

## 社会的ストレスが脳脊髄液循環の恒常性に与える影響

今野 花 (筑波大学生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学生命環境系)

## 【背景と目的】

社会的ストレスは他個体からの攻撃を受けることなどにより生じる精神的ストレスであり、うつ症状や認知機能の低下との関連が注目されている。社会的ストレスは複数の脳領域で神経炎症を引き起こすことが知られており、その要因として脳脊髄液(CSF)の関与が疑われている。CSFは脳室とくも膜下腔を循環し、その一部が脳室から脳実質へ浸透することで神経細胞への栄養供給や老廃物の除去を担う組織液である。CSFは免疫細胞や炎症性サイトカインの輸送においても重要な役割を果たす。先行研究では、ストレス条件下でマウスの脳室内を流れるCSFの流速が低下することが報告されている。また、ヒトのうつ病患者の死後脳においてCSF循環の制御因子である水チャネルタンパク質 Aquaporin 4 (AQP4)の発現量が低下していることが見出されている。AQP4は脳室壁を構成する上皮細胞とアストロサイトの細胞膜上に発現しており、CSF循環の形成において重要な役割を果たすとされている。しかしながら、社会的ストレス下でCSFの動態を制御する詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、本研究では脳室-脳実質境界領域である脳室壁に着目し、社会的ストレス下でCSFの浸透を制御するメカニズムを解明することを目的とした。

## 【実験方法】

## (1)社会的敗北ストレス

2-3ヶ月齢のC57BL/6マウス(B6)に対し、社会的敗北ストレスを与えた。攻撃者としてCrl:CD1マウス(ICR)を用いた。飼育ケージを透明な仕切り板で2等分し、片側の分画でICRを単独飼育した。1日あたり10分間B6をICRが存在する分画に導入して敗北経験を与えたのち、仕切り板を挟んだ隣の分画にB6を移動させ、24時間飼育した。24時間後、B6を異なるICRを飼育するケージに移動させ、同様の実験を行った。これを10日間繰り返し、10回目に敗北経験を与えてから1時間後にエバンスブルーを局所投与した。

## (2)エバンスブルーの側脳室投与

社会的ストレスを与えたマウスおよび2-3ヶ月齢の野生型(WT)マウスに、CSF中のアルブミンを染色するエバンスブルーを局所投与した。はじめにイソフルランで麻酔し、脳定位固定装置に固定した。側脳室に注入するために、5 $\mu$ lハミルトンシリンジをブregマからAP: +0.5 mm, ML: +1.0 mm, DV: -2.5 mmの位置に挿入した。その後エバンスブルーを0.2 $\mu$ l/minで1 $\mu$ l投与した。注入3時間後に灌流固定を行い、脳を摘出し、4%PFA/PBSを用いて一晚浸透固定した。その後30%スクロース/PBS溶液で置換し、30%スクロース/OCT compound (1:1)で包埋した。その後クライオスタットを用いて厚さ50 $\mu$ mの冠状断面の切片を作製した。作製した凍結切片は、5%BSA/0.25%Triton X-100/PBSを用いて室温で1時間処理した。Hoechst33342(1:1000)で核を染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてエバンスブルーの浸潤を観察した。

## (3)ウェスタンブロッティング

マウスの前脳と視床下部を摘出したのち氷上でホモジナイズして組織抽出液を作成し、Bradford法でサンプルのタンパク質濃度を測定した。その後、アクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF膜へ100Vで60分間の転写を行った。PVDF膜は、5%スキムミルク/TBS-Tでブロッキングした後、抗Tubulin抗体(1/5000)、抗Aqp4抗体(1/1000)を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。その後、TBS-Tで洗浄し、HRP標識二次抗体(1/20000)を1時間反応させ、化学発光試薬で検出した。

## (4)リアルタイムqPCR

マウスの前脳からISOGEN IIを用いてtotal RNAを回収した。回収したRNAをReverTra Aceを用いて逆転写し、cDNAを作成した。SYBR green qPCRを用いてqPCRを行い、M1-AQP4、M23-AQP4、PKA catalytic subunit  $\beta$  (PKAc $\beta$ )のmRNA量を定量した。

## 【結果・考察】

はじめに、CSFの脳実質への浸透量が社会的ストレスによって変化するか検証した。その結果、社会的ストレスを与えたマウスにおいて第三脳室周辺領域に浸透するエバンスブルーの面積が減少する傾向が見られた。このことから、社会的ストレスによって脳室から脳実質へのCSFの浸透が減少する可能性が示唆された。

次に、AQP4の発現量が社会的ストレスの影響を受けるか検証するため、マウス前脳組織のリアルタイムqPCRを行い、AQP4の2つの主要なアイソフォーム(M1-AQP4, M23-AQP4)と、AQP4の細胞内輸送に関与するPKAc $\beta$ のmRNA量を定量した。その結果、社会的ストレスを受けたマウスにおいてこれらmRNAがいずれも増加していた。そこで、社会的ストレスによってAQP4のタンパク質発現量が上昇するか明らかにするために、マウスの前脳と視床下部組織のウェスタンブロッティングを行い、AQP4のタンパク質を検出した。その結果、AQP4タンパク質の発現に大きな違いは見られなかった。

以上の結果から、社会的ストレスはAQP4の転写を促進するが、翻訳抑制あるいは分解促進など何らかのメカニズムによってAQP4タンパク質レベルの増加は抑制される可能性が示唆された。

## 【展望】

本研究では、社会的敗北ストレスモデルを用いて、社会的ストレスがCSFの浸透を減少させることを明らかにした。また、社会的ストレス条件下におけるCSF動態の制御にAQP4が関与している可能性があることを示した。今後は、脳室周辺の上皮細胞やアストロサイトにおけるAQP4の局在を観察するために免疫蛍光染色を行う予定である。また、PKAをはじめとするAQP4制御因子の発現量や活性を定量することで、社会的ストレス下でAQP4の発現や局在を通じてCSFの浸透を制御するメカニズムを明らかにしたいと考えている。