



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第2020号
学位記番号	第1425号
氏名	瀬瀬 真之介
授与年月日	令和6年3月22日
学位論文の題名	<p>The defects of the hippocampal ripples and theta rhythm in depression, and the effects of physical exercise on their amelioration (運動による鬱症状改善のためのリハビリテーション介入標的の探索)</p> <p>Heliyon, Dec 16; 10(1): e23738, 2023</p>
論文審査担当者	<p>主査： 明智 龍男 副査： 松川 則之, 音羽 健司</p>

論文内容の要旨

目的

うつ病やフレイルなどの意欲の減退や認知機能の障害に掛かる脳病態へのリハビリテーション介入は、運動によることが多いが、運動療法がそれら脳病態の改善に働く機序の詳細は不明である。また、環境ストレス応答的な、それら脳病態と、運動によるその改善を、in vivo で評価するためのバイオマーカーも見出されていない。一方、それら脳病態では、海馬の神経活動の障害が報告されており、その障害を海馬の脳波を測定することにより in vivo で検出、評価し得る可能性が示唆されていた。海馬では、覚醒状態などにより異なる周波数の脳波が観察される。すなわち、覚醒行動時には theta リズム (7~12Hz) が生じ、記憶・学習に働くが、覚醒不動時には SWR (sharp wave and ripples、150~250Hz) が生じ、覚醒行動時の神経活動の再現と記憶・学習の定着に働く。

そこで、本研究では、慢性拘束ストレスによるうつ病モデルマウスを作製し、うつ症状と、運動がその改善に及ぼす影響を、theta リズムと SWR により in vivo で評価することで、それら脳波の病態および治療効果のバイオマーカーとしての有用性と、それら脳波がうつ症状の病理にあずかる神経基盤を検討することを目的とした。さらに、ここでは、従前に報告されたミクログリアの活性化を伴う脳内炎症や海馬、脳室下帯での成体脳神経新生の障害などが、海馬の脳波の障害と相関するかを検討することも目的とした。

方法

8週齢の C57BL/6 マウスを毎日4時間ずつ3週間、50ml コニカルチューブに入れ、慢性拘束ストレスによるうつ病モデル(CRS)を作製した。うつ症状は、体重計測、行動学的解析により評価した。ストレス負荷時以外はランニングホイール付きケージで飼育したマウスを ExCRS、ストレスを負荷せず CRS と同様にランニングホイールのないケージで飼育したマウスを HC とした。行動学的解析は Forced swim test (FST)、Open field test (OFT)、Novel object recognition test (NORT) により行った。

行動学的解析後、麻酔下で16チャンネル電極をマウス海馬 CA1 に刺入し、脳波を記録した。そして、MATLAB のプログラムコードにより、SWR、theta リズムの抽出や周波数などの解析を行った。

海馬脳波記録終了後、マウスを4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液にて灌流固定し、脳を剖出し、脳切片の免疫組織化学的染色を行い、脳内炎症 (Iba1 抗体: ミクログリア)、成体脳神経新生 (SOX2 抗体: 神経幹細胞)、神経活動 (Δ FosB 抗体: 神経活動依存的発現タンパク質) を、定量的に解析、評価した。

結果

HC と比較して CRS では、体重の減少、FST での無動時間の増加、OFT でのフィールド中央への侵入回数と滞在時間の減少、NORT での新規物探索時間の減少が有意であり、また、海馬における Δ FosB 陽性ニューロンの数が有意に増加していた。一方、ExCRS では、CRS における体重減少や精神症状からの回復が有意で、 Δ FosB 陽性ニューロンの数も有意に減少していた。

海馬 SWR の発生頻度は、HC と比較して CRS での減少が有意であり、ExCRS では有意に回復していた。SWR 持続時間、周波数、および、振幅では有意差は認められなかった。

全記録時間のうち海馬 theta リズムが占める時間比率は、HC と比較して CRS で有意に減少し、ExCRS で優位に回復していた。theta リズムの出現頻度と持続時間も同様の傾向を示した。

さらに、脳切片の免疫組織化学的染色による解析では、海馬の神経幹細胞 (Sox2 陽性) の数は HC と比較して CRS で有意に減少し、ExCRS で有意に回復していた。海馬のミクログリア (Iba1 陽性) の数は 3 群間で有意差がなかった。一方、海馬のミクログリア突起の数と全長は、HC と比較して CRS で有意に減少し、ExCRS で優位に回復していた。

考察

本研究の結果、慢性拘束ストレスによるうつ症状をきたした病態脳にて、SWR と Theta リズムが障害されること、また、その障害が運動により軽減されることが確認された。これまで、意欲の減退や認知機能の障害に掛かる脳病態と、同病態への運動によるリハビリテーション介入の治療効果を、in vivo で評価するのに有用なバイオマーカーはほとんど見出されておらず、本研究で観察された SWR と Theta リズムの障害は、うつ症状などの脳病態の診断、および、同病態へのリハビリテーション介入の効能評価と至適化に資するバイオマーカーとして有用であると考えられる。

SWR は海馬 CA3 錐体細胞が同期し発火することにより生じるが、同細胞の活動は内側中隔からのアセチルコリン線維入力で抑制され、GABA 線維入力で促進される。一方、Theta リズムは内側中隔 GABA 線維が海馬 CA1・CA3 介在ニューロンに投射し、同錐体細胞を脱抑制することにより生じることが知られている。よって、慢性拘束ストレスによるうつ症状下での SWR と Theta リズムの障害は、ストレスによる内側中隔の機能不全に起因すると考えられる。

さらに、うつ症状などの脳病態にあずかることが報告されている成体脳神経新生障害や脳内炎症などの脳病変は、うつ症状下における SWR と Theta リズムの障害の生起と相関すること、また、それら脳病変は運動により緩和されることが本研究で確認された。

論文審査の結果の要旨

1. 審査論文の要旨

【目的】 うつ病などの意欲や認知機能の障害に掛かる脳病態に対するリハビリテーション介入は主に運動療法が用いられるが、その作用メカニズムは未解明であり、それら脳病態と運動の効果を In Vivo で評価するバイオマーカーも不明である。うつ病では海馬の神経活動が障害を受けることが報告されており、海馬脳波で観察できる記憶や学習に関与する theta リズムや sharp wave and ripples (SWR) が影響を受けることが予測される。本研究では、うつ病モデルマウスを作成し、運動がうつ症状に及ぼす影響を海馬の脳波 theta リズムと SWR により in vivo で評価し、その治療効果のバイオマーカーとなる可能性を探ることで、うつ病の神経基盤を解明することを目指す。

【方法】 8週齢の C57BL6 マウスを用い、普通飼育のみの群 (HC)、毎日4時間ずつ3週間の慢性拘束ストレスを与えた群 (CRS)、慢性拘束ストレス負荷時以外はランニングホイール付きケージで自発運動した群 (ExCRS) の3群に分けた。行動学的解析は Forced swim test (FST)、Open field test (OFT)、Novel object recognition test (NORT) により行った。行動学的解析後、麻酔下で電極をマウス海馬 CA1 に刺入し、脳波を記録した。そして、MATLAB のプログラムコードにより、SWR や theta リズムの抽出や周波数などの解析を行った。海馬脳波記録終了後、マウスを4%パラフォルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液にて灌流固定し、脳を剖出し、脳切片の免疫組織化学的染色を行った。

【結果】 HC と比較して CRS では、体重の減少、FST での無動時間の増加、OFT でのフィールド中央への侵入回数と滞在時間の減少、NORT での新規物探索時間の減少が有意であった。一方、ExCRS では、CRS における体重減少や精神症状からの回復が有意であった。海馬 SWR の発生頻度は、HC と比較して CRS での減少が有意であり、ExCRS では有意に回復していた。海馬 theta リズムが占める時間比率は、HC と比較して CRS で有意に減少し、ExCRS で優位に回復していた。さらに、脳切片の免疫組織化学的染色による解析では、海馬の神経幹細胞 (Sox2 陽性) の数は HC と比較して CRS で有意に減少し、ExCRS で有意に回復していた。

【考察】 本研究で観察された SWR と Theta リズムの障害は、うつ症状などの脳病態の診断、および、同病態へのリハビリテーション介入の効能評価と至適化に資するバイオマーカーとして有用であると考えられる。海馬脳波の SWR や theta リズムは内側中隔から海馬への入力によって調節されていることが報告されており、慢性拘束ストレスによるうつ症状下での SWR と Theta リズムの障害は、ストレスによる内側中隔の機能不全に起因すると考えられる。さらに、成体脳神経新生障害などの脳病変は、うつ症状下における SWR と Theta リズムの障害の生起と相関し、運動により緩和されることが本研究で確認された。

2. 審査内容

主査の明智より①今回のモデルではうつ病の要因としては何が考えられるか、②各群のサンプルサイズは妥当であるか、③うつ病のモデルにおいてなぜ認知機能に注目したのか、④今後どのような形で臨床応用させていきたいか、など7項目にわたり質問があった。第一副査の松川教授より①本研究は何を明らかにしようとしたのか、②脳波測定の実験の手技はどうであったか、③海馬脳波 theta リズムや SWR はどのように抽出したのか、など計13項目にわたり質問があった。第二副査の音羽教授より①拘束ストレスによるうつ様モデルマウスの妥当性はどうか、②運動による海馬 theta リズムの改善をどう考察したか、③うつ病患者にどのように運動を促していくと良いと考えているか、など計13項目にわたり質問がされた。これらの質問に対し、概ね満足すべき返答を得ることができ、学位論文の趣旨を十分に理解していると判断した。本研究は、自発運動がうつ病の精神行動のみならず、海馬 theta リズムや SWR も改善させることを明らかにし、臨床においても海馬脳波がうつ病のバイオマーカーとなりうる可能性を示した。よってこれらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 明智 龍男 副査 松川 則之 音羽 健司