

社会敗北ストレス負荷による CGRP 欠損マウスの行動への影響

奥島 千裕・下西 陽大・橋川 直也・橋川 成美

岡山理科大学大学院 理学研究科 臨床科学専攻

(2020年10月29日受付、2020年12月11日受理)

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) をマウス脳室内に単回投与することで抗うつ様作用を示すことを報告してきた。しかし CGRP が恒常的に発現していない状態のストレスによる行動への影響は明らかになっていない。そこで CGRP ノックアウト (KO) マウスを用いて社会敗北ストレスを負荷し、行動への影響を解析した。一般行動試験であるオープンフィールドテスト、社会行動性試験を 14 日間のストレス負荷後に評価した。自発行動量は野生型マウスにおいてストレス曝露による減少が見られたが、CGRP KO マウスにおいてはストレス負荷による影響は見られなかった。また、社会行動性においては、CGRP 欠損により社会行動性の有意な減少が見られたものの、ストレスによる影響は見られなかった。以上の結果より、CGRP の恒常的な欠損においては、ストレスによる自発行動量には変化を示さないものの、社会行動性はストレスの有無にかかわらず減少することが明らかとなった。

1. 緒言

日本が発展していくなかでライフスタイルは大きく変化してきた。それに伴い、働き方や人との関わり方にも変化が見られるようになってきた。これらの環境の変化に適応できず、ストレスを抱えることで精神疾患を発症する可能性が高くなる。精神疾患には不安障害やうつ病などがある。特にうつ病においては精神疾患の内訳を見ても多く、患者数が増加傾向にある¹⁾。うつ病の症状として不安やイライラ、気分の落ち込みが見られる。また、精神面だけではなく、頭痛や睡眠障害など身体面にも影響すると言われている。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene related peptide ; CGRP) は 37 個のアミノ酸からなる神経ペプチドの一種であり、カルシトニンと CGRP をコードするカルシトニン遺伝子の選択的スプライシングによって生じる。中枢神経系や末梢神経系に広く分布しており、血管拡張作用、心拍数増加、心筋収縮力増大、片頭痛などの生理作用がある。我々の研究室では CGRP 単回投与で抗うつ作用を示す²⁾ことを報告してきた。しかし CGRP が発現しない状態でのストレスによる行動への影響は明らかになっていない。そこで CGRP ノックアウト (KO) マウスを用いて、社会行動ストレスを与え、行動への影響を検討した。

2. 実験材料および実験方法

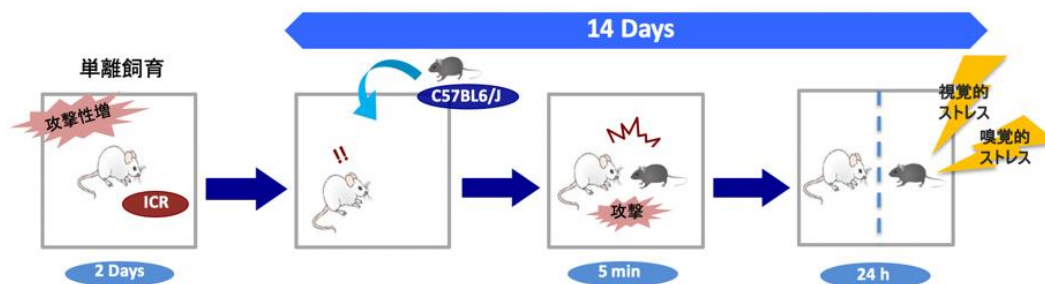
2-1 実験動物

実験動物に用いた全ての動物は岡山理科大学動物実験管理委員会の承認を得ており、規定に従った条件下において飼育した。承認番号 2020-08, 2020-09。岡山理科大学の飼育室にて、室温 23±2 度に保ち、明暗サイクルは 12 時間毎 (朝 7 時点灯、夜 7 時消灯) とし、自由給餌法にて飼育し、飲料水として水道水を与えた。CGRP KO マウス (KO) は理化学研究所のバイオリソースセンターから提供を受け(B6.129S6-Calca^{tm1Hku})、岡山理科大学で繁殖させ、8 週齢の雄性マウスを用いた。対照群として 8 週齢雄性 C57BL/6J マウス (清水実験材料より購入) を野生型マウス (wild-type: WT) として用いた。マウスのストレス負荷には社会敗北ストレスを用い、14 日間連続してストレスを負荷した。

2-2 ストレス負荷方法

マウスのストレス負荷には、社会敗北ストレスを行った。8 週齢雄性 CGRP KO マウスおよび 8 週齢雄性 C57BL/6J マウスを ICR マウスの入ったケージ内に毎日 5 分間滞在させ、恐怖と敗北ストレスを与えた。その後、

穴の空いた透明の仕切りを設置して、2匹を分離飼育し、継続的に視覚、嗅覚的ストレスを与えた。これを14日間連続して行い精神的ストレスを与えた。



2-3 行動試験による評価

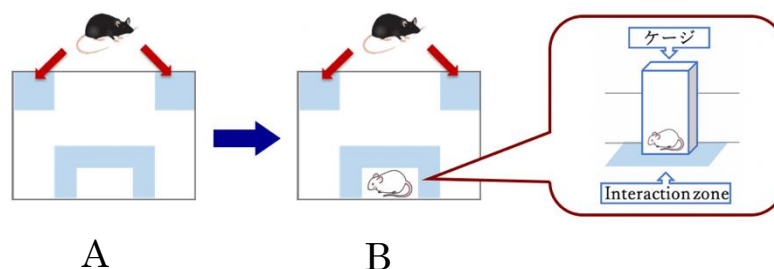
行動の評価には、オープンフィールド試験、社会行動試験を用いた。

Open field test ; オープンフィールド試験

円形のオープンフィールド槽（直径 57.5 cm, 高さ 32 cm）の中央に 19 分画したシートを敷き、マウスを入れて 3 分間の行動を観察し、区間横切り回数を測定した。

Social interaction test ; 社会行動試験

四角形のフィールド槽の一角に空気穴の開いた透明なケージを設置し、その周囲（12cm×25.5cm）を interaction zone とした。左右いずれかの角から入れ、2 分 30 秒間の行動を観察した。マウスが透明なケージ周囲の interaction zone に滞在した時間を測定した。これを測定結果 A とした。その後、透明なケージ内に攻撃性の強い ICR マウスを入れた状態でマウスをフィールド槽内の角から入れ、同様に 2 分 30 秒間における interaction zone の滞在時間を測定した。これを測定結果 B とした。社会行動性は、測定結果 B /測定結果 A を求めることにより評価した。



2-4 統計学的解析

得られたデータ値を平均値±標準誤差（Mean±S.E.M）で表した。また、Two-way ANOVA を用いて統計的処理を行い、有意水準 5%以下を有意差ありと判定した。Two-way ANOVA にて交互関係が有意に見られた場合、One-way ANOVA 後 Tukey's test を行った。

3. 結果

3-1 ストレス負荷による一般行動への影響

ストレス負荷による一般行動への影響を評価するため、14 日間のストレス負荷の翌日に円形のオープンフィールド槽にマウスを入れ、3 分間の自発行動量を観察した。得られた結果を Two-way ANOVA にて解析した結果、stress と CGRP 遺伝子存在の要因において有意な交互関係があったため、One-way ANOVA 後に Tukey's テストを行い、全群を比較した。その結果、CGRP 野生型マウスにおいて、ストレスを負荷することにより有意に自発行動量の減少が見られた。一方 CGRP ノックアウトマウスにおいてはストレス負荷による変化は見られなかった（Fig. 1）。

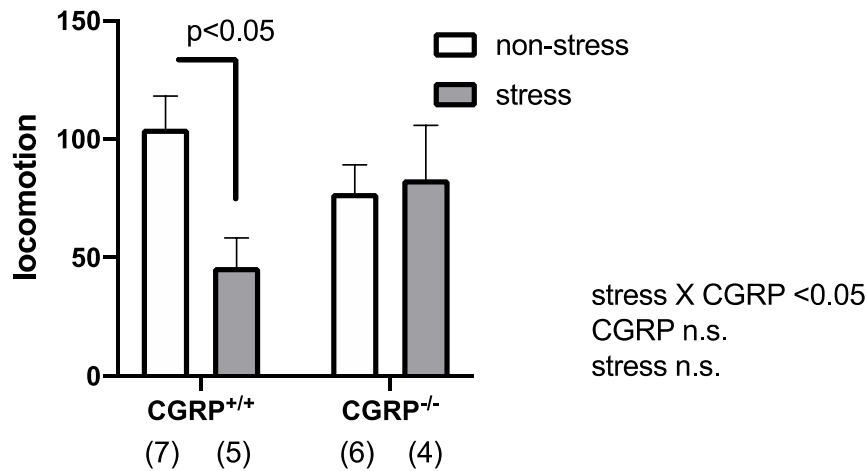


Fig. 1 ストレス負荷による一般行動への影響

カッコ内の数字は各群の n 数を表している。Stress と CGRP で交互作用が有意に認められたため、全群比較を Tukey's テストにより行った。The each bar indicates mean ± SEM, Two-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

3-2 ストレス負荷による社会行動性への影響

次に、社会行動性の変化を評価するため、社会行動試験を行った。得られた結果を two-way ANOVA にて解析した結果、stress と CGRP 遺伝子存在の要因における交互関係は有意差が見られず、stress 負荷における社会行動性への影響においても有意な差は見られなかった。一方、CGRP 遺伝子欠損により社会行動性は野生型マウスと比べて有意に減少していた (Fig. 2)。

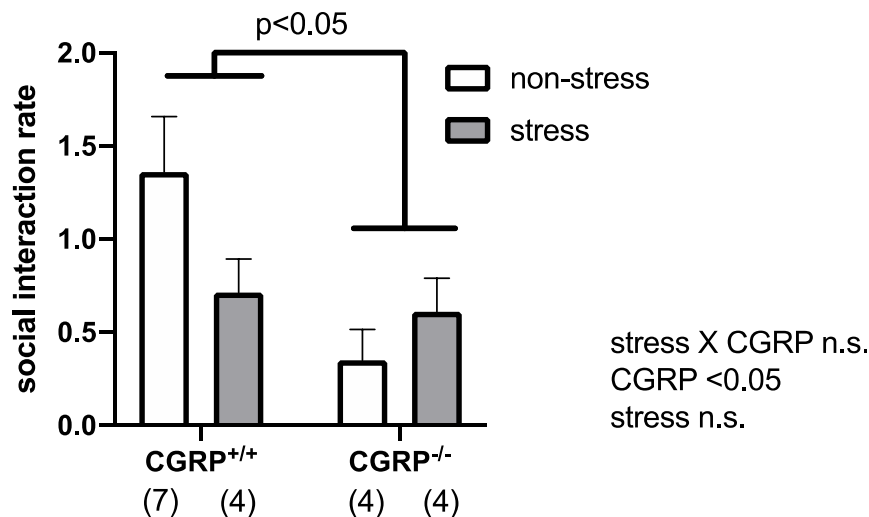


Fig. 2 ストレス負荷による社会行動性への影響

カッコ内の数字は各群の n 数を表している。Stress と CGRP における交互作用、stress 負荷における社会行動性への影響は認められなかった。CGRP 遺伝子要因において有意に差が見られた。The each bar indicates mean ± SEM, Two-way ANOVA.

4. 考察

本研究では恒常的に CGRP が発現しない状態でのストレスによる行動を解析することを目的として CGRP KO マウスを用いて行動試験を行い検討した。一般行動試験としてオープンフィールド試験を行い、マウスの自発行動量を評価した。この試験はマウスにとってこれまで経験したことのない環境であることから、そこで認められる様々な行動はマウスの情動性を評価するための有用な指標となる³⁾。マウスには探索行動を行う習性があり、自発行動量はこれに含まれる。以前、うつ様行動変化を伴う軽度のストレス (CUMS) 誘発ラットモデルを使用した研究ではオープンフィールド試験はうつ様表現の評価に関連する試験であることが報告されている。また、この試験の際にストレスにさらされることで静止時間の延長、水平および垂直方向の動きは減少することが確認されている⁴⁾。今回の結果においても野生型マウスにおいてはストレス負荷により自発行動量は減少傾向にあることが判明した。

ストレス負荷方法には拘束ストレスや母子分離ストレスなど様々な方法がある。拘束ストレスとはマウスを拘束し動けなくする方法である。拘束するための方法として円筒形のプラスチックや金網に包み込む方法や、マウスを仰向けにして板の上に絆創膏などで固定する方法などがある⁵⁾。母子分離ストレスは母子を離すことにより、子のマウスにストレスを負荷する方法である。このストレス負荷によって成体における血清コルチコステロンの定常状態における値が有意に上昇し、扁桃体延長領域にストレス応答による障害が起こることが報告されている⁶⁾。本実験で用いたストレス負荷方法は社会敗北ストレスであり、自分より体の大きい ICR マウスから攻撃を受けることによって、常に社会な敗北感を与えるストレス方法である。このストレスに曝露されたマウスは、ストレス曝露が終わってからも非常に長い期間社会行動性が低下し、抗うつ薬の長期投与により低下した社会行動性が改善することが報告されている^{7,8)}。よって、社会行動性をうつ様行動の一つとして考えることができる。ICR マウスより攻撃を受けたマウスは、外傷が背中や尾に多くできるため、うつ様行動評価方法として一般的に汎用されている強制水泳試験や尾懸垂試験を本実験では行うことができなかった。その代わりに、本研究においてはマウスの社会行動性をうつ様行動として評価した。社会敗北ストレスを受けていないマウスはオープンフィールド槽内のケージに入っている新奇マウスに興味を示すため interaction zone に近づく時間が長くなる。一方でストレス負荷マウスはストレスを与えられたマウスに回避行動を行うため interaction zone に近づく時間が短くなることや、スクロースの嗜好性が低下し、血清コルチコステロン濃度が上昇することが報告されている⁵⁾。この効果はストレスを与えることを中止してもその後 1 ヶ月は持続することが報告されており⁹⁾、三環系抗うつ薬のイミプラミンやセロトニン再取り込み阻害薬のフルオキセチン投与により社会行動性の改善が認められることから⁸⁾、うつ様行動の評価として様々な実験において使用されている。我々は以前 CGRP の投与によりうつ様行動の改善を報告している²⁾。今回の結果において、WT マウス群に比べ CGRP KO マウス群でストレスの有無にかかわらず、社会行動性が有意に減少していた。社会行動性の低下はうつ様症状の一種と捉えることができるため⁸⁾、CGRP 欠損はうつ様行動に影響を与えることが示唆された。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 患者調査, <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/dl/kanja.pdf>, 2017
- 2) Hashikawa-Hobara N, Ogawa T, Sakamoto Y, Matsuo Y, Ogawa M, Zamami Y, Hashikawa N. Calcitonin gene-related peptide pre-administration acts as a novel antidepressant in stressed mice. *Sci Rep.* 5:12559, 2015.
- 3) 辻稔, 宮川和也, 竹内智子, 武田弘志, 一般行動および抑うつ様行動の評価法, *日薬理誌* 130, 97-104, 2007.
- 4) Congli Hu, Ying Luo, Hong Wang, Shengnan Kuang, Guojuan Liang, Yang Yang, Shaoshan Mai, Junqing Yang. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress., *PLOS ONE.* 12(9): e0185129, 2017
- 5) 田中正敏, 動物実験におけるストレス負荷法, *日薬理誌* 102, 1993: 69~76, 1993.
- 6) Nur Zeynep Gungor, Denis Pare. CGRP Inhibits Neurons of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis: Implications for the Regulation of Fear and Anxiety. *J Neurosci.* 34: 60-65, 2014
- 7) Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* 9: 519-525, 2006.

- 9) Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*. 311: 864–868, 2006.
- 9) Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions., *Cell*. 131: 391-404, 2007.

The effects of calcitonin gene-related peptide deficiency on behavior under conditions of social defeat stress in mice

Chihiro OKUJIMA, Youdai SHITANISHI, Naoya HASHIKAWA,

and Narumi HASHIKAWA-HOBARA

Graduate School of Science, Okayama University of Science

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received October 29, 2020; accepted December 11, 2020)

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a well-known neuropeptide that has potent vasodilator properties and is involved in pain transmission. We have reported that the pre-administration of CGRP ameliorates depression-like behavior caused by chronic (15-day) stress exposure and exerts antidepressant-like effects by increasing the levels of nerve growth factor. However, it remains unclear whether stress affects behavior in the absence of CGRP. Therefore, the present study evaluated whether CGRP-deficient mice exhibit altered behavior under conditions of social defeat stress. Male CGRP-knockout mice were subjected to social defeat stress for 5 min/day for 14 days. Social defeat stress significantly decreased locomotor activity in wild-type mice. Conversely, CGRP deficiency reduced social interactions independently of stress exposure. These results suggest that CGRP deficiency reduces social behavior regardless of the amount of stress.

Keywords: CGRP; mice; social defeat stress; social interaction test; knockout mice.