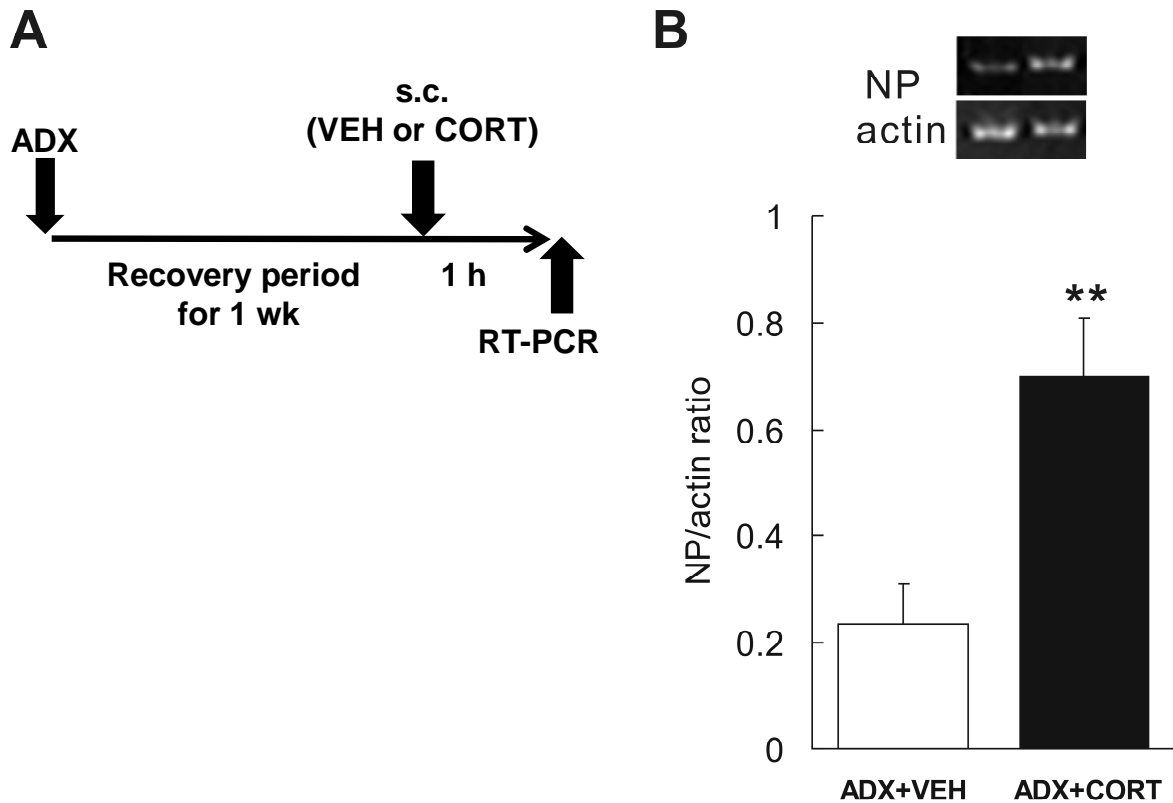


図9. マウスにCORTをストレスレベルで皮下投与すると海馬におけるNP mRNAの発現は増加する。

- A. 実験のタイムスケジュール。ADXしたマウスに1週間の回復期間を与えた後、CORT (10 mg/kg B.W.) を皮下投与し1時間後に海馬におけるNP mRNAの発現変化をRT-PCRにより検討した。
- B. 海馬におけるNP mRNAの発現は溶媒を投与した群 (ADX + VHE) に比べて、CORTを投与にした群 (ADX + CORT) では著しい増加が見られた。(ADX + VHE: 0.23 ± 0.075 , $n = 5$; ADX + CORT: 0.70 ± 0.011 , $n = 5$, $P = 0.011$, vs. ADX + VHE)

**: $P < 0.001$; NP: ニューロプシン; CORT: コルチコステロン; ADX: 副腎除去; VHE: 溶媒; s.c.: 皮下投与.

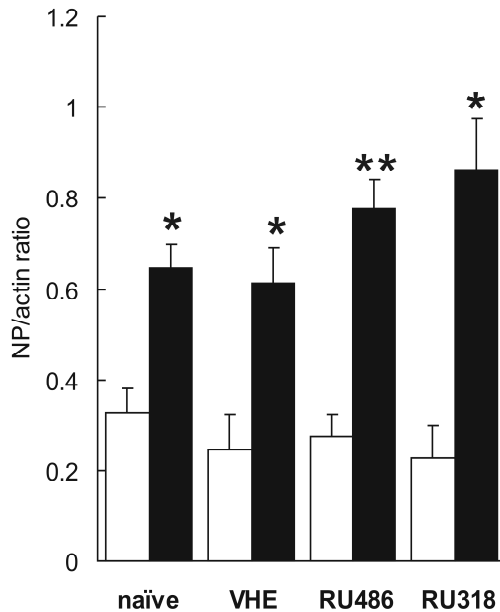
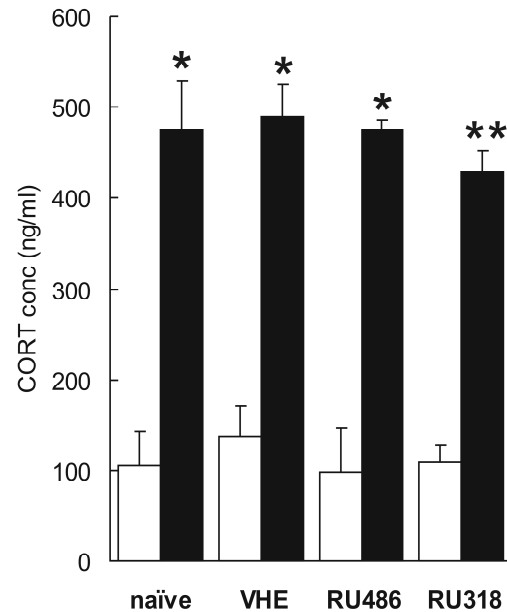
A**B****C**

図10. 急性ストレスによるNP mRNAの発現増加はGRまたはMRを介さずに誘導される。

- A. 実験のタイムスケジュール。マウスにVHE、RU486 (7.5 mg/kg B.W.) R386 (50 mg/kg B.W.) を皮下投与し1時間後にストレス (1時間の拘束 + 尾部への電気刺激 : 1 mA for 1 sec; 60 sec apart) を与えた。ストレスセッション終了直後の海馬におけるNP mRNAの発現変化をRT-PCRにより検討した。
- B. 海馬におけるNP mRNAの発現は全ての群においてストレス負荷によって有意に増加し、ストレス負荷後のNP mRNAの発現増加はGRまたはMR阻害剤によって抑制されなかった。(naïve: 0.33 ± 0.055 , $n = 9$, 0.64 ± 0.056 , $n = 4$, $P = 0.0032$; VHE: 0.25 ± 0.079 , $n = 6$, 0.61 ± 0.080 , $n = 6$, $P = 0.0088$; RU486: 0.28 ± 0.048 , $n = 6$, 0.78 ± 0.065 , $n = 8$, $P < 0.001$; RU318: 0.23 ± 0.071 , $n = 4$, 0.86 ± 0.012 , $n = 6$, $P = 0.0019$, no-stress vs. stress)
- C. ストレスセッション終了直後の各群における血漿中CORT濃度を測定した。ストレス負荷後のCORTレベルは全ての群において、con に比べて有意に増加した。また、ストレスセッション終了直後に見られた血漿中CORT濃度は全ての群間で有意な差は見られなかった。(naïve: 104.2 ± 37.6 , $n = 8$, 474.6 ± 54.5 , $n = 4$, $P = 0.0014$; VHE: 136.4 ± 35.1 , $n = 5$, 789.5 ± 35.1 , $n = 6$, $P = 0.02$; RU486: 98.1 ± 47.8 , $n = 3$, 474.7 ± 11.3 , $n = 8$, $P = 0.012$; RU318: 108.0 ± 19.5 , $n = 4$, 428.2 ± 24.2 , $n = 6$, $P < 0.001$, no-stress vs. stress)

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.001$; : no-stress; : stress; VHE: 溶媒; RU486: RU38486 (mifepristone), GR antagonist; RU318: RU28318, MR antagonist; naïve: 無処置。

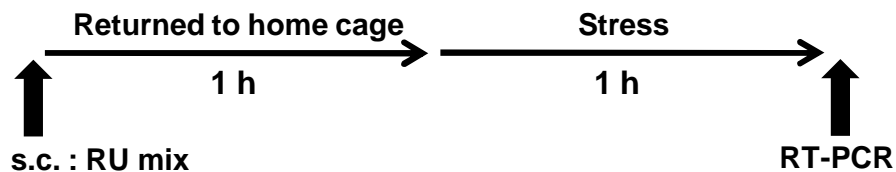
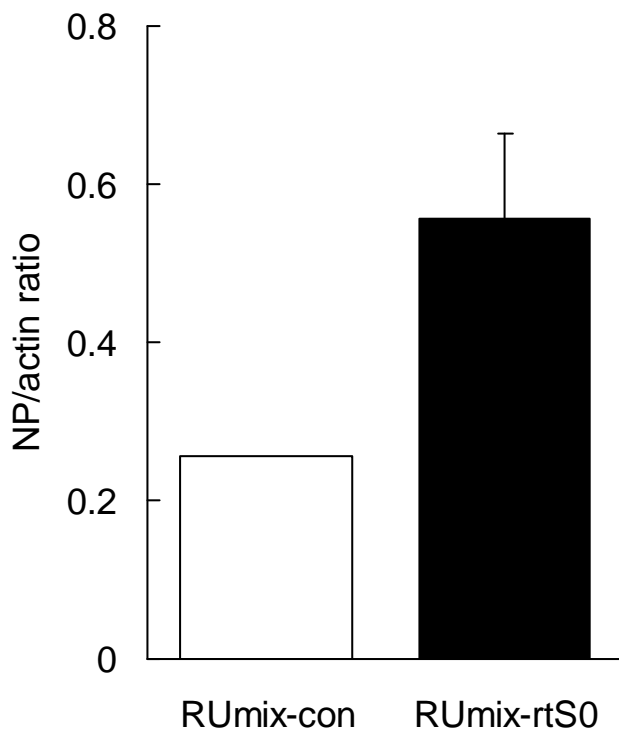
A**B**

図11. 急性ストレスによるNP mRNAの発現増加はGRまたはMRを介さずに誘導される。

- A. 実験のタイムスケジュール。マウスにRU486 (7.5 mg / kg B.W.) 及びR386 (50 mg / kg B.W.) の混合液を皮下投与し1時間後にストレス (1時間の拘束 + 尾部への電気刺激 : 1 mA for 1 sec; 60 sec apart) を与えた。ストレスセッション終了直後の海馬におけるNP mRNAの発現変化をRT-PCRにより検討した。
- B. ストレス負荷後の海馬・NP mRNAの発現増加はRU mixによって抑制されない傾向が見られた。(RUmix-con: AVE: 0.26, n=2; RUmix-rtS0: 0.56 ± 0.11, n = 3)

con: control; rtS0: ストレス負荷直後;

RUmix: RU486 (7.5 mg / kg B.W.) 及びR386 (50 mg / kg B.W.) の混合液;

RU486: RU38486 (mifepristone), GR antagonist; RU318: RU28318, MR antagonist

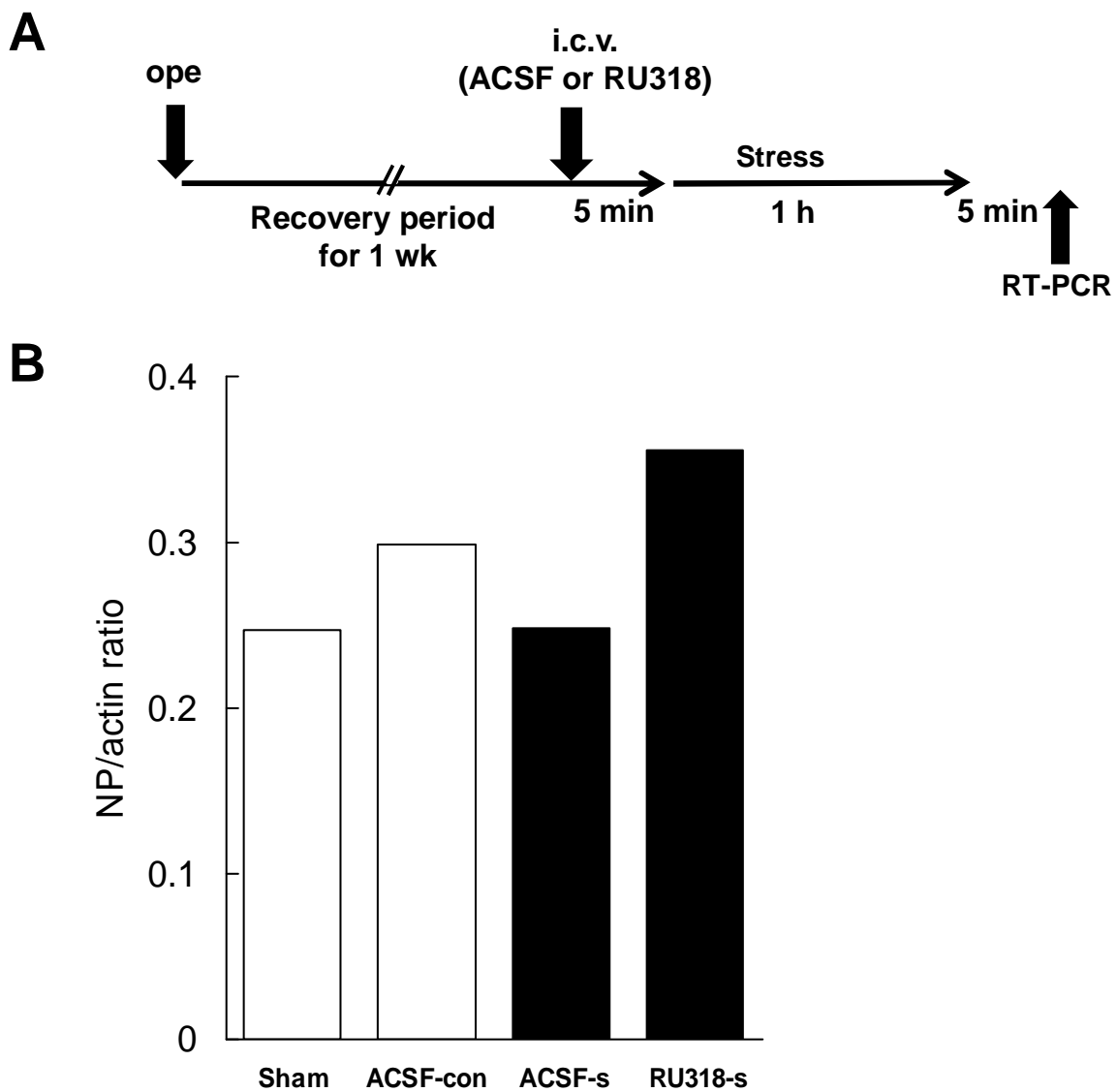


図12. 急性ストレスによるNP mRNAの発現増加はGRまたはMRを介さずに誘導される。

- A. 実験のタイムスケジュール。手術したマウスに1週間の回復期間を与えた後、ACSF (pH 7.2) に溶解したRU318を右側脳室内に投与した。投与量は $100 \text{ ng} / \mu\text{L}$ ($1 \mu\text{L} / \text{min}$)とした。投与から5分後にストレスを負荷し、(拘束 + 尾部への電気刺激: 1 mA for 1 sec ; 60 sec apart) セッション終了5分後に海馬におけるNP mRNAの発現変化をRT-PCRにより検討した。
- B. RT-PCRの結果を示す。(Sham群においてCORTレベルが増加していたため有益な比較検討は行えなかった) 全群: $n = 2$

Sham: 偽手術; ACSF: 人工脳脊髄液; i.c.v.: 側脳室内投与

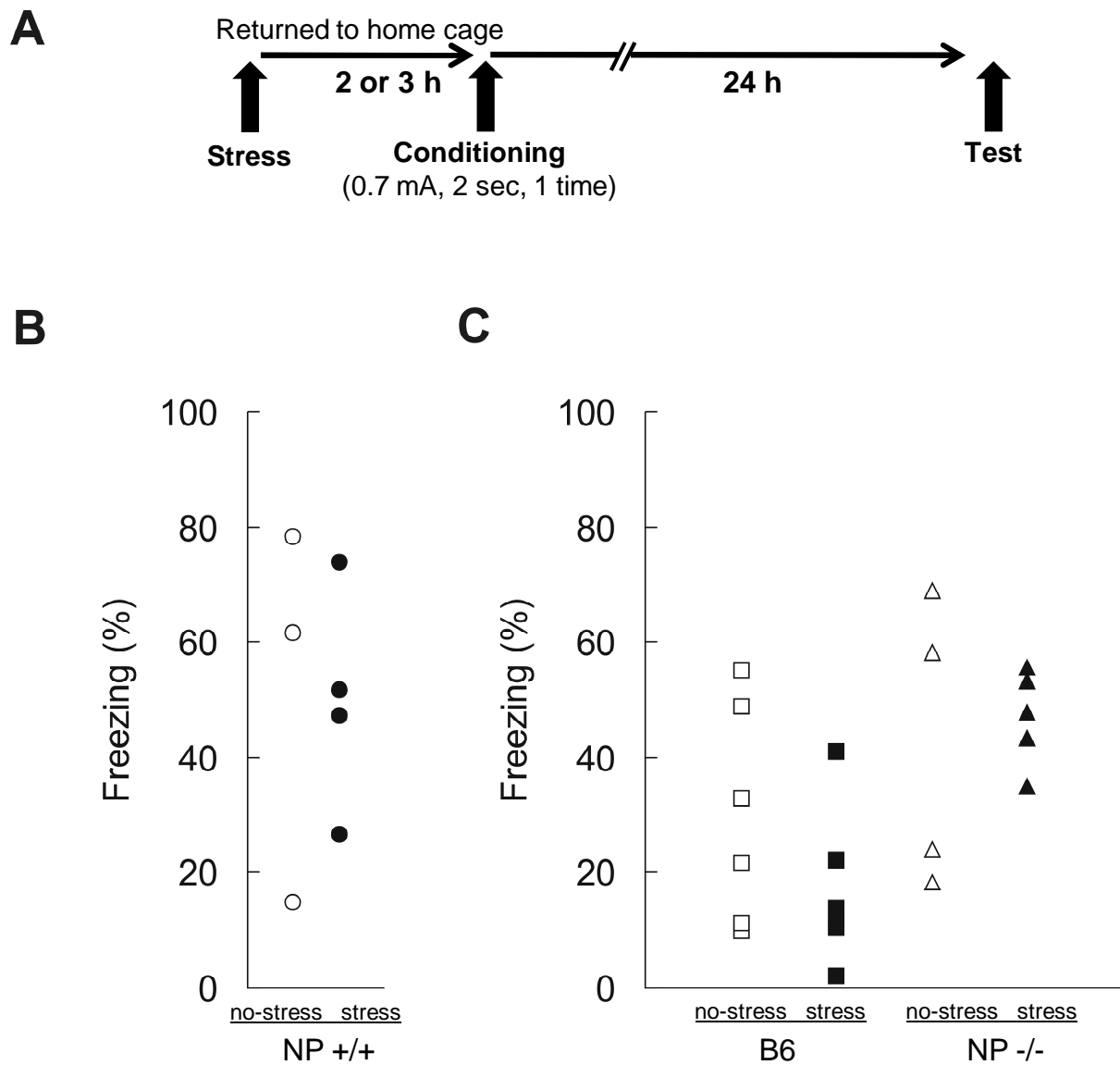


図13. 行動実験 (条件検討)

- A. 実験のタイムスケジュール。マウスにストレス(1時間の拘束)を与え、2又は3時間後に嫌悪刺激(条件づけfoot shock: 0.7 mA, 2 sec, 1回)を与え24時間後に不安行動: Freezing (%)を測定した。
- B. ストレス負荷2時間後に嫌悪刺激を与えた結果、NP+/+においてストレスによる不安行動の減少はなかった。
 (: 51.67 ± 18.95 , n = 3; : $49.87 \pm 9.67\%$, n = 4)
- C. ストレス負荷3時間後に嫌悪刺激を与えた結果、B6マウス及びNP-/-マウスにおけるストレスによる影響は認められなかった。
 (: 29.92 ± 7.78 , n = 6; : 16.85 ± 5.51 , n = 6; : 42.36 ± 12.5 , n = 4;
 : $47.0 \pm 3.68\%$, n = 5)

: no-stressed NP +/+; : stressed NP +/+; : no-stressed B6; : stressed B6
 : no-stressed NP -/-; : stressed NP -/-.

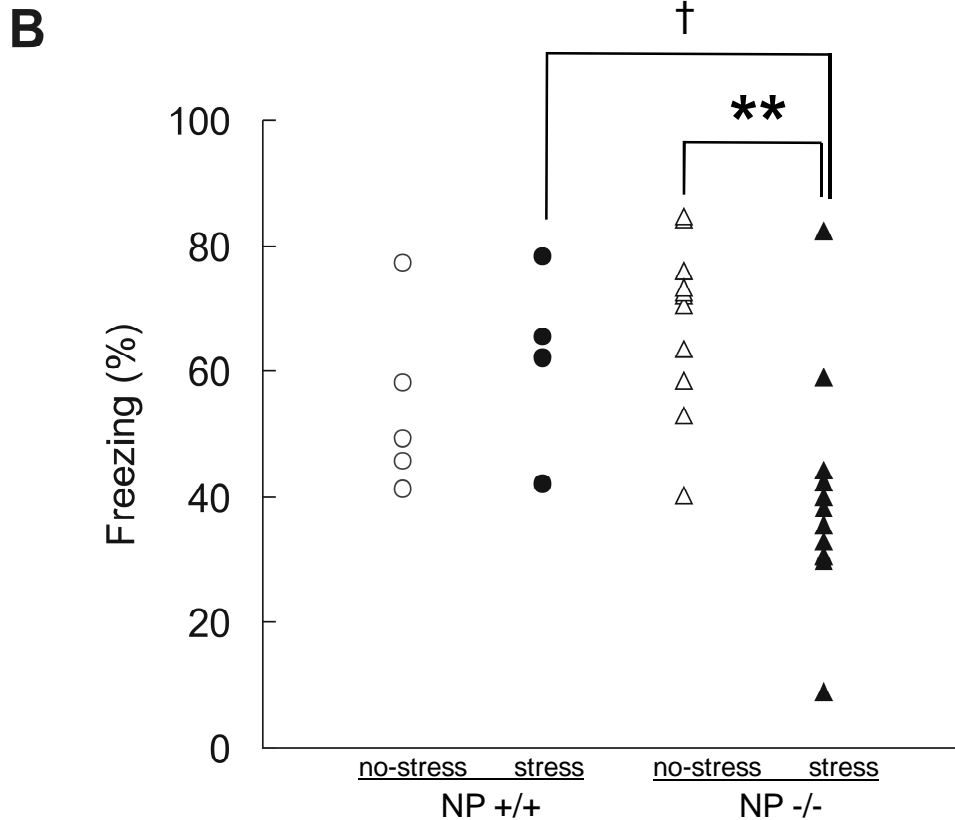
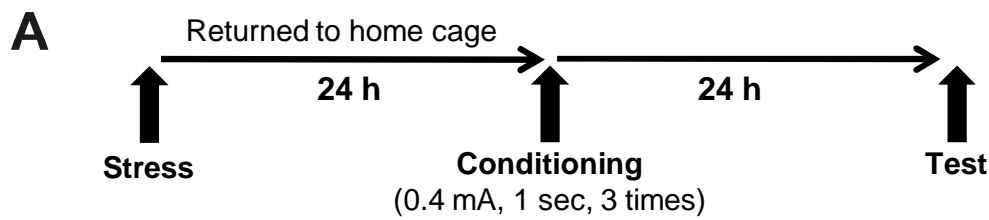


図14. ストレス負荷24時間後の恐怖条件づけ1) はNP-/-マウスにおいてのみ不安行動を減少させる。

A. 実験のタイムスケジュール。マウスにストレス（1時間の拘束）を与え、24時間後に嫌悪刺激（条件づけfoot shock：0.4 mA, 1 sec, 3回）を与え24時間後に不安行動: Freezing (%) を測定した。

B. NP +/+はストレスによる不安行動の減少は認められず、NP-/-マウスでのみストレス負荷後不安行動が著しく減少した。

(: 54.4 ± 6.38 , $n = 5$; : 62.05 ± 7.51 , $n = 4$; : 68.0 ± 4.03 , $n = 11$;
 : 30.3 ± 5.56 , $n = 11$, NP -/-: $P < 0.001$, no-stress vs. stress; stressed mice:
 $P = 0.056$, NP +/+ vs. NP -/-)

†: $P < 0.1$; **: $P < 0.001$; : no-stressed NP +/+; : stressed NP +/+;
 : no-stressed NP -/-; : stressed NP -/-.

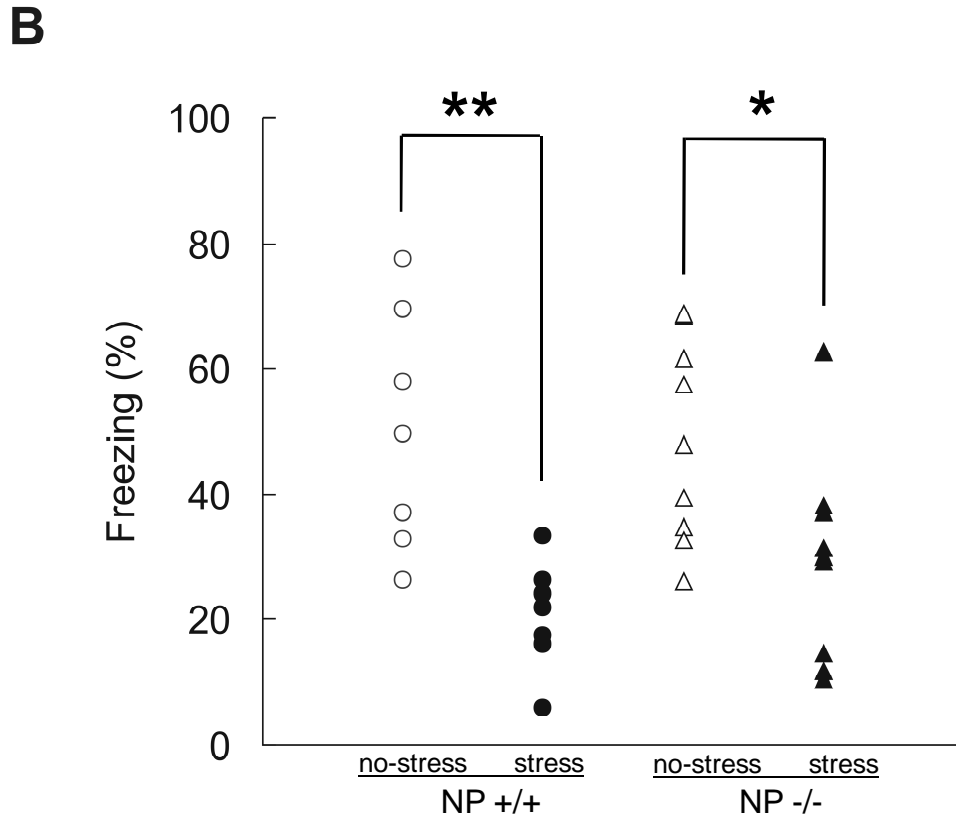
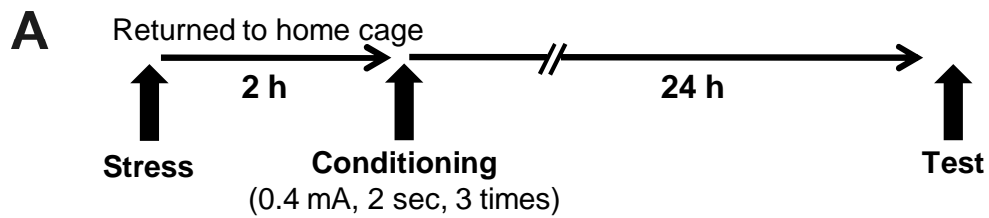


図15. ストレス負荷2時間後の恐怖条件づけ2)はNP +/+、NP -/-マウス共に不安行動を減少させる。

A. 実験のタイムスケジュール。マウスにストレス（1時間の拘束）を与え、2時間後に嫌悪刺激（条件づけfoot shock：0.4 mA, 2 sec, 3回）を与え24時間後に不安行動: Freezing (%) を測定した。

B. NP +/+、NP -/-マウス共にストレス負荷後の恐怖条件づけにおいて、不安行動が著しく減少した。

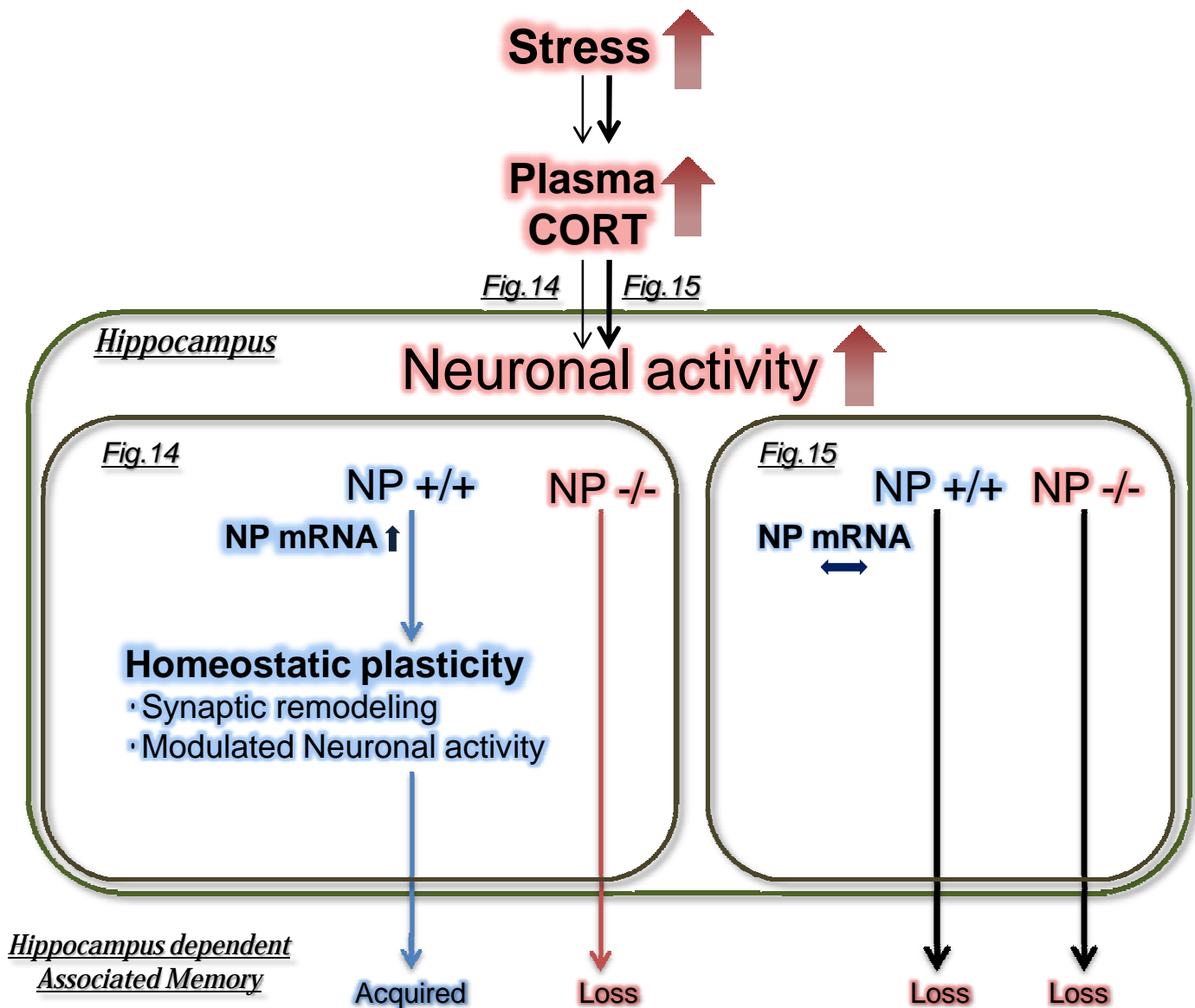
(: 50.15 ± 7.28, n=7; : 21.21 ± 3.07, n=8, NP +/+; $P < 0.001$;

: 48.48 ± 5.38, n=9; : 29.45 ± 5.45, n=9, NP -/-; $P = 0.042$,

no-stress vs. stress)

** : $P < 0.001$; * : $P < 0.05$; : no-stressed NP +/+; : stressed NP +/+;

: no-stressed NP -/-; : stressed NP -/-.



概念図

ストレス負荷によって血漿中CORT濃度が増加し、海馬内では様々な変化が引き起こされる。CORTやその他のストレス因子によって神経細胞の過活動状態により、シナプスレベルでの形態変化や記憶の生物モデルであるLTP誘導が抑制され学習記憶が障害される。

こうした現象は、LTP誘導や学習記憶に関わる分子が枯渇状態になるため、ストレス負荷後に学習記憶障害が引き起こされると考えられている(→)。

一方、神経ネットワークが過活動状態であるとき、恒常的可塑性(Homeostatic plasticity)と呼ばれる現象がネットワークの活動を抑え、恒常性を維持するために機能する。対処し得るストレスレベルであった場合、この機能によってストレス障害は起こらない(→)。

行動実験の結果からNP mRNAの発現レベルが十分高く対処し得るストレス環境においてNP-/-マウスはストレスによる関連記憶障害が認められた(→)。NPはL1などの神経接着分子をプロセッシングすることによりシナプスのリモデリングに関与し、神経活動の亢進を対処する役割を担う可能性が考えられる。つまりNPはストレスにより誘導された神経ネットワークの過活動状態をシナプス結合の切断によって調整し、ストレス後の過剰興奮を抑えることによりストレスに対処する能力をもたらししていると考えられる。