

ストレス耐性獲得の分子基盤に関する研究  
(要約版)

2023

安藤 千紘



# 目次

## 総論の部

緒言.....	1
略語一覧.....	2
第一章 うつ病態モデルマウスにおける TRPM2 欠損の保護的役割.....	3
1.1 TRPM2 欠損マウスにおける身体的特徴と行動量の評価	
1.2 TRPM2 欠損マウスにおける空間作業記憶の評価	
1.3 TRPM2 欠損マウスは逆転学習課題に対する柔軟性が低下する	
1.4 TRPM2 欠損マウスは CSDS に対する耐性が増加する	
1.5 考察	
第二章 背側縫線核セロトニン神経特異的な網羅的遺伝子解析による うつ病の分子メカニズム解明.....	13
結論.....	14
謝辞.....	15

## 実験の部

第一章 実験の部.....	16
引用文献.....	22

## 緒言

ストレスは、外界からの刺激によって生じる生理学的な反応であると定義される。生体はストレスに対し一定の適応能力を持つが、過度なストレス負荷の蓄積は疾患発症に繋がるということが報告されている。

こうしたストレス負荷がリスク因子となる疾患の一つとして、うつ病が挙げられる。うつ病は抑うつ気分や意欲の低下が続く精神疾患であり、患者数が多く重大な社会問題となっているにもかかわらず、その発症機序は未だ完全には明らかにされていない。仕事や対人関係などの過度な環境ストレスはうつ病発症の大きなリスク因子である一方で、適度なストレス負荷は脅威に対する適応を促進し、ストレス耐性を形成することが報告されている。また、一度うつ病を発症しても、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) などの抗うつ薬を用いた治療により、抵抗例もあるものの一部の患者ではストレス耐性が形成され、疾患の寛解に至る。こうした自然的、あるいは薬物的なストレス耐性形成メカニズムを解明することはうつ病の病態解明と新規治療薬開発の大きな糸口になると考えられる。そこで本研究では、遺伝子改変マウスを用いた行動学的解析および神経種特異的な網羅的遺伝子発現解析により、ストレス耐性獲得の背景にある分子学的メカニズムの解明を目指し、以下の新知見を得た。

第一章では、脳内にも高発現するカルシウム透過性非選択的カチオンチャネルである TRPM2 に着目し、包括的行動解析により、TRPM2 全身欠損マウスが行動柔軟性の低下と慢性社会的ストレス負荷に対する感受性の減少を見せることを明らかにした。

第二章では、うつ病態や抗うつ効果に重要な役割を果たすことが示唆されている背側縫線核 (DRN) セロトニン神経に着目し、神経特異的な網羅的遺伝子発現変動解析により、DRN セロトニン神経において S100a10 およびその下流分子である 5-HT<sub>1B</sub> 受容体の減少がストレス耐性形成促進に重要な役割を果たすこと、さらにこの時の S100a10 の持続的な発現減少は IL-4-STAT6 経路の一過性の活性化により引き起こされることを明らかにした。

これらの研究成果について、以下に論述する。

## 略語一覧

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

5-HT	5-hydroxytryptamine	RNA	ribonucleic acid
5-HT <sub>1B</sub> R	5-hydroxytryptamine 1B receptor	ROS	reactive oxygen species
ADPR	adenosine diphosphate ribose	SI	social interaction
ANOVA	analysis of variance	SNRI	serotonin noradrenaline reuptake inhibitor
CSDS	chronic social defeat stress	SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
DRN	dorsal raphe nucleus	STAT6	signal transducer and activator of transcription 6
EIA	enzyme immunoassay	TLR	toll like receptor
EPM	elevated plus maze test	TNF $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha
IL-4	interleukin-4	Tph2	tryptophan hydroxylase 2
KO	knockout	TRAP	translating ribosome affinity purification
LTD	long-term depression	TRPM2	transient receptor potential melastatin 2
LTP	long-term potentiation	TST	tail suspension test
mRNA	messenger RNA	VTA	ventral tegmental area
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide	WT	wildtype
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate		
NO	nitric oxide		
OFT	open field test		
PPI	prepulse inhibition		

# 第一章

## うつ病態モデルマウスにおける TRPM2 欠損の保護的役割

Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) は電位非依存性カルシウム透過性非選択的カチオンチャネルである TRP チャネルスーパーファミリーの一つであり、脳内や免疫細胞において高発現している。TRPM2 は ADP リボース (ADPR) や  $\text{NAD}^+$ 、サイクリック ADPR (cADPR) などの内因性メッセンジャーによって活性化される細胞内ドメインを有し<sup>1</sup>、 $\text{H}_2\text{O}_2$  などの活性酸素種 (ROS) のセンサーとして働くことが報告されている<sup>2</sup>。また、膵臓  $\beta$  細胞においては、 $35^\circ\text{C}$  以上の熱刺激や温熱条件下での cADPR によっても活性化されることが報告されている<sup>3</sup>。

末梢組織において、TRPM2 は膵臓  $\beta$  細胞からのインスリン分泌に重要な役割を果たし、その機能異常は血中グルコース濃度の増加を引き起こすとされるほか<sup>3,4</sup>、単球・マクロファージからのケモカイン産生や炎症部位における好中球の遊走にも関与することが報告されている<sup>5</sup>。一方、TRPM2 が初めてクローニングされたのは胎生期の脳からであり<sup>6</sup>、近年の TRPM2 と双極性障害との関連性を示す報告<sup>7,8</sup> などからも、中枢神経系における TRPM2 の役割が着目されはじめている。TRPM2 は中枢においてミクログリア<sup>9</sup> や皮質神経<sup>10</sup>、海馬神経<sup>11</sup>、ドパミン作動性神経<sup>12</sup> に発現している。さらに、海馬における長期抑制 (LTD) が TRPM2 欠損マウスでは障害されることが報告されており<sup>13</sup>、TRPM2 が記憶の維持に関与することが示唆されている。このように、中枢神経系における TRPM2 の機能について断片的な報告はあるものの、その詳細な役割については未だ明らかにされていない。

TRPM2 欠損マウスは生存・繁殖能力を含め、外見やその行動はおおむね野生型と差がないとされてきたが、その詳細な行動学的解析は未だ行われていないことから、本章では TRPM2 全身欠損マウスの網羅的行動解析を行い、TRPM2 が中枢神経系で果たす役割を明らかにすることを目指した。

## 1.1 TRPM2 欠損マウスにおける身体的特徴と行動量の評価

TRPM2 欠損マウスと野生型マウスについて、全身の行動学的解析を行ったところ、外見的特徴、体重、体温、握力、ぶら下がり力などの健康状態については両群間で有意な差は見られなかった (図 1-1A)。また、行動量の評価として新規環境でオープンフィールド試験を行ったところ、TRPM2 欠損マウスの総運動量、中心滞在時間、立ち上がり行動などはいずれも野生型と差はなかった (図 1-1B)。以上の結果から、TRPM2 の欠損は通常の状態と行動量には影響を与えないことが示唆された。さらに、明暗選択試験、ロータロッド試験、高架式十字迷路試験、社会的相互作用試験、プレパルス抑制試験、Y 迷路試験、強制水泳試験、尾懸垂試験のいずれにおいても野生型と欠損マウス間に有意な差はなかった (表 1-1)。

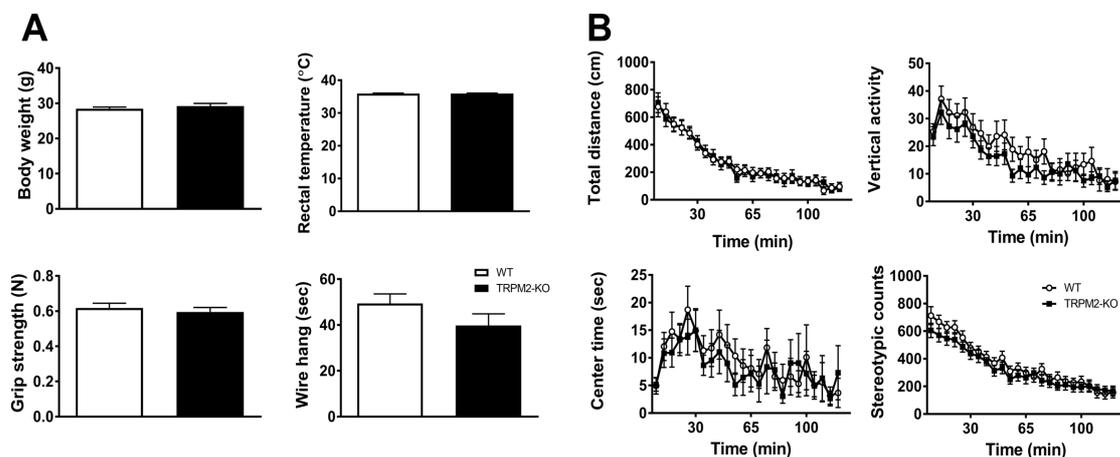


図 1-1 TRPM2 欠損マウスの身体的特徴と行動量の評価  
(A) TRPM2 欠損マウスと野生型マウスの体重 (左上)、直腸温 (右上)、握力 (左下)、ワイアハンク時間 (右下) の比較。  
n = 20.  
(B) オープンフィールド試験における総運動量 (左上)、立ち上がり行動 (右上)、中心滞在時間 (左下)、定型行動の回数 (右下)。n = 20.

## 1.2 TRPM2 欠損マウスにおける空間作業記憶の評価

空間作業記憶を評価するため、8 方向放射状迷路を用いた試験を行い、最初の 8 回の試行において異なるアームに侵入した回数、同じアームに侵入してしまったエラー回数、8 本すべてのアームに侵入するまでの時間を測定した (図 2-2A-C)。また、通常の学習試験を 16 回行ったのち、各アームに 30 秒、120 秒または 300 秒のいずれか閉じ込める遅延学習課題を行った (図 2-2D)。いずれの指標においても、学習や遅延時間中の行動に TRPM2 欠損マウスと野生型マウスの間に差は見られなかった。

表 1-1 各種行動試驗結果

行動試驗	野生型	TRPM2 欠損	<i>p</i> -value
Light-dark transition test (n = 20)			
Total distance in light (cm)	560.5 ± 46.0	578.4 ± 58.5	0.8115
Total distance in dark (cm)	1242 ± 57	1219 ± 67	0.7947
Stay time in light (sec)	175.4 ± 12.8	172.8 ± 16.2	0.9032
Transition (times)	24.75 ± 1.67	22.50 ± 1.95	0.3863
Latency to light (sec)	88.20 ± 13.83	75.90 ± 9.04	0.4612
Rotarod (n = 20)			
Latency to fall (sec)	167.7 ± 10.2	162.4 ± 12.6	0.7459
Elevated plus maze (n = 20)			
Number of entries (times)	29.9 ± 2.1	24.8 ± 2.7	0.1432
Entries into open arms (%)	11.75 ± 1.67	13.06 ± 2.24	0.6419
Total distance (cm)	1571 ± 92	1354 ± 95	0.1102
Time in open arms (sec)	2.1 ± 0.5	2.6 ± 1.1	0.6738
Social interaction (n = 10)			
Total duration of contact (s)	72.50 ± 6.15	68.62 ± 3.67	0.5948
Number of contacts (times)	61.60 ± 4.21	56.60 ± 3.12	0.3524
Total duration of active contacts (sec)	21.03 ± 1.60	19.15 ± 1.27	0.3699
Mean duration of contact (sec)	1.180 ± 0.070	1.240 ± 0.065	0.5375
Distance traveled (cm)	3605 ± 172	3402 ± 122	0.3495
Prepulse inhibition (TRPM2 <sup>-/-</sup> n = 17, wt n = 19)			
74-110 dB (%)	35.12 ± 7.26	35.39 ± 7.01	0.9794
78-110 dB (%)	53.95 ± 6.94	47.39 ± 6.50	0.4976
74-120 dB (%)	23.12 ± 5.83	26.27 ± 7.64	0.7423
78-120 dB (%)	36.39 ± 5.92	28.20 ± 8.30	0.4201
Y-maze (n = 20)			
Number of entries (times)	23.90 ± 1.61	24.70 ± 1.65	0.7305
Total alternations (times)	13.25 ± 0.92	14.65 ± 1.31	0.3870
Alternation (times)	64.11 ± 1.81	67.98 ± 2.91	0.2657
Total distance (cm)	2445 ± 159	2516 ± 157	0.7524
Number of choices (times)	20.95 ± 1.54	22.11 ± 1.71	0.6179
Porsolt forced swim test (n = 20)			
Immobility day 1 (%)	51.07 ± 2.33	49.50 ± 2.86	0.6719
Distance traveled on day 1 (cm)	762.2 ± 30.9	781.7 ± 47.7	0.7332
Immobility on day 2 (%)	61.67 ± 2.05	60.64 ± 2.35	0.7432
Distance traveled on day 2 (cm)	54.27 ± 2.96	52.73 ± 2.34	0.6854
Tail suspension test (TRPM2 <sup>-/-</sup> n = 15, wt n = 19)			
Immobility (sec)	130.0 ± 17.9	101.7 ± 28.4	0.3860

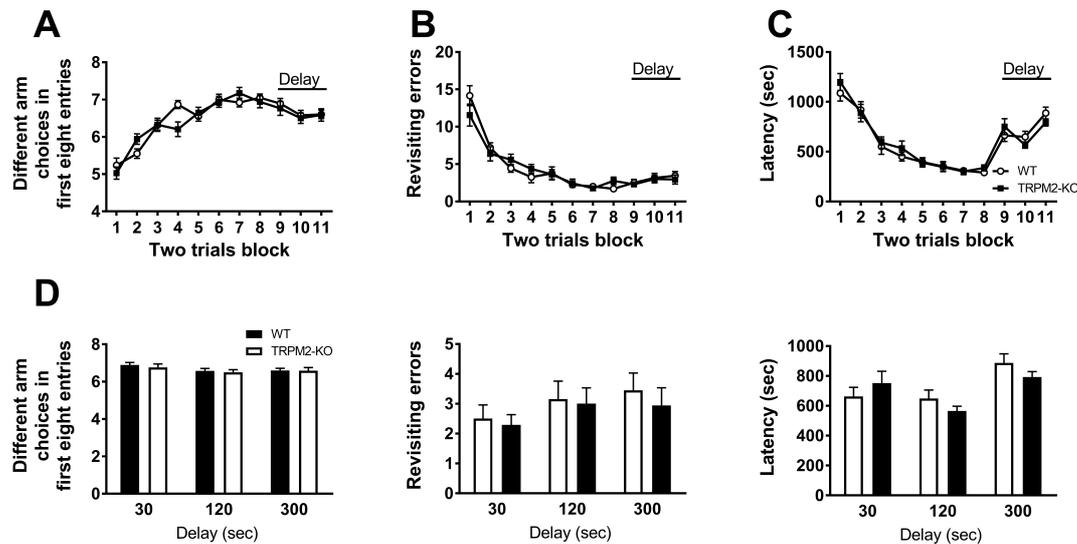


図 1-28 方向放射状迷路を用いた空間作業記憶の評価 (A) 最初の 8 回の試行で異なるアームを選んだ回数、(B) 同じアームに再訪した回数、(C) 8 本全てのアームに侵入するまでの潜時。全てのデータは 2 回の試験の平均で示した。(D) 遅延課題におけるマウスが最初の 8 回の試行で異なるアームを選んだ回数。なお、初めの 16 回の試験は非遅延課題 (ドアの開閉まで 5 秒間) を行い、その後 2 回ずつ 30, 60, 120 秒間の遅延課題を行った。n = 17 (TRPM2 KO)、19 (WT)。

### 1.3 TRPM2 欠損マウスは逆転学習課題に対する柔軟性が低下する

空間参照記憶の形成を評価するため、バーンズ円形迷路を用いて、総運動量、逃避ボックスにたどり着くまでの潜時、逃避ボックスにたどり着くまでに別の穴に到達したエラー回数を測定した (図 1-3A-F)。学習期 (試行 1-12 回目) において、逃避ボックスの位置を固定した条件下では TRPM2 欠損マウスと野生型マウスは同様に学習を成立させた。また、逃避ボックスの位置を覚えさせた後に逃避ボックスのない条件下で試験を行うプローブテストでは、学習の 24 時間後 (図 1-3D) および 1 週間後 (図 1-3E) のどちらでも群間に差はなかったことから、TRPM2 欠損マウスは逃避ボックスの場所を記憶すること、さらにその記憶を少なくとも 1 週間にわたり維持する能力を正常に有示ることが示唆された。

続いて、行動柔軟性について評価するため、同様のバーンズ迷路を用いた逆転学習課題を行った。20 回目の試験において、逃避ボックスをこれまでとは反対側の位置に設置したところ、TRPM2 欠損マウスは野生型マウスと比較して有意に前の逃避ボックスの位置に固執する傾向を見せたほか、新しい逃避ボックスにたどり着くまでのエラー回数、総運動量も有意に増加した。なお、続く 21 回目から 25 回目の試験ではこの差は消失したことから、TRPM2 欠損マウスは新たに逃避ボックスの位置を記憶する能力は維持していると考えられる。しかし、逃避ボックスの位置を変えた状態で 6 回試験を行った後に実施したプローブテストでは、TRPM2 欠損マウスが新しい逃避ボックスのあった場所に止まる時間は野生型よりも短い傾向にあった (図 1-3F)。さらに、新しい逃避ボックス位置の滞在時間と逆転前の逃避ボックス位置の滞在時間を比較すると、野生型

マウスでは新しい位置に有意に長く滞在していた一方で、TRPM2 欠損マウスでは有意差は見られなかった。

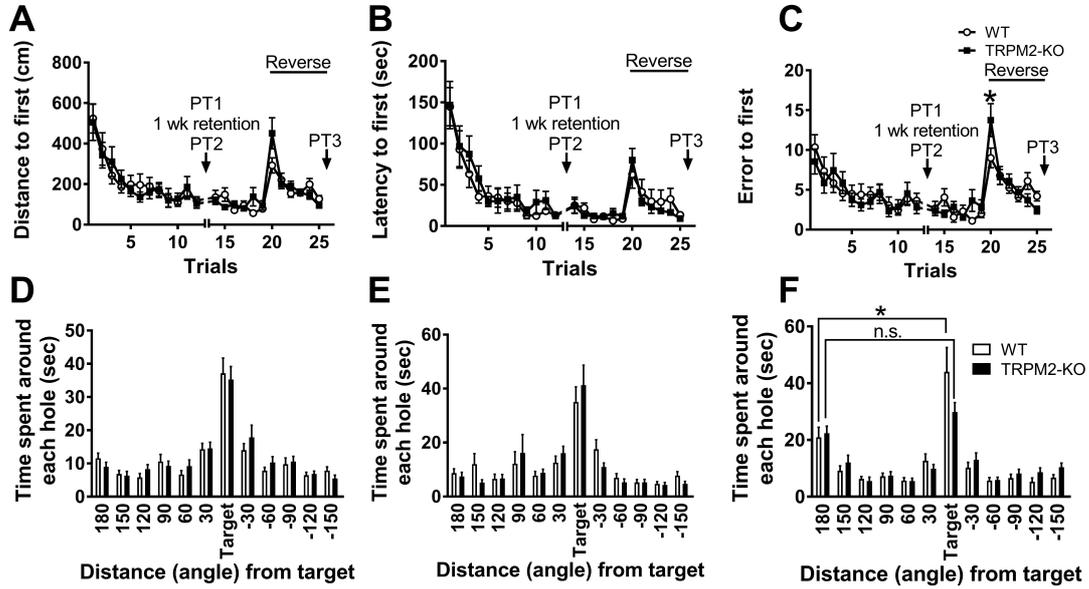


図 1-3 バーンズ円形迷路を用いた行動柔軟性の評価  
12 回のトレーニングの後に、プローブテスト (PT) を 2 回実施した。2 回のプローブテストの間隔は 1 週間とし、長期記憶を評価した。その後 20 から 25 回目の試験では逃避ボックスの位置を逆側に入れ替えた逆転学習課題を行った。  
(A) 総運動量、(B) 逃避ボックスにたどり着くまでの潜時、(C) 逃避ボックスにたどり着くまでのエラー回数、(D) 各プローブテストにおける各穴周辺の滞在時間。n = 20。統計的有意性は、two-way ANOVA と Bonferroni post-test を用いて評価した； \*p < 0.05。

次に、T 迷路を用いて、直前の試行で選択しなかった方のアームを選択した時のみ報酬が得られる強制交替試験を行ったところ、10 回正しいアーム選択をするまでにかかる時間と、正しいアーム選択をした割合は TRPM2 欠損マウスと野生型マウスで変化しなかった (図 1-4A,B)。次に、試行間の間隔を 10、30、60 秒に遅延させて課題の難易度を上げた条件下で試験を行ったところ、30 秒の遅延時間を導入した際に TRPM2 欠損マウスで正解アームを選択する割合が野生型と比較して有意に低下した (図 1-4C)。

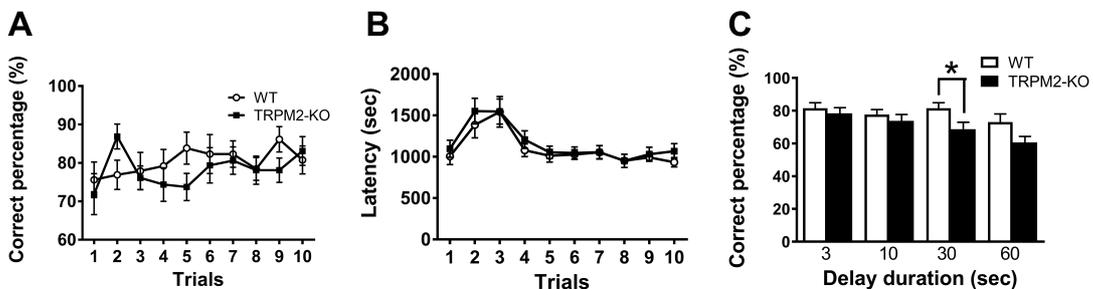


図 1-4 T 迷路強制交替試験を用いた行動柔軟性の評価  
非遅延課題における(A) 正しいアームを選択した割合、(B) 10 回の試行を完了させるまでの潜時。(C) 各遅延課題における正しいアームを選択した割合。n = 16 (TRPM2 KO)、13 (WT)。\*p < 0.05。

さらに、T 迷路を用いた異なる試験系である左右弁別試験では、正解アームをどちらか片方に固定して 10 回試験を行ったのち、正解アームを入れ替えて 8 回試験を行った。逆転前では、試行を重ねるごとに正解率が増加したが、逆転直後にはその正解率は著しく低下した (図 1-5A)。この正解率の推移に両群間で差は見られなかった。なお、1 回の試験は 10 回の試行よりなるが、その試験完了までにかかる時間には TRPM2 欠損マウス、野生型マウスとも同様のばらつきが見られた (図 1-5B)。これは、1 日に 3 回まで試験を行ったため、2 回目、3 回目は慣れにより試験遂行速度が早くなったからだと考えられる。

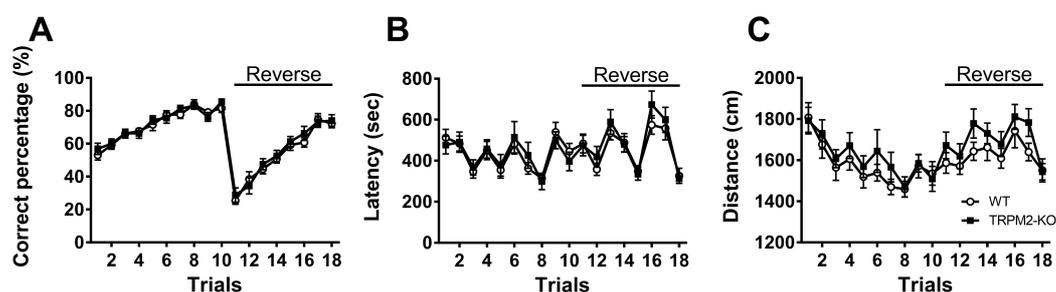


図 1-5 T 迷路左右弁別試験を用いた空間参照記憶の評価  
11 回目の試験から正解アームの左右を入れ替えて課題を行った。(A) 1 回の試験 (すなわち、10 回の試行) 中に正解のアームを選択した割合、(B) 試験終了までの潜時、(C) 試験における総運動量。n = 16 (TRPM2)、13 (WT)。

#### 1.4 TRPM2 欠損マウスは CSDS に対する耐性が增加する

TRPM2 欠損マウスのストレス耐性について検討するため、既報に基づき慢性社会的敗北ストレス負荷 (CSDS) を行った。10 日間のストレス負荷ののちに社会的相互作用試験 (SI test) を実施したところ、TRPM2 欠損マウスは野生型マウスと比較してターゲット存在下における Interaction zone 滞在時間が有意に長く (図 1-6A,B)、Avoidance zone 滞在時間が有意に短かった (図 1-6C)。さらに、ターゲット存在下と非存在下における Interaction zone 滞在時間の比である Interaction ratio についても、TRPM2 欠損マウスは有意に高い値を示した (図 1-6D)。慢性社会的ストレス負荷では、血中コルチコステロン濃度の増加や不安様行動の増加も誘発されることが報告されている<sup>14</sup>。そこでこれらについても検討したところ、CSDS 後の血中コルチコステロン濃度は野生型・TRPM2 欠損マウスともに無処置時と比較して大きく増加し、両群間に有意な差は見られなかった (図 1-6E)。ただ、two-way ANOVA による検定ではストレスの有無と遺伝子型の間には有意な交互作用が認められたことから、TRPM2 欠損マウスではコルチコステロン反応がわずかに減弱している可能性も示唆される。また、SI test を行ったものは別の群で CSDS 後に EPM を行い不安様行動の評価を行ったところ、こちらについても群間で有意な差は見られなかった (図 1-6F)。以上の結果から、TRPM2 欠損マウスは慢性的なストレス負荷に対する耐性が增加することが示唆された。

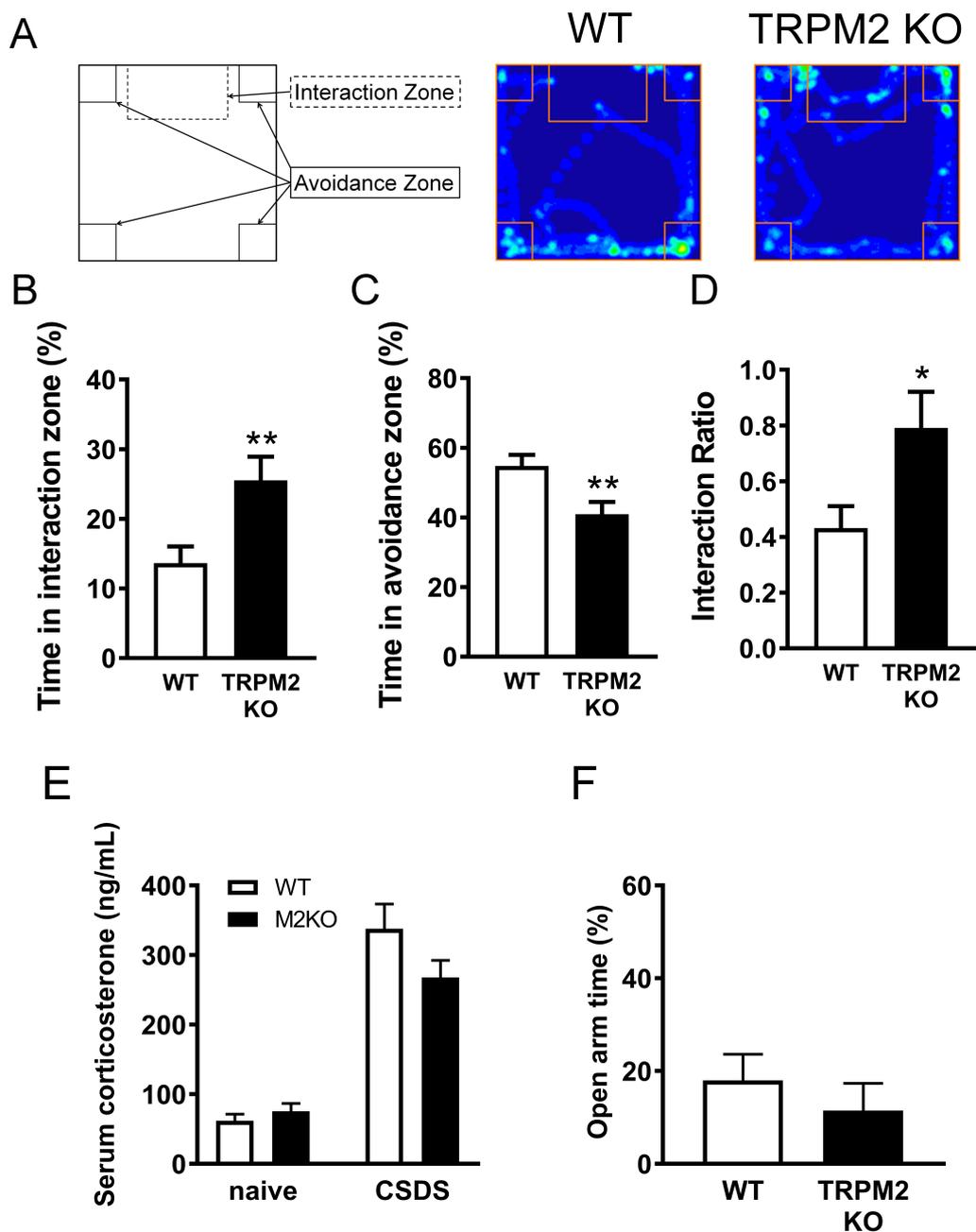


図 1-6 CSDS を用いた社会的忌避行動の評価

(A) チャンバー内のマウス移動を示した代表ヒートマップ、(B) ターゲット存在下の Interaction zone 滞在時間、(C) ターゲット存在下の Avoidance zone 滞在時間、(D) Interaction ratio. 野生型マウスと比較した統計的有意性は unpaired t-test により評価した; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .  $n = 28$ . (E) ナイーブまたは CSDS 後の EIA 血中コルチコステロン濃度.  $n = 12$  (WT-naïve)、6 (WT-CSDS)、9 (TRPM2 KO-naïve)、7 (TRPM2 KO-CSDS). (F) CSDS 後の EPM におけるオープンアーム滞在時間.  $n = 13$  (WT)、14 (TRPM2 KO).

## 1.5 考察

本章では、TRPM2 欠損マウスに対する網羅的な行動解析を行い、記憶やストレス耐性などの中枢機能を含む包括的な TRPM2 の役割について検討した。大多数の行動解析において大きな差は見られなかったものの、TRPM2 欠損マウスは行動柔軟性の低下と社会的ストレスに対する耐性の増加を見せることが明らかとなった。

8 方向放射状迷路試験では野生型マウスと比較してその成績に差が見られなかったこと、バーンズ迷路を用いた逆転前の試験および T 迷路左右弁別試験においても野生型と同様の能力を有したことから、TRPM2 欠損マウスの空間作業記憶、空間参照記憶は正常であることが示唆された。一方で、バーンズ迷路においてその逃避ボックスの位置を逆転させた場合には TRPM2 欠損マウスのエラー回数が有意に増加し、T 迷路強制交替試験において 30 秒間の試行間遅延を導入した場合にも TRPM2 欠損マウスの正解率が有意に低下したことから、TRPM2 欠損は行動柔軟性の低下につながるということが示唆された。しかし、バーンズ迷路における逆転後、繰り返し試験を行った場合に、TRPM2 欠損マウスで見られたエラー回数の増加は再び野生型と同程度まで低下したことから、この行動柔軟性の低下は比較的弱い効果量であると推察される。逆転学習を継続させることで TRPM2 欠損マウスと野生型マウスの差が消失したのと同様に、母子分離を受けたマウスを用いた近年の検討でも、逆転学習における成績が低下し、その後の学習継続により差が再び消失したことが報告されている<sup>15</sup>。この母子分離マウスでは海馬歯状回における神経減少がみられており<sup>15</sup>、他の既報でも海馬を傷害したラットは固執性行動を示すことが報告されている<sup>16</sup>。TRPM2 の海馬における機能的発現が複数の論文で明らかにされていることから<sup>11,17,18</sup>、逆転学習の障害や固執性には海馬の TRPM2 が関与する可能性が示唆される。また、行動柔軟性に関与する領域は海馬だけではなく<sup>19,20</sup>、新生児期にラットの内側前頭皮質を障害することで固執性が増加したという研究も報告されている<sup>21</sup>。ただし、このとき成体期に前頭皮質を障害しても固執性増加は見られなかったことが合わせて明らかとなっている。以上の報告と、TRPM2 は皮質神経に発現しているという既報<sup>10</sup>を踏まえると、本章で見られた TRPM2 欠損マウスの行動柔軟性の低下は発生期において皮質の TRPM2 が欠損していたことに由来する可能性も考えられる。

また、ドパミンも行動柔軟性に関与するとされる物質の一つである。ドパミン D1 受容体の刺激、D2/D3 受容体の欠損、および線条体におけるドパミン D2 受容体の過剰発現は全て行動柔軟性を低下させることが報告されている<sup>22-24</sup>。特に T 迷路を用いた試験では、D3 受容体欠損マウスは試行間に遅延を導入した課題においてのみ成績が低下することが明らかとなっている<sup>23</sup>。近年、ドパミン神経において TRPM2 様の電流が同定されている<sup>12,25</sup>。TRPM2 は非選択的カチオンチャネルであることから、TRPM2 の欠損はドパミンニューロンの活動減弱とそれに続くドパミン D3 受容体を介したシグナリングの低下を引き起こす可能性が考えられるが、この点についてはさらなる電気生理

学的・神経化学的検討が必要である。

また、今回の検討では、TRPM2 欠損マウスの成績はバーンズ迷路における逆転学習後には野生型と比較して有意に低下した一方で、T 迷路左右弁別試験では野生型と差は見られず、どちらも正解アーム逆転直後は 20%程度の正答率であった。逆転前の 7 から 10 回目の試験における正答率は 80%程度でプラトーに達していたことから、十分に学習した条件下では 20%程度は衝動性などの要因により誤答することが推察される。従って、逆転直後の 20%の正答率はこの衝動性による選択の影響を受けた最低値であると考えられ、これにより野生型マウスと TRPM2 欠損マウスの差がマスクされてしまった可能性も考えられる。

TRPM2 の活性化因子である  $H_2O_2$  についても、記憶との関連が示唆されている。海馬切片において、 $H_2O_2$  は新たな LTP 発生を抑制し、LTD を増強させることが報告されている<sup>26,27</sup>。LTD の増強はモリス水迷路を用いた逆転課題における成績改善につながるという報告<sup>28</sup>や、皮質特異的なカルシニューリン欠損マウスでは LTD の減弱とそれに伴うモリス水迷路試験、放射状迷路試験の成績低下が見られたという報告<sup>29</sup>から、LTD の増強は記憶能力の改善に寄与する可能性が示唆される。さらに、TRPM2 欠損マウスの海馬切片では LTD が障害されたという報告<sup>13</sup>もあることから、今回の TRPM2 欠損マウスにおける行動柔軟性の低下も LTD 異常を介するものである可能性が十分に考えられる。

また、本章のもう一つの知見として、CSDS 条件下において、TRPM2 欠損マウスの社会的ストレスに対する耐性が野生型と比較して増強することを明らかにし、この時 CSDS 後の血中コルチコステロン濃度が野生型と比較してやや低い傾向にあったこと、血中コルチコステロン濃度に対してストレスと遺伝子型に有意な相互作用があったことを見出した。うつ病の病態生理についても、 $H_2O_2$  などの酸化ストレスが重要な役割を果たすことがかねてより示唆されている<sup>30</sup>。近年、衣斐らにより、スーパーオキシドを生成する NADPH オキシダーゼの触媒サブユニットをコードするマウス *Nox1* 遺伝子の遺伝的欠失が CSDS に対する耐性を増強することが報告されたほか<sup>31</sup>、NADPH オキシダーゼの制御サブユニットをコードするマウス *p47phox* 遺伝子のヘテロ欠損が CSDS によって引き起こされる行動異常を寛解することが明らかとなっている<sup>32</sup>。上述の通り、スーパーオキシドの分解によって生じる  $H_2O_2$  によって TRPM2 は活性化することから、NADPH により引き起こされる酸化ストレスとそれに続く TRPM2 の活性化が CSDS における社会的忌避行動に関与する可能性が示唆される。さらに、CSDS は TLR2/4 を介して内側前頭皮質のミクログリアを活性化させることでうつ様症状を引き起こすことが明らかになっているが<sup>33</sup>、TRPM2 の欠損は慢性脳血流低下時においてミクログリアの活性を有意に減弱させ、結果として脳梁における TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインの産生を抑制すること<sup>34</sup>を考えると、TRPM2 の欠損はこうしたミクログリアにおける炎症応答を抑制することでストレス耐性の増加を引き起こしているのでは

ないかと推察される。

一方、筆者の報告<sup>35</sup>とほぼ同時期に、ストレスにより産生された ROS が TRPM2 を介して海馬における Cdk5 キナーゼの活性を変化させることで神経変性を引き起こし、うつ様症状を誘発することが報告されており<sup>36</sup>、TRPM2 は各脳領域において神経機能の調節にも重要な役割を持つことが示唆される。実際、ドパミン神経やセロトニン神経などのモノアミン神経も社会的敗北ストレスに対する感受性の制御に寄与することが複数の論文で示唆されており<sup>14,37-39</sup>、中でも TRPM2 の機能的発現が知られているドパミン神経<sup>12,25</sup>については、腹側被蓋野 (VTA) のドパミン神経の活動性が CSDS 後に増加していること<sup>14</sup>、この神経の光遺伝学的活性化は社会的ストレスに対する感受性の増強を引き起こすこと<sup>38</sup>が報告されていることから、TRPM2 欠損によるドパミン神経の活動抑制が今回の行動柔軟性の低下とストレス耐性増加の両方に関与している可能性が示唆される。今後はより詳細なメカニズムについて、生化学的・行動学的解析により明らかにしていくことが必要である。

本章の結果および過去の報告を加味すると、新規抗うつ薬として TRPM2 阻害薬が有用である可能性が考えられる。実際、ROS に感受性のある TRPV1 に対する阻害薬を投与することにより、マウスにおいて抗うつ薬様効果が引き起こされたことが最近報告されており<sup>40</sup>、TRP チャンネルを介した ROS シグナリングが抗うつ薬の新たな創薬ターゲットとなる可能性が示されている。また現在、TRPM2 選択的な阻害剤はほとんど開発されていないものの、炎症抑制を介して抗うつ薬様効果を示すとされるクルクミン<sup>41</sup>や、抗うつ薬として使用される SNRI であるデュロキセチンが TRPM2 阻害作用を併せ持つことが報告されており<sup>42,43</sup>、これらの作用機序に TRPM2 の抑制が重要な役割を果たしていることが示唆される。しかし、上述の通り TRPM2 は末梢・中枢にわたり豊富に存在しており、TRPM2 全身欠損はストレス耐性の増加だけでなく行動柔軟性の低下も引き起こしたほか、末梢においてもインスリン分泌などに対し重要な役割を持つことを考えると、まずはうつ様症状に関連する TRPM2 の局在とそのメカニズムを明らかにし、副作用と主作用を切り分けられる創薬に繋げていくことが必要である。

以上、本章で著者は TRPM2 欠損マウスを用いた包括的な行動解析を行い、多くの試験において野生型との差は見られないものの、バーンズ迷路を用いた逆転学習試験と T 迷路強制交替試験においては TRPM2 欠損により行動柔軟性が低下することと、CSDS においては TRPM2 欠損が社会的ストレスに対する耐性を増強させることを明らかにした。本知見は中枢神経系において豊富に発現する TRPM2 が、行動柔軟性の維持と社会的ストレスに対する感受性発現に対し重要な役割を担うことを示唆するものである。

## 第二章

### 背側縫線核セロトニン神経特異的な

### 網羅的遺伝子解析によるうつ病の分子メカニズム解明

大うつ病 (MDD) は世界で 3 億人以上が罹患し、重大な社会問題となっている疾患であり<sup>44,45</sup>、その発症の大きなリスク因子として、ストレス環境が挙げられる<sup>46</sup>。適切なストレス負荷は身体的・精神的脅威に対する適応を促進する働きを持つ一方で<sup>47</sup>、長期的で過剰なストレス負荷は脳機能の異常と MDD の発症につながることを報告されているが<sup>48</sup>、このストレス適応の分子メカニズムは未だ完全に解明されていない。

最大のセロトニン神経核である背側縫線核 (DRN) を起点としたセロトニン神経回路は、内側前頭皮質や腹側被蓋野など、ストレス耐性の維持や増減に関与するとされる多くの脳領域と相互に接続している<sup>49-53</sup>。また、DRN セロトニン神経の活動性は慢性的なストレス負荷によって減弱し、反対に抗うつ薬の慢性投与によって増強することが報告されているほか<sup>37,54-58</sup>、光遺伝学によるこの神経の活性化と抑制がそれぞれストレス耐性の強化と減弱につながることも報告されている<sup>59,60</sup>。以上から、DRN セロトニン神経の活動変化がストレス耐性の形成に重要な役割を担うことが強力に示唆されるものの、この慢性的な神経活動変化の背景にある分子メカニズムについては未だほとんど明らかとなっていない。

そこで本章では、自発的なストレス耐性形成モデルとして慢性社会的ストレス負荷後にうつ様症状を示さない抵抗性マウスを、抗うつ薬誘発性ストレス耐性形成モデルとして選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の慢性投与マウスを用い、それぞれストレス感受性群、無処置群と比較した際の DRN セロトニン神経における遺伝子発現変動およびヒストン修飾変動を網羅的かつ神経種特異的に解析した。その結果、両ストレス耐性形成モデルでともに S100a10 の発現が低下しており、この遺伝子とその下流分子である 5-HT<sub>1B</sub> 受容体の発現低下がともに抗うつ薬様効果につながることを見出した。さらに、S100a10 の発現低下は 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) のサイトカインシグナルである IL-4-STAT6 経路<sup>61-64</sup>の一過性の活性化により引き起こされること、ストレス耐性モデルでは S100a10 のプロモーター領域の H3K27ac の減少などを含むエピジェネティック修飾の変化が起こっていることも明らかとなった。本研究の知見は、DRN セロトニン神経のエピゲノム・トランスクリプトームのダイナミックな変化が自然発生的なストレスへの適応と抗うつ薬治療によるストレス耐性形成の両方に対し大きく寄与していることを示したほか、IL-4-STAT6 シグナリングがストレス耐性の獲得に重要な役割を果たすことを初めて実証したものである。

## 結論

本研究においては、ストレス耐性獲得の分子基盤に関して検討を行い、以下の知見を得た。

### 第一章

- ・TRPM2 欠損マウスは、身体的特長および基本的な運動能力については野生型と差は見られなかった。
  - ・TRPM2 欠損マウスでは、逆転学習課題における行動柔軟性が低下した。
  - ・TRPM2 欠損マウスでは、CSDS 時における社会的忌避行動が減少した。
- これらの結果は、TRPM2 が中枢において行動柔軟性の維持とストレス感受性増大に関与することを示唆するものである。

### 第二章

- ・TRAP 法により、DRN セロトニン神経の mRNA を単離した。
  - ・SSRI 投与群と CSDS 感受性群では多くのパスウェイで反対の活性化状態を示した。
  - ・遺伝子発現変動解析から、S100a10 がうつ様症状を促進する遺伝子である可能性が示された。
  - ・行動解析より、S100a10 とその下流分子である 5-HT<sub>1B</sub> 受容体がストレス耐性形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。
  - ・IL4-STAT6 経路の一過性の活性化が S100a10 の発現減少と抗うつ薬様効果を引き起こすことを明らかにした。
  - ・特に H3K27ac の修飾変化が STAT6 による S100a10 の発現制御に関わる可能性が示唆された。
- これらの結果は、抗うつ薬様効果とうつ病態の発現における DRN セロトニン神経の役割を分子学的に解明したものである。

以上、著者は包括的な行動学的解析により、TRPM2 が行動柔軟性とストレス感受性増大に関与することを見出した。また、DRN セロトニン神経選択的な網羅的遺伝子発現およびエピゲノム解析により、ストレス耐性獲得の分子メカニズムの一端を明らかにした。本研究成果は、うつ病の病態解明とそれに基づく新規抗うつ薬開発に資する知見となると考えられる。

## 謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科名誉教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、助教 永安一樹 先生に謹んで感謝の意を表します。

研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言を頂きました金沢大学医薬保健研究域助教 西谷直也 先生、木ノ下晴子 学士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。また、本研究の遂行に多大なる御協力を頂きました大谷鈴華 学士、野口拓馬 学士、福井悠斗 博士、萩原雅子 学士を始めとして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました日本学術振興会、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金および藤多仁生奨学金に深く感謝いたします。

最後に、同じ研究者として切磋琢磨し、本研究の解析にあたって数多くの助言を頂いただけでなく、私生活でも長きにわたって支えてくださりました西田紘士 博士と、著者の良き理解者であり、研究活動に専念できるよう終始支えてくださりました母 綾子、祖父 淳、祖母 圭永子に心からの感謝をいたします。

# 実験の部

## 第一章 実験の部

### 使用動物

実験に際し、ホモ接合 TRPM2 欠損マウス<sup>5</sup>と C57BL/6 (Japan SLC) を 6 度にわたり戻し交配した。慢性社会的敗北負荷 (CSDS) を除くすべての実験ではヘテロ接合マウスの親から生まれた同腹の TRPM2 欠損マウスと野生型マウスを用いた。実験はすべて 8 週齢以上の成体を用い、午前 9 時から午後 5 時の間に行った。全てのマウスは室温  $22 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクルの条件下で飼育され、餌および水は自由に摂取させた。全ての動物は京都大学動物実験委員会の倫理ガイドラインに沿って扱った。全ての実験プロトコルは京都大学動物実験委員会の許可を得て行われた。

### 一般行動解析

TRPM2 欠損マウスと野生型マウスの身体的特徴を比較するため、既報と同様の神経学的スクリーニング<sup>65</sup>を行った。すなわち、立ち直り反射行動、ひげ刺激への反応、耳収縮反射の評価と体重、体温、頬ひげの有無、脱毛の有無の記録をおこなった。神経筋の強さは握力測定試験とワイアハングテストにより評価した。握力測定試験には握力計 (O'Hara & Co.) を用い、まず尻尾を掴んで持ち上げることでマウスが前肢でグリッパを握るようにしたのち、ゆっくりとマウスを机の上を下ろし、マウスが自然に前肢を離すようにした。一連の動作中最も強く測定された力を握力としてニュートンで表した。各マウスにつき 3 回ずつ測定を行い、最も大きい値を統計に使用した。ワイアハングテストでは、マウスを金網の上に置いたのちにひっくり返してマウスがぶら下がるようにし、落ちるまでの時間を最大 60 秒として測定した。

### 明暗選択試験

試験には照度 390 lux の明箱と照度 2 lux の暗箱が扉で区切られたチャンバー (21 × 42 × 25 cm、各箱は同じ大きさ) を用いた。マウスは最初に暗箱に入れ、二つの箱を 10 分間自由に行き来させた。試験時間内の箱間の移動回数、各箱における滞在時間、明箱に最初に入るまでの潜時、移動総距離を Image LD ソフトウェアを用いて自動記録、解析した (詳細は画像解析の項参照)。

### 高架式十字迷路試験 (EPM)

25 × 5 cm のオープンアームとクローズドアーム各 2 本からなる十字迷路 (O'Hara & Co.) を使用した。クローズドアームの壁は高さ 15 cm であり、迷路自体は床から 55 cm の高さであった。マウスが迷路から落ちるのを防ぐため、オープンアームにも 3 mm

の縁をつけた。また、オープンアーム同士、クローズドアーム同士がそれぞれ対角になるようにした。迷路の中心が 100 lux になる光条件下で実験を行った。各マウスはまず迷路の中心 (5×5 cm) に、顔がクローズドアームを向くように置き、10 分間の各アームへの侵入回数、滞在時間を記録した。データ解析には、総移動距離、両アームへの総侵入回数、両アームへの侵入回数のうちオープンアームに侵入した割合、オープンアーム滞在時間を用いた。これらの値は Image EP ソフトウェアを用いて自動記録、解析した (詳細は画像解析の項参照)。

#### 新規環境における社会的相互作用試験

元々異なるケージで飼育していた同じ遺伝子型のマウス 2 匹を 1 つのチャンバー (40 × 40 × 30 cm) に入れ、10 分間自由行動させた。Mac コンピュータに接続した CCD カメラにより行動を自動記録し、マウス同士の相互作用回数、相互作用の平均時間、総移動距離を Image SI ソフトウェアにより解析した (詳細は画像解析の項参照)。なお、1 秒間に 3 フレームで撮影した画像について、2 フレーム間の移動距離を各マウスについて計算し、2 匹のマウスが接触し、どちらかのマウスの移動距離が 3 cm 以上であった場合を有効な相互作用と定義した。

#### ロータロッド試験

運動機能と平衡感覚はロータロッド試験により評価した。試験には加速式ロータロッド (UGO Basile Accelerating Rotarod) を用い、直径 3 cm の回転台にマウスをおいて平衡を保った時間を測定した。回転速度は 5 分間にわたり 4 rpm から 40 rpm に増加させた。

#### オープンフィールド試験 (OFT)

行動量の評価として OFT を行った。各マウスをチャンバー (40 × 40 × 30 cm; Accuscan Instruments) の中心に置き、総移動距離、立ち上がり回数、チャンバー中心の滞在時間、定型行動の指標として光子ビームを横切った回数、糞便量を 120 分間にわたり計測した。

#### ポーソルト強制水泳試験

試験には直径 10 cm、高さ 20 cm の 4 つのシリンダーを使用した。各シリンダーには室温の水を高さ 7.5 cm になるように注いだ。マウスをシリンダーに入れ、その後 10 分間の行動を 1 秒毎の画像フレームとして記録した。フレームごとにマウスが動いている範囲 (ピクセル) を手動で数え、40 ピクセル未満であった場合を無動であると分別した。ただし、無動時間の持続が 2 秒以下であった場合は解析から除外した。マウスの移動距離は Image OF ソフトウェアにより解析した (詳細は画像解析の項参照)。

### プレパルス抑制試験

驚愕反射測定システム(O'Hara & Co.)を用いて、大音量刺激による驚愕反応のプレパルス抑制 (PPI) を測定した。マウスを加速度計付きの台に設置したプラスチック製シリンドー内に入れ、10 分間慣らした後、2 種類の驚愕刺激のみの試行または 4 種類の PPI 試行を行った。すべての試行で、110 dB または 120 dB のホワイトノイズ (40 ミリ秒) を驚愕刺激として用いた。プレパルス刺激は、74 dB または 78 dB (20 ミリ秒) の強度で驚愕刺激の開始 100 ミリ秒前に提示した。プレパルス刺激と驚愕刺激の組み合わせは 74-110 dB、78-110 dB、74-120 dB、78-120 dB の 4 通りで行った。6 種類の試行は 6 ブロックの間で 1 回ずつ行われるように、擬似ランダムな順序で行った。平均試行間隔は 15 秒 (範囲 : 10-20 秒) とした。驚愕反応は驚愕刺激の開始から 400 ミリ秒の間記録し、驚愕反応振幅のピークを従属変数として用いた。全セッションを通して、バックグラウンドノイズレベルは 70dB であった。PPI (%) は以下の式に従って各マウスについて算出した :  $PPI (\%) = 100 \times [1 - (\text{プレパルス} + \text{驚愕試行における驚愕反応振幅}) / (\text{驚愕刺激単独試行における驚愕反応振幅})]$ 。

### Y 迷路試験

アーム長 40 cm、アーム下幅 3 cm、アーム上幅 10 cm、壁の高さ 12 cm の Y 迷路を用いて探索行動を評価した。各マウスは迷路の中心に置き、10 分間の行動を記録して各アームへの侵入順を測定した。得られたデータは Image EP プログラムを一部改変して解析した。

### バーンズ迷路試験

空間学習、参照記憶はバーンズ迷路試験にて評価した。試験には直径 1 m の白い円盤のへりに均等に 12 個の穴が空いた迷路 (O'Hara & Co.) を使用した。迷路は地上 75 cm の高さに設置し、12 個の穴のうち 1 つの下には床敷を敷いた黒い逃避ボックス (17 × 13 × 7 cm) を設置した。逃避用ボックスの位置はマウスごとにランダムに割り振った。トレーニング中は、迷路内の嗅覚的または近縁の手がかりに基づくバイアスを防ぐため、視覚的な部屋の手がかりに対しては空間的位置関係が同じになるようにしながら迷路を毎日回転させた。最後のトレーニングの 1 日後 (すなわち 12 回目の試行) に、プローブテストとして空間記憶の獲得を確認するため、逃避ボックスなしでプローブ試行を実施した。ボックスがあった穴に到達するまでの待ち時間、距離、エラー回数、各穴の周囲に滞在した時間を Image BM ソフトウェアで解析した (詳細は画像解析の項参照)。プローブテストの直後に 1 回のトレーニングを実施した。さらに、最後のトレーニングの 1 週間後に、記憶保持の評価として追加のプローブテストを実施し、逃避ボックスのあった穴に到達するまでの待ち時間と各穴の周囲に滞在した時間を自動記録した。記憶保持試験から 1 週間後、逃避ボックスを元の位置とは逆方向にある新しい穴

に移動させた（反転学習）。その後、マウスは上記と同じ手順で5回のトレーニングを行い、新しい逃避穴の位置を確認した。最後の訓練（すなわち、25回目の試行）から1日後、プローブテストにより逆転学習記憶を評価した。

## 8 方向放射状迷路試験

試験には白い床と16 cmの透明な壁からなる8方向放射状迷路を使用した。各アーム（9×3×50 cm）は迷路中心（周囲長12×3×8 cm）から8方向に放射状に伸びており、各アームへの行き来は開閉式のドアにより制御できるようにした。アーム先端にはそれぞれ同一のセンサー付き餌穴（直径1.4 cm、深さ1.4 cm）を備え付け、センサーによりマウスが餌を摂取したかどうかを自動で記録した。迷路は床から35 cmの高さにし、いくつか迷路外の手がかりがある薄暗い部屋に置いた。また実験中、迷路の向きは一定に保った。マウスは元の80–85%の体重になるよう摂食制限してから検討に用いた。プレトレーニングとして、まず迷路全体に餌を置いた状態でマウスを迷路の中心に置き、5分間自由探索させて迷路内で餌を摂取することを学習させた。次に各アームの先端にマウスを置き、そこにある餌を摂取することを学習させた（このトレーニングはマウスごとにすべてのアームについて計8回行った）。プレトレーニング終了後、実際のトライアルをおこなった。8つのアーム全てに餌を準備した状態でマウスを迷路中心に置いて試験を開始し、15分以内にすべての餌を獲得できるかを調べた。試験はマウスが8つの餌をすべて獲得した時点、あるいは15分経過した時点で終了とした。マウスがアーム中心から0.5 cm移動した場合にアームへ移動したと定義した。また、マウスが1つのアームを選択した後は、5秒間アーム中心から出られないようにした。各トライアルにおいて、選択したアーム、すべての餌を獲得するまでの時間、総移動距離、初めの8回の選択において異なるアームを選んだ回数、アームを再選択した回数、時間内に選択できなかった回数を自動計測した。17回目のトライアルでは、4つ餌を獲得した後に30秒間マウスをアーム中心から出られないようにし、遅延時間を設けた。19回目から20回目のトライアルではこの遅延時間を2分間に、21回目から22回目のトライアルでは5分間に延長して試験を行った。各トライアル後に、迷路は水で洗浄した。アームの位置はランダムに変化させ、マウスが迷路内の手がかりを利用してトライアルを行うことを防いだ。データの記録・解析およびドア開閉の制御はImage RMソフトウェアにより行った（詳細は画像解析の項参照）。

## 尾懸垂試験 (TST)

マウスは他のものが視界に入らない条件下で尻尾の先1 cmほどにテープを巻いて地上30 cmの高さに吊り下げ、10分間の行動を記録した。Image TSソフトウェアを用いて記録、解析を行い、ポーソルト強制水泳試験時と同様の手法で無動時間を算出した。

## T 迷路試験

T 迷路を用いた試験は既報に従い行った<sup>66</sup>。迷路は高さ 25cm の白いプラスチック製で、自動スライドドアにより左右のアーム (11.5 × 20.5 cm) と幹部分 (13 × 24 cm) のエリアに仕切られる構造とした。両アームの端には餌ディスペンサーを設置し、センサーによりマウスの餌摂食を自動で記録した。マウスはアームを選択した後、開始地点、すなわち T 字迷路の幹に戻るができるようにした。また、T 字迷路の周囲には様々な迷路外手がかりを設置した。マウスは 8 方向放射状迷路試験と同様に摂食制限したのち、3 日間のトレーニングを行った。トレーニングでは両アームに餌を置いた状態で 10 分間マウスに迷路を探索させ、環境への馴化と報酬獲得の学習を行った。つづいての試験では、まず sample 試行として、左右のアーム両方に餌を用意するが、片方のアーム前に仕切りを設置することでマウスが片方のアームにしか進めないようにし、そのアームにて 20 秒間餌を摂取させたのち開始位置(幹)に戻した。その後、choice 試行として、仕切りを取り外して両アームに進める条件下で再びマウスを探索させ、先ほどの sample 試行と逆のアームに辿り着いた時のみ報酬が得られるようにした。sample 試行において進めるアームの左右は、全体を通じて同じ回数になるように、かつ 3 回以上同じ位置が続かないように偽ランダムに決定した。この検討では 10 試行を 1 セットとした。また、作業記憶の難易度を上げるため、sample 試行と choice 試行間のインターバルは 10、30、60 秒に設定した。次に、既報に基づき T 迷路を用いた左右弁別試験を行った<sup>67</sup>。この試験では、アームのうち片方のみを正解として餌を準備した T 迷路の幹部分にマウスを置き、左右のアームを自由に選択させる試行を 10 回行ったあと、正解アームの左右を入れ替えて逆転学習を評価した。

## 慢性社会的敗北ストレス負荷 (CSDS)

CSDS および社会的相互作用試験 (SI test) は既報に従い実施した<sup>68</sup>。攻撃に用いた ICR マウスは、実験使用前にナイーブの C57BL/6J マウスに対する攻撃潜時・攻撃回数を測定し、基準を通過したもの (3 分間で 2 回以上攻撃し、最初の攻撃は開始 30 秒以内に行うという 2 つの基準を 2 日連続で満たしたもの) のみ以降の検討に使用した。CSDS 開始 1 週間前から 7 週齢のホモ接合 TRPM2 欠損マウス (C57BL/6 と 10 回戻し交配したもの) と野生型マウスを単頭飼育にした。CSDS では、ICR マウスのホームケージに 5 分間入れて物理的に攻撃させる社会的負荷を 10 日間継続した。負荷をかける時間は全て明期 (8 時~20 時) の間でランダムに行った。負荷後のマウスは翌日の負荷まで再びホームケージ中に待機させた。攻撃する ICR マウスは毎日異なる個体になるように実験を行った。SI test は CSDS 負荷最終日の翌日に実施した。試験は赤色灯下で行い、開始 30 分前よりマウスを実験環境に慣らしてから開始した。具体的には、まずマウスを空のメッシュケージ (10 × 6.5 cm) を置いたオープンフィールドチャンバー (50 × 50 × 50 cm) に 150 秒間滞在させたのち、攻撃に用いなかった ICR を入れた

メッシュケージを空のものに入れ替えて再び 150 秒間滞在させた。マウスの行動はビデオで記録し、ANY-MAZE tracking software (Version 4.99、Stoelting) により解析した。この際、チャンバーの四隅 (9×9 cm) を Avoidance zone、メッシュケージの周辺 (14×24 cm) を Interaction zone とし、各ゾーンの滞在時間を測定した。ICR 存在時と非存在時の Interaction zone 滞在時間の比を interaction ratio とし、この値が 1 以上のものを耐性群、1 未満のものを感受性群と定義した。ICR 存在時の Interaction zone、avoidance zone の滞在時間と interaction ratio を社会的忌避の指標として用いた。また、別の群では CSDS 終了後に SI test ではなく EPM を行った。試験には 2 本のオープンアームと黒い壁で囲まれたクローズドアーム(共に長さ 30 cm × 幅 5 cm) が交差した十字迷路 (中心 5 × 5 cm) を使用した。オープンアームの照度は約 110 lux、クローズドアームの照度は約 70 lux で実施した。マウスを十字迷路の中心に頭がオープンアームを向くように置き、その後 10 分間の行動をビデオで記録した。ANY-MAZE によりオープンアーム滞在時間とクローズドアーム滞在時間を算出し、10 分間の試験におけるオープンアーム滞在時間の割合を不安様行動の指標とした。この時、試験開始から初めてどちらかのアームに体全体が入るまでの時間はオープンアーム滞在時間として計算した。

#### 血中コルチコステロン濃度の測定

コルチコステロン濃度の測定は既報を一部改変して行った<sup>69</sup>。CSDS 後のマウスまたはナイーブマウスを断頭し、採取した体幹血を直ちにコルチコステロン抽出に使用した。コルチコステロン濃度は corticosterone EIA kit (#501320; Cayman Chemical) を用い、製造者のプロトコルに従って測定した。

#### 画像解析

本研究で使用した解析ソフトウェア (Image LD, Image EP, Image BM, Image RM, and Image TM, Image TS) はすべて公共の NIH Image program (U.S. National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) および ImageJ program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) のパッケージを宮川らが改変したものを O'Hara & Co.より購入して用いた。

#### 統計解析

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表示した。GraphPad Prism (version 7, GraphPad Software) を用い、特に記載のあるものを除き two-way ANOVA または two-way repeated measures ANOVA で解析した。P 値はすべて両側の値であり、0.05 未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

## 引用文献

1. Perraud, A.-L. *et al.* ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**, 595–599 (2001).
2. Hara, Y. *et al.* LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-Permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell* **9**, 163–173 (2002).
3. Togashi, K. *et al.* TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* **25**, 1804–1815 (2006).
4. Uchida, K. *et al.* Lack of TRPM2 Impaired Insulin Secretion and Glucose Metabolisms in Mice. *Diabetes* **60**, 119–126 (2011).
5. Yamamoto, S. *et al.* TRPM2-mediated Ca<sup>2+</sup> influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat. Med.* **14**, 738–747 (2008).
6. Nagamine, K. *et al.* Molecular Cloning of a Novel Putative Ca<sup>2+</sup> Channel Protein (TRPC7) Highly Expressed in Brain. *Genomics* **54**, 124–131 (1998).
7. Yoon, I.-S. *et al.* Altered TRPC7 gene expression in bipolar-I disorder. *Biol. Psychiatry* **50**, 620–626 (2001).
8. Xu, C. *et al.* Association of the putative susceptibility gene, transient receptor potential protein melastatin type 2, with bipolar disorder. *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* **141 B**, 36–43 (2006).
9. Kraft, R. *et al.* Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **286**, 129–137 (2004).
10. Kaneko, S. *et al.* A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *J. Pharmacol. Sci.* **101**, 66–76 (2006).
11. Olah, M. E. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J. Physiol.* **587**, 965–979 (2009).
12. Chung, K. K. H., Freestone, P. S. & Lipski, J. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J. Neurophysiol.* **106**, 2865–2875 (2011).
13. Xie, Y.-F. *et al.* Dependence of NMDA/GSK-3 $\beta$  Mediated Metaplasticity on TRPM2 Channels at Hippocampal CA3-CA1 Synapses. *Mol. Brain* **4**, 44 (2011).
14. Krishnan, V. *et al.* Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell* **131**, 391–404 (2007).

15. Fabricius, K., Wörtwein, G. & Pakkenberg, B. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* **212**, 403–416 (2008).
16. Devenport, L. D., Hale, R. L. & Stidham, J. A. Sampling behavior in the radial maze and operant chamber: Role of the hippocampus and prefrontal area. *Behav. Neurosci.* **102**, 489–498 (1988).
17. Uemura, T., Kudoh, J., Noda, S., Kanba, S. & Shimizu, N. Characterization of human and mouse TRPM2 genes: Identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 1232–1243 (2005).
18. Bai, J. Z. & Lipski, J. Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology* **31**, 204–214 (2010).
19. Watanabe, M., Kodama, T. & Hikosaka, K. Increase of extracellular dopamine in primate prefrontal cortex during a working memory task. *J. Neurophysiol.* **78**, 2795–2798 (1997).
20. Hauser, M. D. Perseveration, inhibition and the prefrontal cortex: a new look. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 214–222 (1999).
21. Schwabe, K., Enkel, T., Klein, S., Schütte, M. & Koch, M. Effects of neonatal lesions of the medial prefrontal cortex on adult rat behaviour. *Behav. Brain Res.* **153**, 21–34 (2004).
22. Zahrt, J., Taylor, J. R., Mathew, R. G. & Arnsten, A. F. T. Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J. Neurosci.* **17**, 8528–8535 (1997).
23. Glickstein, S. B., Hof, P. R. & Schmauss, C. Mice lacking dopamine D2 and D3 receptors have spatial working memory deficits. *J. Neurosci.* **22**, 5619–5629 (2002).
24. Kellendonk, C. *et al.* Transient and Selective Overexpression of Dopamine D2 Receptors in the Striatum Causes Persistent Abnormalities in Prefrontal Cortex Functioning. *Neuron* **49**, 603–615 (2006).
25. Mrejeru, A., Wei, A. & Ramirez, J. M. Calcium-activated non-selective cation currents are involved in generation of tonic and bursting activity in dopamine neurons of the substantia nigra pars compacta. *J. Physiol.* **589**, 2497–2514 (2011).
26. Kamsler, A. & Segal, M. Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **23**, 269–276 (2003).

27. Kamsler, A. & Segal, M. Paradoxical Actions of Hydrogen Peroxide on Long-Term Potentiation in Transgenic Superoxide Dismutase-1 Mice. *J. Neurosci.* **23**, 10359–10367 (2003).
28. Duffy, S., Labrie, V. & Roder, J. C. D-Serine Augments NMDA-NR2B Receptor-Dependent Hippocampal Long-Term Depression and Spatial Reversal Learning. *Neuropsychopharmacology* **33**, 1004–1018 (2008).
29. Zeng, H. *et al.* Forebrain-Specific Calcineurin Knockout Selectively Impairs Bidirectional Synaptic Plasticity and Working/Episodic-like Memory. *Cell* **107**, 617–629 (2001).
30. Maes, M., Galecki, P., Chang, Y. S. & Berk, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **35**, 676–692 (2011).
31. Ibi, M. *et al.* Depressive-Like Behaviors Are Regulated by NOX1/NADPH Oxidase by Redox Modification of NMDA Receptor 1. *J. Neurosci.* **37**, 4200–4212 (2017).
32. Seo, J.-S. *et al.* NADPH Oxidase Mediates Depressive Behavior Induced by Chronic Stress in Mice. *J. Neurosci.* **32**, 9690–9699 (2012).
33. Nie, X. *et al.* The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. *Neuron* **99**, 464-479.e7 (2018).
34. Miyanohara, J. *et al.* TRPM2 Channel Aggravates CNS Inflammation and Cognitive Impairment via Activation of Microglia in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J. Neurosci.* **38**, 3520–3533 (2018).
35. Andoh, C. *et al.* TRPM2 confers susceptibility to social stress but is essential for behavioral flexibility. *Brain Res.* **1704**, 68–77 (2019).
36. Ko, S. Y. *et al.* Transient receptor potential melastatin 2 governs stress-induced depressive-like behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 1770–1775 (2019).
37. Challis, C. *et al.* Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat. *J. Neurosci.* **33**, 13978–13988 (2013).
38. Chaudhury, D. *et al.* Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* **493**, 532–536 (2013).
39. Sachs, B. D., Ni, J. R. & Caron, M. G. Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses following psychosocial stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2557–2562 (2015).

40. Ngoc, K. H. *et al.* Expression of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 ion channel in the supramammillary nucleus and the antidepressant effects of its antagonist AMG9810 in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **73**, 96–107 (2023).
41. Ramaholimihaso, T., Bouazzaoui, F. & Kaladjian, A. Curcumin in Depression: Potential Mechanisms of Action and Current Evidence—A Narrative Review. *Front. Psychiatry* **11**, 1–16 (2020).
42. Demirdaş, A., Nazıroğlu, M. & Övey, İ. S. Duloxetine Reduces Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca<sup>2+</sup> Entry Through Modulation of TRPM2 and TRPV1 Channels in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Mol. Neurobiol.* **54**, 4683–4695 (2017).
43. Kheradpezhoh, E., Barritt, G. J. & Rychkov, G. Y. Curcumin inhibits activation of TRPM2 channels in rat hepatocytes. *Redox Biol.* **7**, 1–7 (2016).
44. Herrman, H. *et al.* Time for united action on depression: a Lancet–World Psychiatric Association Commission. *Lancet* **399**, 957–1022 (2022).
45. Herrman, H. *et al.* Reducing the global burden of depression: a Lancet–World Psychiatric Association Commission. *Lancet* **393**, e42–e43 (2019).
46. Slavich, G. M. & Irwin, M. R. Social Signal Transduction Theory of Depression. *Psychol Bull* **140**, 774–815 (2014).
47. Joëls, M. & Baram, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 459–466 (2009).
48. Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R. & Heim, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 434–445 (2009).
49. Cardozo Pinto, D. F. *et al.* Characterization of transgenic mouse models targeting neuromodulatory systems reveals organizational principles of the dorsal raphe. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
50. Muzerelle, A., Soiza-Reilly, M., Gaspar, P., Bernard, J. F. & Scott-Lomassese, S. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct. Funct.* **221**, 535–561 (2014).
51. Ogawa, S. K., Cohen, J. Y., Hwang, D., Uchida, N. & Watabe-Uchida, M. Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. *Cell Rep.* **8**, 1105–1118 (2014).
52. Pollak Dorocic, I. *et al.* A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron* **83**, 663–678

- (2014).
53. Weissbourd, B. *et al.* Presynaptic Partners of Dorsal Raphe Serotonergic and GABAergic Neurons. *Neuron* **83**, 645–662 (2014).
  54. Asaoka, N. *et al.* Chronic antidepressant potentiates spontaneous activity of dorsal raphe serotonergic neurons by decreasing GABAB receptor-mediated inhibition of L-type calcium channels. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
  55. Berton, O. *et al.* Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science (80-. )*. **311**, 864–868 (2006).
  56. Espallergues, J. *et al.* HDAC6 regulates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with critical impact on stress resilience. *J. Neurosci.* **32**, 4400–4416 (2012).
  57. Medrihan, L. *et al.* Initiation of Behavioral Response to Antidepressants by Cholecystinin Neurons of the Dentate Gyrus. *Neuron* **95**, 564-576.e4 (2017).
  58. Nagayasu, K. *et al.* Utility of organotypic raphe slice cultures to investigate the effects of sustained exposure to selective 5-HT reuptake inhibitors on 5-HT release. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1527–1541 (2010).
  59. Nagai, Y. *et al.* Dorsal raphe serotonergic neurons preferentially reactivate dorsal dentate gyrus cell ensembles associated with positive experience. *Cell Rep.* **42**, 112149 (2023).
  60. Zou, W. *et al.* A discrete serotonergic circuit regulates vulnerability to social stress. *Nat. Commun.* **11**, 4218 (2020).
  61. Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J. & Duschl, A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 173–188 (2006).
  62. Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T. & Grusby, M. J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity* **4**, 313–319 (1996).
  63. Kotanides, H. & Reich, N. C. Requirement of tyrosine phosphorylation for rapid activation of a DNA binding factor by IL-4. *Science (80-. )*. **262**, 1265–1267 (1993).
  64. Takeda, K. *et al.* Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. **380**, 143–146 (1996).
  65. Miyakawa, T., Yamada, M., Duttaroy, A. & Wess, J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic

- acetylcholine receptor. *J. Neurosci.* **21**, 5239–5250 (2001).
66. Takao, K. *et al.* Impaired long-term memory retention and working memory in *sdyl* mutant mice with a deletion in *Dtnbp1*, a susceptibility gene for schizophrenia. *Mol. Brain* **1**, 11 (2008).
  67. Ikeda, M. *et al.* Identification of *YWHAE*, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3212–3222 (2008).
  68. Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O. & Russo, S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* **6**, 1183–1191 (2011).
  69. Hazama, K. *et al.* Increased behavioral and neuronal responses to a hallucinogenic drug in PACAP heterozygous mutant mice. *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).

