電気けいれん刺激による海馬神経の成熟制御： 精神疾患の新たな治療戦略

瀬木（西田）恵里¹⁾，井本 有基²⁾，小林 克典³⁾

要約：近年，中枢神経における神経成熟状態の変化と精神疾患病態・治療メカニズムとの関連が示唆されつつある。しかしながら，神経の成熟状態を制御する分子機構はほとんど分かっていない。著者らは，抗うつ治療モデルである電気けいれん刺激による神経の活性化が，成体マウス海馬神経の成熟状態をどのように変化させるかについて解析した。電気けいれん刺激によって，海馬歯状回の顆粒成熟マーカーの発現が迅速に減少するとともに，神経興奮性の増大・刺激反応性の減少・短期可塑性の減少など未成熟様の機能変化が誘導された。すなわち，電気けいれん刺激による神経活性化によって，成熟神経が未成熟様に変化する「脱成熟」表現系が誘導された。また，これら脱成熟変化は，繰り返しの電気けいれん刺激により長期にわたって持続した。一方で，電気けいれん刺激後に，シナプス抑制の増強を行うと再成熟化がおきた。これらの結果から，電気けいれん刺激による脱成熟変化は，内在的な神経興奮性の増大によって維持されていることが示唆された。神経活性化による神経成熟と興奮性の制御が，うつ治療をはじめ様々な精神疾患治療の新たな戦略につながるものと期待される。

1. はじめに

海馬は，学習・記憶のみならず，うつ病や統合失調症をはじめとする精神疾患との関連も示唆されている脳領域である(1-5)。近年，抗うつ薬であるセロトニン選択性再取り込み阻害薬（SSRI）投与によって海馬歯状回の成熟神経が未成熟様の状態へと変化する「脱成熟化」現象が示されたことから(6)，神経成熟状態の変化と精神疾患治療との関連が示唆されつつあるが，

神経の成熟状態を制御するメカニズムはほとんど分かっていない。

電気けいれん療法は，1930年代より様々な精神疾患治療に用いられており，現在においても薬物治療抵抗性のうつ病患者に適応され，治療反応性が良いことが知られている(7,8)。電気けいれん様の刺激は，成体海馬での神経幹細胞の増殖や初期成熟過程を促進させることが知られている。しかしながら，電気けいれん刺激による神経活性化が，成熟した神経に対してどのような成熟表現系の変化を引き起こすのか，またSSRI投与と比較してどのような違いがあるかについては不明である。著者らは，電気けいれん様の刺激が，海馬歯状回の成熟神経に対して，脱成熟様の変化をSSRI投与よりも迅速かつ安定的に引き起こす可能性を考え，マウスでの電気けいれん療法モデルを用いて，その可能性とメカニズムを検証した(9)。

2. 海馬歯状回での電気けいれん刺激による成熟表現系の変化

電気けいれん療法モデルとして，C57Bl/6マウスに電気けいれん刺激を与え，海馬歯状回顆粒細胞の神経成熟マーカーであるカルビンジンの発現変化を検討した。1回の電気けいれん刺激6時間後で歯状回におけるカルビンジン遺伝子の発現は著明に減少した(図1a-c)。他の成熟マーカー（Tdo2, Dsp, Il1rl1遺伝子）も，繰り返しの電気けいれん刺激により同様に減少した。一方で，神経マーカーであるNeuN発現は電気けいれん刺激によって減少しなかったため，非特異的な細胞ダメージによる可能性は低いものと考えられた(図1d)。次に，活動依存性の反応を評価するた

キーワード：海馬，電気けいれん療法，神経成熟，うつ治療

¹⁾ 東京理科大学 基礎工学部 生物工学科（〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1）

²⁾ 京都大学大学院 薬学研究科 生体情報制御学分野（〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町 46-29）

³⁾ 日本医科大学 薬理学教室（〒113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5）

E-mail: eri.segi.nishida@rs.tus.ac.jp 原稿受領日：2017年8月7日，依頼原稿

Title: Maturation-related phenotypic changes in the adult hippocampal neurons by electroconvulsive treatment

Author: Eri Segi-Nishida, Yuki Imoto, Katsunori Kobayashi

図1 電気けいれん刺激による海馬歯状回神経の成熟マーカー発現変化

a: 単回の電気けいれん刺激 (ECS) 6 時間後におけるカルビンジン (Calbl) 遺伝子の発現変化 (Scale bars: 上 1 mm, 下 200 μ m). b: 電気けいれん刺激 6 時間後の海馬歯状回でのカルビンジン遺伝子の発現変化. c: 11 回の繰り返し電気けいれん刺激後の海馬歯状回でのカルビンジンタンパク質の発現変化. d: 11 回の繰り返し電気けいれん刺激後の海馬歯状回でのカルビンジンと NeuN タンパク質発現変化 (Scale bar: 20 μ m, *** $P < 0.001$). (文献 9 より改変)

めに, 電気けいれん刺激後の最初期遺伝子の発現を検討した. 1 回の電気けいれん刺激 1 時間後では Fos, Gadd45b, Nr4a1, Arc, Egr1 など最初期遺伝子の発現誘導が認められたが, 11 回の電気けいれん刺激 1 時間

後ではそれら遺伝子発現誘導は, 大きく減少していた. これらの結果から, 電気けいれん刺激により成熟マーカーの発現減少, 刺激反応性の低下など SSRI 長期投与で観察された表現系変化と類似した変化が認められた.

次に電気生理学的解析による機能的変化の解析を行った. 未成熟な歯状回の顆粒神経では, 高興奮性・高入力抵抗・静止膜電位の上昇が起きている (10, 11). 繰り返しの電気けいれん刺激を行った後で, 脳スライスを作成し, 顆粒神経の電気生理的特徴を調べたところ, 興奮性の増大 (図 2) と静止膜電位の上昇が認められ, 未成熟神経に類似した変化が起きていることが示唆された. 一方で, 入力抵抗は変化していなかったことから, 電気けいれん刺激を行っても細胞の形態には大きな変化をもたらさないことが示唆された.

次に顆粒細胞軸索から CA3 領域に投射するシナプス伝達機能を解析した. 繰り返し電気けいれん刺激によって, 単回の刺激におけるシナプス伝達効率は変化しなかったが, プレシナプス側由来の短期可塑性は有意に減少していた (図 3). この短期可塑性は神経成熟とともに増大することが知られており (6), 電気けいれん刺激により, 未成熟顆粒神経に類似した表現系へと変化することが明らかになった.

3. 電気けいれん刺激と長期 SSRI 投与での歯状回遺伝子発現変化

上記の解析から, 歯状回の顆粒神経に対して, 電気けいれん刺激は長期 SSRI 投与と同じような変化をもたらしていることが示唆された. そこで, 繰り返し電気けいれん刺激マウス由来の歯状回と長期 SSRI 投与マウス由来の歯状回を用いて, 網羅的遺伝子変化を比較した. 電気けいれん刺激による遺伝子発現変化と長期 SSRI 投与による遺伝子発現変化は有意に正の相関を示した (図 4). また, 遺伝子機能解析 (Gene Ontology 解析) から, 両者の刺激・投与で共通で変化する遺伝

図2 電気けいれん刺激による海馬歯状回神経の興奮性増大

a: 11 回の電気けいれん刺激 (ECS) 後の脳スライス海馬顆粒細胞での発火電流閾値の計測 (Scale bars: 100 ms, 20 mV, 40 pA). b: 単発発火を誘導する刺激電流閾値 (* $P < 0.05$). (文献 9 より改変)

図3 電気けいれん刺激による海馬歯状回神経（苔状線維：MF）の短期可塑性の変化

a：11回の電気けいれん刺激（ECS）後の脳スライス海馬苔状線維での短期シナプス可塑性の低下。1 Hz 高頻度刺激によるシナプス促進の誘導が、電気けいれん刺激後のスライスでは減弱している（Scale bars：10 ms, 0.5 mV）。b：電気けいれん刺激によるシナプス促進の減少は2回以上の電気けいれん刺激で観察される（** $P < 0.01$ ）。（文献9より改変）

図4 繰り返し電気けいれん刺激とSSRI長期投与による海馬歯状回の遺伝子発現変化相関

11回の電気けいれん刺激（ECS）後とSSRI長期投与後のマウス海馬歯状回での網羅的遺伝子発現変化 [log₂(fold-change)] を解析した。どちらかの刺激で有意に変化が認められた3,531遺伝子の発現変化をプロットしている。発現変化の度合いに有意な相関性が認められた。（文献9より改変）

子群では、神経発達に関わる遺伝子が多数検出された。したがって、繰り返しの電気けいれん刺激は、長期SSRI投与と類似した変化を歯状回顆粒神経で引き起こしていることが示唆される。

4. 繰り返し電気けいれんによる海馬歯状回の脱成熟表現系の持続

1回の電気けいれん刺激による海馬歯状回での成熟マーカー発現減少は、24時間以内にコントロールレベルまで回復したが、11回の電気けいれん刺激後は、成熟マーカー発現減少は少なくとも刺激後14日間持続した（図5a, b）。同様に、歯状回の顆粒神経軸索における短期可塑性の減少も、3回の電気けいれん刺激では一過性に認められるだけであるが、11回の電気けいれん刺激により、刺激後28日間以上持続した。したがって、1回の電気けいれん刺激のような一過性の強

図5 繰り返し電気けいれん刺激による海馬歯状回神経の成熟マーカー発現変化の持続化

a：単回の電気けいれん刺激（ECS）による一過性のカルビンジン（Calb1）遺伝子発現低下。b：繰り返し電気けいれん刺激後の持続的な海馬歯状回でのカルビンジン遺伝子の発現低下。c：シナプス抑制を増強するジアゼパムの効果。繰り返し電気けいれん刺激後のカルビンジンタンパク質の発現低下を回復させる（*** $P < 0.001$ ）。（文献9より改変）

い神経活性化で、成熟表現系の変化は迅速に誘導されるが、繰り返しの神経活性化によって、その変化は持続化することが示唆された。

次に、表現系変化の誘導・持続における神経活性化の寄与について検討を行った。まず、抑制性入力の影響を $GABA_A$ 受容体アゴニストのジアゼパムを用いて検討した。ジアゼパムを電気けいれん刺激期間に投与した場合、長期電気けいれん刺激による成熟マーカーの発現減少・短期可塑性の減弱は、誘導できるものの、持続化できなくなった (図 5c)。したがって、 $GABA$ による抑制性シグナルの増強は、脱成熟表現系の持続化を抑制することが明らかとなった。

これらの結果から、電気けいれん刺激によって、歯状回顆粒神経の持続的な興奮性増大が起きており、この興奮性増大が脱成熟表現系を持続化させている可能性が考えられた。この興奮性増大の性質を調べるために、興奮性入力に対する発火・興奮性後シナプス電流 (EPSC)・抑制性後シナプス電流 (IPSC) を検討した。その結果、電気けいれん刺激を受けた海馬スライスでは、刺激に対する発火閾値が減少していた。また電気けいれん刺激した海馬では、EPSC と IPSC バランスが興奮側にシフトしており (図 6)、刺激に対して興奮性入力が増していることが示唆された。これらの結果から、電気けいれん刺激を受けた歯状回顆粒神経は、持続的なシナプス活性化が起きている可能性が考えられた。

5. まとめ

本研究では、うつ治療モデルである電気けいれん刺激を用いて、神経系を強く活性化させた時に、海馬歯

図 6 電気けいれん刺激による海馬歯状回顆粒神経の興奮抑制バランスの変化

a: 同一の顆粒細胞由来の興奮性後シナプス電流 (EPSC) と単シナプス性の抑制性後シナプス電流 (IPSC) の測定。Scale bars: 20 ms, 100 pA. b: 3 回電気けいれん刺激後の IPSC/EPSC 比の減少 (** $P < 0.01$)。 (文献 9 より改変)

状回の成熟表現系の変化が起きるかを解析した。電気けいれん刺激をマウスに繰り返し処置することで、成熟海馬神経が未成熟な表現系 (脱成熟) を示すことを見出した。電気けいれん刺激は、成体海馬での神経幹細胞の増殖や初期成熟過程を促進させることが知られていることから、電気けいれん刺激により、神経新生の促進と成熟神経の脱成熟による未成熟神経の増加が同時に起きることが予想される (図 7a)。これらの変化により、海馬歯状回神経は、新たな恒常性状態に移行しており、このような変化が抗うつ作用発揮に寄与している可能性が考えられる。SSRI 長期投与を行った場合でも、同じ個体での海馬歯状回における神経新生促進作用と脱成熟の程度は強い相関が認められ (5, 12)、両者の反応は関連し合っている可能性が示唆される。

また電気けいれん刺激による神経脱成熟変化は 1~

図 7 電気けいれん刺激による海馬神経の機能調節機構

a: 電気けいれん刺激による海馬歯状回の神経新生促進と脱成熟誘導による新たな恒常性の獲得。 b: 電気けいれん刺激による脱成熟の誘導と持続化。

2回の刺激で誘導されるが，その変化は一過性であること，一方で繰り返し刺激によって脱成熟変化は持続することを示した（図 7b）．更に，繰り返し電気けいれん刺激により，歯状回神経の興奮／抑制バランスが興奮性にシフトしていること，また抑制性 GABA シグナルを増強させるジアゼパムにより，脱成熟変化の安定性が阻害され，再成熟化することを明らかにした．これらの結果から，電気けいれん刺激による脱成熟変化は，内在的な神経興奮性の増大によって維持されていることが示唆された．今後，うつ病態や統合失調症などそれぞれの精神疾患に特有の神経成熟状態の変化が明らかになれば，神経活性化調節による神経成熟と興奮性の制御が精神疾患治療の新たな戦略につながると期待される．

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない．

文 献

- 1) Holm MM, et al. *Hippocampus*. 2011;21:422-433.
- 2) Yamasaki N, et al. *Mol Brain*. 2008;1:6.
- 3) Kobayashi K. *Mol Neurobiol*. 2009;39:24-36.
- 4) Segi-Nishida E. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:939-944.
- 5) Segi-Nishida E. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:142.
- 6) Kobayashi K, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:8434-8439.
- 7) Sommer IE, et al. *Schizophr Bull*. 2012;38:704-714.
- 8) Pagnin D, et al. *J ECT*. 2004;20:13-20.
- 9) Imoto Y, et al. *Mol Brain*. 2017;10:8.
- 10) Ambrogini P, et al. *Brain Res*. 2004;1017:21-31.
- 11) Schmidt-Hieber C, et al. *Nature*. 2004;429:184-187.
- 12) Imoto Y, et al. *Mol Brain*. 2015;8:29.