

# ストレス性情動系障害に関わる 糖・脂質関連分子メカニズムの解明

平成 25 年 5 月 7 日受付

加藤 啓子<sup>\*1</sup>

シーモントリ パイトゥーン<sup>\*2</sup>

## 要 旨

ヒト難治てんかんの 5 割を占める側頭葉てんかんのモデルマウスを用いた一連の研究より、我々は、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) がてんかん発症の原因となると共に、うつや不安障害にも関わることを明らかにしてきた。この ST3Gal IV 遺伝子を欠損したマウスは、脳内の糖・脂質代謝に関わる成長ホルモンや Igf1 量の低下を示すと共に、食餌中の脂質により、うつや不安様行動を変えることがわかってきた。また ST3Gal IV 遺伝子を欠損したメスマウスは、周産期分娩異常を示し胎子を死に到らせるが、これは妊娠末期にプロジェステロン分泌を停止できないことに原因があった。コレステロールより生合成されるプロジェステロンは、脳内で電位依存性チャンネルや GABA<sub>A</sub> 電流を抑制し、抗てんかん薬様の作用を示すことが知られている。以上の知見は、ST3Gal IV が脳内の脂質代謝を介して、プロジェステロンを含むホルモンに作用し、神経精神活動に影響を与えることを示唆している。

キーワード：てんかん、不安障害、シアル酸、ホルモン、脂質

## はじめに

難治てんかんの治療として、飽和脂肪酸鎖からなるトリグリセリドを過剰量含むケトン食が知られており、特に小児てんかんの発作の抑制に非常に有効であることが知られている (1)。脂質を主成分とするケトン食の有効性は、脳内のエネルギー源を糖質に依存するのではなく、ケトン体に依存することで脳内のエネルギー源の備蓄を増大させ、その結果ニューロンの膜電位を安定に維持し、GABA 産生量を亢進させるといわれている。またケトン食が、アルツハイマー病やパーキンソン病の認知障害に効果があるといった報告もある (2)。その一方で、脳におけるメカニズムについては、神経細胞の膜電位の低下、抗酸化作用、さらには、ケトン食を摂食したラット海馬の LTP の低下を示す報告があるが (3, 4)、分子レベルに至る研究の進展はない。

女性てんかん患者の 25~30% は、てんかん発作の出現に生理周期の影響を受けることが知られて

\*1 京都産業大学総合生命科学部

\*2 京都産業大学大学院工学研究科

おり、エストロゲンがけいれん閾値を下げるのに対してプロゲステロンはけいれん閾値を上げる(5)。卵巣や胎盤で発現するエストロゲンやプロゲステロンは、脳でも発現し、神経ステロイドホルモンに含まれる。脳においてエストロゲンは海馬ニューロンのシナプス構造を変えることが知られているが(6)、血中の分泌量の急激な変化がてんかん発作やうつ様症状に関連するようである。一方で、脳においてプロゲステロンは、抗てんかん薬に応答して脳内で発現し、電位依存性チャンネルやGABA<sub>A</sub>電流を抑制し、てんかん発作の閾値を下げることが知られている(7)。

これらステロイドホルモンは、コレステロールより生合成される。コレステロール合成の出発材料はヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMG-CoA) であり、脂肪酸のβ酸化の最終産物であるアセチル CoA とアセトアセチル CoA から、HMG-CoA シンターゼにより合成される。その一方で、HMG-CoA は、HMG-CoA リアーゼにより、アセチル CoA とケトン体であるアセト酢酸が分解され、その後、D-ヒドロキシ酪酸とアセトンが生成される。こうした生合成系をみると、ケトン食から代謝されるケトン体合成やステロイドホルモン生合成の調節が、てんかんやうつ・不安症状に影響することが示唆されるが、これまで適切な実験モデルがなかった。これまでに我々は、(I)α2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV) 遺伝子欠損マウスが、てんかん発作を誘導できないことに加え、うつ・不安障害を示すことや、(II)てんかんモデルと ST3Gal IV 遺伝子欠損マウス間で、成長ホルモンや Igf1 等の脂質代謝に関わる分子の発現の逆転を観察している(8, 9)。本研究では、うつ・不安障害、性行動に関わる脳脂質代謝分子メカニズムを解明する上で、ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスが有効なモデルとなることを示す。

## 材料と方法

### 1. α2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV) 遺伝子欠損マウス

ST3Gal IV ゲノム配列の第3エクソンを Cre 配列で挟んだターゲット遺伝子を ES (MS12) 細胞に導入したマウスを作成した後、受精卵への CAG-promoter-Cre の導入により ST3Gal IV 完全欠失マウスを作成した。

### 2. 行動実験

一連の動物実験は、京都産業大学動物実験計画指針に準拠し、動物福祉に配慮し、研究を遂行した。生後12週齢以降、1週間の間隔を開けて、恐怖条件付け試験、強制水試験、驚愕反応を実施した。

#### 2.1 恐怖条件付け試験

以下の図に示すように、3日間にわたる、連続した行動実験を実施した。(1日目)マウスを、バックグラウンド音55dBの環境下(200ルクスの明箱)に入れ1分後に、65dBの音を、10秒間聞かせた(条件刺激:CS)。このCSの最後の1秒間にフットショック(0.3mA, 1秒, 無条件刺激:US)を与えた。この一連のCSとUSの刺激を2回行い、フットショックの間隔は20秒とした。(2日目)1日目と同じ環境(55dB, 明箱)に5分間マウスを入れ、後の3分間を解析した。このテストでは、マウ

スとその空間を記憶しており、すくみ行動(フリーズ)を示すかどうかを観察した。(文脈的恐怖条件付け：海馬・扁桃体恐怖記憶)。(3日目)1~2日目と異なる環境(50ルクスの暗箱)にマウスを入れ、1分後に1分間65dBの音を聞かせる。1日目に聞かせられた音(65dB, 30秒)をきっかけに示す、すくみ行動(フリーズ)の程度を観察するもので、後半の2分間を解析した。(てがかり(音)恐怖条件付け：扁桃体恐怖記憶)。

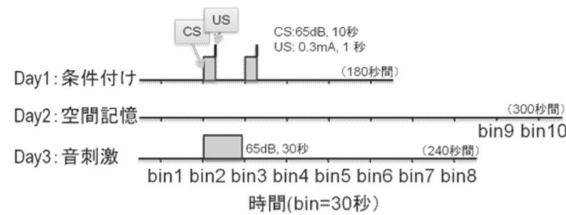


図1 恐怖条件付け試験

2.2 強制水試験

強制水試験は、泳ぐことをあきらめる“絶望のモデル”としてうつ病薬の検査によく利用されている試験であり、1日に1度実施した場合、1日目より2日目の方が、より泳ぐことをあきらめることが知られている(9)。本研究では、水温24度の水が入った直径10cmの筒にマウスを6分間入れ、遊泳距離と不動時間を1日に1度、2日間、自動計測した。

2.3 驚愕試験

120dBの音をマウスに聞かせた時の、マウスの驚愕反応(震え)を加速度センサーにより感知する。最初に、120dBの音を10回聞かせる。次に、ランダムに74dB, 78dB, 82dBの音を聴かせた後に120dBを聞かせた場合、正常のマウスは、後から聞こえてくる120dBの音に対する反応を抑制する(プレパルス抑制)。このプレパルス抑制の見られない状態が、統合失調症である(図2)。

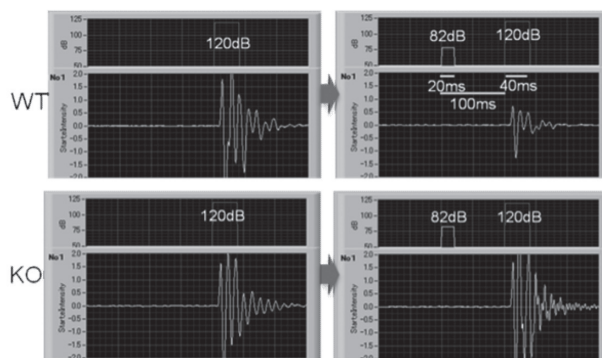


図2 プレパルス抑制試験におけるマウス驚愕反応の典型例  
野生型マウス(WT)は、82dBの後に120dBを聞くと、驚愕反応の振幅を抑制した(プレパルス抑制)が、ここに示したST3Gal IV遺伝子欠損マウス(KO)は、抑制が全く見られない。

### 3. 血漿ホルモン量測定

雌マウスの性周期は4~5日で、発情前期、発情期、発情後期、休止期に分類する。毎日午後5時に膣内の細胞を採取し、ギムザ染色後上述の時期を判定した。発情前期の雌マウスを雄と同居させ、翌朝午前7~9時に膣栓の有無を交配の有無と判定し、膣栓を持つマウスの妊娠時期を0.5日とした。妊娠19日目にイソフルランによる全身麻酔後全採血を実施し、卵胞刺激ホルモン(FSH; Endocrine Technologies, INC., CA, USA), 黄体ホルモン(LH; Endocrine Technologies, INC., CA, USA), エストロジェン(E2; Cayman Chemical Company, MI, USA), プロジェステロン(P4; DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany)量をEIA法により測定した。E2とP4については、卵巢・副腎摘出術2週間後の雌C57Bl/6Jマウス血漿をE2, P4陰性血漿とし、精製E2及びP4を用いた段階希釈時に、希釈液として用いた。E2測定時のみ、血漿中のE2をジエチルエーテルにより抽出後、ジエチルエーテル層を新しい試験管内に移し、ヘキサン-アセトニトリル混合液を入れ、窒素ガスにより乾燥し、1%BSA-PBSに溶解後、EIAに供した。

### 結果

本研究では、ST3Gal IVが脂質代謝系を調節し、情動行動や性行動に作用する可能性を調べるために、(I)異なる脂質の摂食が与える情動行動への影響と、(II)神経ステロイドホルモンを介した行動の調節の可能性について研究を遂行し結果を得た。

#### I. 脂質の摂食が与える情動行動への影響

##### 恐怖条件付け試験

離乳後80日間飼料を摂食したST3Gal IV遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いて、恐怖条件付け試験を実施した。

1日目に、マウスは音条件試験(CS)とフットショック無条件試験(US)を組み合わせた刺激を受けた。フットショックを受けたマウスはすくみ行動を示すが、AIN93Gコントロール餌を摂食した欠損マウスと野生型間でそのすくみ行動のレベルに差はなく、飼料中の脂質種を変えても差はなかった。以上のことから脂質の摂食は条件付けに対して影響を示さなかった。

2日目に、マウスは文脈的恐怖条件付け試験を受けた。コントロール餌を摂食した欠損マウスと野生型マウス間でそのすくみ行動のレベルに差はなかった。これは、通常の餌を食べているマウスは、空間認知に関する恐怖記憶に異常がないことを示している。その一方で、飼料中の脂質を変えることで、野生型、欠損マウス共にすくみ行動に変化がみられたが、野生型マウスに比べ欠損マウスは、脂質によるすくみ行動の重篤化を示す傾向があった。

3日目に、マウスは手がかり(音)恐怖条件付け試験を受けた。欠損マウスは、野生型マウスに比べ音刺激に対して著しいすくみ行動を示した。2日目とは逆に、飼料中の脂質を増やすことで、野生型マウスのすくみ行動に変化はなかったが、欠損マウスは、すくみ行動に変化を示した。

以上恐怖条件付け試験の結果より、脂質の摂食が不安様行動に影響すること、また空間認知と音条件付け試験間で脂質の効果に差があったことから、神経回路に依存した脂質代謝の存在が示唆された。

**強制水試験**

離乳後 90 日間飼料を摂食した ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いて、強制水試験を実施した。方法と材料(2-2)で記したように、1 日目に引き続き 2 日目も強制水試験に供された正常マウスは、2 日目で不動時間を延長することが知られている。本研究においても、コントロール食を摂食した欠損マウスと野生型マウスは共に、2 日目には、その不動時間を延長した。次に、飼料中の脂質を増やすことで、野生型のマウスは不動時間を短縮した。その一方で欠損マウスは、飼料中の脂質の種類に依存した異なる不動時間を示した。

以上強制水試験の結果より、脂質の摂食がうつ様行動に影響すること、またその影響の度合いが、野生型マウスと欠損マウスで異なることから、ST3Gal IV が脂質代謝の変化を介してうつ様行動に影響を与えたことが示唆された。

**II. 神経ステロイドホルモンを介した行動の調節の可能性**

次に、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素(ST3Gal IV) 遺伝子を欠損したメスマウスが、統合失調症様症状、性周期不全、分娩遅延による死産を示した結果を以下に記す。

**驚愕試験**

離乳後 100 日以降の ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いて、驚愕試験を実施した。オス、メス共にプレパルス抑制を障害する傾向にあったが、有意差を示したのは、メスだけであった。

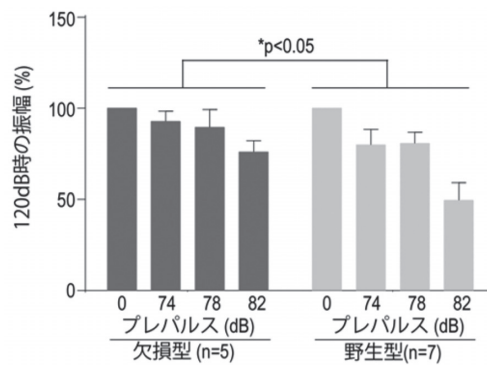


図 3 ST3Gal IV 遺伝子欠損メスマウスが示すプレパルス抑制の障害。Two way-ANOVA :  $F(1, 40)=5.83, *p<0.05$ 。オスの欠損マウスもプレパルス抑制を障害する傾向にあったが、有意差はなかった。

### 周産期分娩異常

げっ歯類は、分娩後発情を示すことから、分娩前日よりFSH-LHサージが観察される。また同時に出産前は、プロゲステロン分泌の停止と、緩やかなエストロゲンの分泌の亢進がみられる。げっ歯類の中でもマウスは、交配後19.5日でお産を迎えることから、本研究では、分娩予定の前日、午後5時(交配後19日)に麻酔下で採血をおこなった。

ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスは、性周期不全を示すが、分娩後発情の誘導に必須であるFSHの発動が消失していた。LHの分泌誘導も低下する傾向にあった。また、ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスは、周産期分娩異常を示し、若齢で40%、老齢で80%以上のST3Gal IV 遺伝子欠損母マウスが、死産を示した。

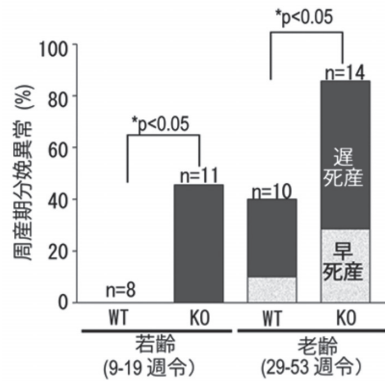


図4 周産期分娩異常 Mann-Whitney U-test

次に、血漿中のエストロゲンとプロゲステロン量を測定したところ、エストロゲン量は、野生型マウスと欠損マウス共におおよそ同じ値であった。その一方で、欠損マウスの分娩前夜のプロゲステロン分泌量が野生型マウスの3.4倍を示した。

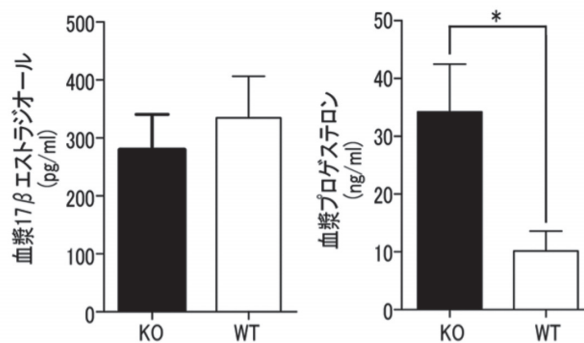


図5 妊娠19日母マウス(若齢)血漿17βエストラジオール(E2)、プロゲステロン(P4)量。  
Unpaired t-test: F(7,6)=1.19, p=0.56 (E2); F(7,5)=7.61, \*p<0.05 (P4)。



## 考察

本研究の遂行により、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)が、成長ホルモン、Igf1 やプロジェステロンといった脂質代謝に関連したホルモン量を調節し、てんかん〜うつ・不安障害、性行動を調節することがわかった。その調節は、視床、扁桃体、海馬、視床下部を含む辺縁系領域を中心とした神経回路上で生じており、脂質摂食の研究結果から、ST3Gal IV は、行動依存的に異なる脂質代謝を調節していることがわかった。ST3Gal IV を介した辺縁系脳脂質代謝分子メカニズムを解明することは、てんかん〜うつ・不安障害、性行動の調節システムの全貌解明を可能にすると考えられ、ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスがよいモデルとなることがわかった。

### I. 脂質の摂食が与える情動行動への影響

まずは、恐怖条件付け試験について考察する。空間認知刺激は、海馬から扁桃体基底外側核と基底内側核に投射され、その後、扁桃体中心核から、恐怖記憶をコントロールする脳幹部に投射される(10, 11, 12)。コントロール餌を摂取した ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスの示す文脈の恐怖記憶は、野生型マウスと変わらなかった。ST3Gal IV mRNA は海馬ではほとんど発現していないことから、ST3Gal IV の有無が海馬からの投射に影響を与えなかったと考えられる。その一方で、一部の脂質を摂食した野生型マウスは、恐怖記憶を軽減した。その一方で、同じ脂質を摂食した ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスはこれら脂質に全く反応しなかった。この知見より、海馬から扁桃体そして脳幹部への恐怖記憶の投射経路上で生じる一部の脂質代謝が恐怖記憶に関与し、ST3Gal IV による調節を受けることを示している。

3 日目に実施した、てがかり(音)恐怖条件付け試験では、音刺激は視床内側膝状体から大脳皮質聴覚野と平行して扁桃体外側核に投射される(13)。コントロール餌を摂取した ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスは、条件付けされた音に対して著しい不安を示す。視床内側膝状体の神経細胞が ST3Gal IV の著しい発現を示すことから、この ST3Gal IV の欠損が、視床内側膝状体から扁桃体外側核への音刺激の投射を抑制したと考えられる。その一方で、この音への不安症状は飼料中の脂質を増やすことで変化した。野生型マウスでは、脂質の摂食と不安レベルの関連性はなかったことから、飼料中の脂質を増やすことで起こる音への不安症状の変化は、ST3Gal IV の有無に関わることがわかった。

次に強制水試験について考察する。Castro らは、扁桃体基底外側核に障害を与えると、強制水試験における不動時間を軽減すると示しており(14)、扁桃体基底外側核が不安やうつ様症状の中核であることがわかる。コントロール餌下で ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスは、野生型に比べて不動時間を延長する。扁桃体基底外側核にてんかん誘導刺激を導入した ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスは、てんかん発作を示さないことから、ST3Gal IV が、扁桃体基底外側核の機能に影響していることがわかる。強制水試験においても、野生型マウスと欠損マウス間で、飼料に含まれる脂質の種類と量により情動への摂食効果が異なった。このことは、欠損マウスの脳内の脂質代謝系が野生型とは異なっており、その違いが情動行動に影響したと示唆された。

## II. 神経ステロイドホルモンを介した行動の変化

分娩末期に胎盤から分泌されるプロジェステロンの分泌を停止することで、分娩の発動が起こる。プロゲステロンは黄体ホルモンとも呼ばれ、胎盤で発現し妊娠維持に深く関わる。子宮筋に直接作用し、ギャップ結合を抑制したり、細胞膜の過分極により興奮伝導を抑制することにより、子宮筋の収縮を抑制する。妊娠末期に入ると、このプロゲステロンの発現・分泌量を停止し、子宮収縮を発動する。ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスはこの分娩末期のプロジェステロンの分泌を止めることができずに、分娩異常を示すことがわかった。プロジェステロンは、神経ステロイドホルモンとして脳内にも存在し、アロプレグナロンに代謝され、GABA<sub>A</sub> 受容体を調節し、てんかん発作の閾値を下げたり、うつや不安様症状の改善に作用することが知られている (15, 16)。本研究では、脳内に存在するプロゲステロンの作用を検討していないが、ST3Gal IV 遺伝子欠損メスマウスの統合失調症様症状を示していることから、メスに重篤であったブレパルス抑制の障害にも、プロゲステロンを含む神経ステロイドホルモンの関与が示唆された (17)。

## 最後に

ST3Gal IV は、扁桃体を中枢とする情動機能に重要な役割を示し、その ST3Gal IV が消失すると不安様行動が生じる。今回、この不安様行動が脂質の摂食により重篤化したり、改善することがわかった。また、担当している神経回路によって、有効な脂質種が異なることもわかった。さらに恐怖条件付け試験、強制水試験共に、ほとんどの不安症状やうつ様症状を緩和する脂質候補がしぼられてきたことから、情動系障害の改善に向けた、食品への応用性を開拓する可能性を開いた。本研究課題期間において、課題最終目標である「てんかん～うつ・不安障害、性行動に関わる脳脂質代謝分子メカニズムの解明」を目指すための基盤として、ST3Gal IV を介した脂質代謝系の発見とモデルマウスの確立を完了した。

## 参考文献

1. Bailey EE, Pfeifer HH, Thiele EA. (2005) The use of diet in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav.* 6 : 4-8.
2. Henderson ST, et al. (2009) Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease : a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Nutr Metab (Lond).* 6 : 31.
3. McNally MA, Hartman AL. (2012) Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem.* 121 : 28-35.
4. Koranda JL, Ruskin DN, Masino SA, Blaise JH. (2011) A ketogenic diet reduces long-term potentiation in the dentate gyrus of freely behaving rats. *J Neurophysiol.* 106 : 662-6.
5. トーマス・R ブラウン他 (2004) てんかんハンドブック (*Handbook of Epilepsy 2<sup>nd</sup> Ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 訳) pp279-292.
6. Mukai H, et al. (2010) Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta.* 1800 : 1030-44.
7. Kelley BG, Mermelstein PG. (2011) Progesterone Blocks Multiple Routes of Ion Flux. *Mol Cell Neurosci* 48 : 137-141.



8. Matsubishi H, Horii Y, Kato K. (2003) Region-specific and epileptogenic-dependent expression of six subtypes of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase in the adult mouse brain. *J Neurochem.* 84 : 53-66.
9. Kato K, et al. (2009) Distinct role of growth hormone on epilepsy progression in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurochem* 110 : 509-519.
10. Phillips RG, LeDoux JE. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.* 106 : 274-285.
11. Goosens KA, Maren S. (2001) Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn Mem.* 8 : 148-155.
12. LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci.* 8 : 2517-2529
13. Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE. (1997) Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron.* 19 : 613-624
14. Castro JE, et al. (2010) Role of the amygdala in antidepressant effects on hippocampal cell proliferation and survival and on depression-like behavior in the rat. *PLoS One* 5 : e8618.
15. Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG. (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature.* 444 : 486-489.
16. Pinna G, Costa E, Guidotti A. (2006) Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacology (Berl).* 186 : 362-372.
17. Marx CE et al. (2011) Pregnenolone as a novel therapeutic candidate in schizophrenia : emerging preclinical and clinical evidence. *Neuroscience.* 191 : 78-90.

## Analysis of the carbohydrate and lipid-related molecular mechanisms involved in emotional limbic system

Keiko KATO  
Paitoon SRIMONTRI

### Abstract

A series of our research about temporal lobe epilepsy model mouse that is a model for refractory epilepsy, we developed alpha 2,3-sialyltransferase (ST3Gal IV) gene deficient mice. From research with ST3Gal IV-deficient mice, we have evaluated that ST3Gal IV is involved in epileptogenesis and anxiety. Recently, the ST3Gal IV-deficient mice showed differential expressions of brain growth hormone and lipid metabolism-related molecules, suggesting that brain lipid metabolism might be involved in anxiety and depression via ST3Gal IV. Because brain lipid metabolism receives effect of composition of lipids in food (feed), we, therefore, investigated whether dietary lipids influence a wide range of emotional behaviors. We found that wild type and the deficient mice exhibited different degrees of anxiety and depression-like behaviors depending on the type of lipids and the amounts included in the diet. On the other hand, we found ST3Gal IV-deficient female mice showed perinatal parturient abnormality by still keeping high amount of plasma progesterone at the terminal stage of pregnancy. Progesterone that is made from cholesterol is neuroactive steroid. It is known that progesterone modulates voltage-dependent channel and GABA<sub>A</sub> currents and functions as an endogenous anticonvulsant, proposing that ST3Gal IV might regulate progesterone also in brain. Finally, it was suggested that brain lipid metabolism via ST3Gal IV play important roles in development of emotional behaviors.

**Keywords :** Epilepsy, Anxiety, Sialic acid, Hormone, Lipid