

恐怖ストレスに対するレジリエンスとうつ病発症を阻止する積極的コーピングを誘導する塩分摂取効果と脳内神経機構の解明

関 健二郎¹, 松木 亨²

¹ 奥羽大学薬学部薬理学分野, ² 愛知県医療療育総合センター発達障害研究所

概要

【研究目的】 当研究室では、高血圧を引き起こさない程度の塩分摂取が、精神的ストレスによる抑うつ症状、特に学習性無力感の形成を抑制し、この時に視床下部のコルチコトロピン放出因子(CRF)が恐怖ストレスを与えても顕著な増加が起こらなくなることを報告してきた。うつ病患者の多くは血中 CRF やコルチゾール濃度が高いことが知られている。これに対し、恐怖精神的ストレス後の心的外傷後ストレス障害患者では血中コルチゾール濃度が低下していることが報告されている。本研究では、恐怖体験後の学習性無力感形成とそれに及ぼす塩分摂取の効果及び視床下部 CRF の関与を調べた。**【研究方法】** 雄性 C57BL/6J マウス(7~10 週齢)に水又は 2%食塩水を 5 日間連続で与え、30 cm³ のボックス内でマウスが本能的に恐怖反応を示す 2,4,5-trimethylthiazoline(TMT)で 10 分間恐怖刺激した。その1時間後に尾懸垂テスト(TST)を 10 分間課し、TST 中の不動時間にて学習性無力感を評価した。また恐怖刺激中のボックス内における行動パターンを ANY-maze ソフトウェアを用いて詳細に解析し、学習性無力感と逆相関するコーピング方略の特定を試みた。

さらに pAAV-PHP.eB ベクターに CRF 遺伝子を挿入したアデノ随伴ウイルス(AAV)を両側の視床下部室傍核に 0.1 µL ずつ投与し、CRF 過剰発現(AAV-CRF)型マウスが塩分摂取によりどのような影響を受けるかを調べた。

【結果と考察】 塩分摂取は、TMT 刺激中にボックスの中央領域への侵入回数を増加させ、恐怖刺激による TST 中の学習性無力感形成を阻止した。また塩分摂取マウスでは、TMT 恐怖刺激中の中央領域侵入回数が TST 中の学習性無力感レベルと逆相関した。これに対し、視床下部で CRF を強制発現させた Hy-AAV-CRF マウスでは、TMT による恐怖精神的ストレス中の中央エリアへ侵入回数や滞在時間は水だけを摂取したマウスと同程度であり、視床下部で CRF を過剰発現させると塩分摂取の効果が消失することが分かった。さらに、Hy-AAV-CRF マウスでは、TMT 恐怖刺激中の行動パターンと学習性無力感レベルとの逆相関性が消失した。以上の結果から、塩分摂取による視床下部 CRF 発現抑制は、恐怖体験後に適切な行動パターンを誘導するコーピング方略を可能にし、その結果として恐怖精神的ストレスによる学習性無力感形成が阻止されることが示唆された。

1. 研究目的

長期精神的ストレスによりうつ病を発症することは多くの研究結果が支持するところである¹⁾。ストレスにより視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸の活性化がコルチゾール濃度を増加させ、コルチゾール濃度上昇が慢性的に持続すると HPA 軸活性化によるコルチコトロピン放出ホルモン分泌抑制機構が破綻して、コルチゾール濃度が増加し続ける²⁾。コルチゾール濃度の持続的な上昇は、脳機能に異変を引き起こし、それが原因でう

つ病を発症すると考えられている³⁾。恐怖ストレスは、コルチコトロピン放出ホルモンの分泌を促進し、HPA 軸活性化によりコルチゾール濃度上昇を引き起こすが⁴⁾、恐怖ストレスによって発症する心的外傷後ストレス障害(PTSD)患者ではむしろ血中コルチゾール濃度が低いこと⁵⁻⁷⁾、一方うつ病患者では血中コルチゾール濃度が高いことなど⁸⁾、一見矛盾した病態生理を呈することが明らかとなっている⁹⁾。しかし、実際には PTSD

患者のおよそ 50%がうつ病を併発することが、PTSD やうつ病に対するコルチゾールの関与の理解を複雑にしている¹⁰⁾。

精神的ストレスに対する積極的コーピングは、心理学の分野で広まった「レジリエンス(ストレスを跳ね除ける力)概念」の資質的要因として精神医学の分野、特にうつ病や PTSD 研究で注目されている。これは、同じ精神的ストレスを受けてもうつ病や心的外傷後ストレス障害 (PTSD) を発症する確率がおよそ 10 人に 1~2 人であることから¹¹⁾、精神的ストレスや恐怖記憶に対するレジリエンスを有しており、レジリエンスの資質的要因である積極的コーピングがストレスを跳ね除けてうつ病や PTSD 発症を阻止するという仮説である¹²⁾。最近、数日間の過剰な塩分摂取により、精神的ストレスに対して積極的コーピングが増強されることがマウスを用いた実験で相次いで報告された^{13,14)}。両者とも抑うつ症状の一つの指標である学習性無力感形成の評価実験として広く用いられている強制水泳試験¹⁵⁾で積極的コーピングレベルの増強を確認している。そのため、一見すると数日間の過剰な塩分摂取がうつ病患者に特有な学習性無力感形成を阻止する可能性を示唆している。さらに、塩分摂取制限は、ラットの不安レベルを増強することが報告され¹⁶⁾、さらにヒトでも塩分摂取制限が精神的ストレスを増加することが報告された^{17,18)}。食塩水摂取によりストレスに対して積極的コーピングが増強したマウスでは、視床下部におけるコルチコトロピン放出ホルモンの遺伝子発現レベルが顕著に低下することが報告された¹³⁾。この結果は、食塩水摂取マウスの積極的コーピングの増強に視床下部のコルチコトロピン放出ホルモン分泌の低下が関与している可能性を示唆する。これまでの食塩摂取と積極的コーピングの増加、食塩摂取による抗うつ効果などの結果から、脳内視床下部におけるコルチコトロピン放出ホルモンの過剰な分泌が恐怖ストレス時における適切な積極的コーピングの誘導を阻止し、その結果 PTSD やうつ病発症を引き起こしている可能性が考えられる。逆に、視床下部のコルチコトロピン放出ホルモンの過剰な分泌を阻害すれば、恐怖精神的ストレス時における積極的コーピングを誘導し、それによって PTSD やうつ病発症を阻止できる可能性を示唆する。

そこで本研究では、アデノ随伴ウイルスにコルチコトロピン放出ホルモン (CRF) 遺伝子を挿入し、それによって精製したウイルスを視床下部に投与して視床下部だけで

CRF を過剰発現させ、マウスが本能的に恐怖反応を引き起こす 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT) の臭い刺激を与え、恐怖ストレス時のコーピング方略とそれによって影響を受けるとされている学習性無力感形成との関係を調べ、食塩水摂取の効果と視床下部の CRF 発現との関係を調べた。

2. 研究方法

2.1 動物

奥羽大学動物実験委員会により承認された動物実験計画書に基づいて行った (No. 2018-29, 2019-39)。室温は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持し、明暗サイクル (明期; 8:00 - 20:00, 暗期; 20:00 - 翌 8:00) の下、自由に餌と水を摂取する環境の下、1 ケージに 5~6 匹飼育した。実験には、6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本 SLC または日本クレアより購入し、最低 1 週間動物舎で飼育し、7~10 週齢の間でテストした。

2.2 恐怖刺激と恐怖反応 (Freezing) 測定

本研究では、マウスが新しい環境でどのような行動パターンを取るかを観察するために、事前に TMT 試験に用いるテストボックスに馴化させずに行った。マウスが本能的に恐怖反応を示す 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) (Contech (Canada)) 原液を滴下するためのろ紙 (D: 2 cm, Cat#: 1001-025; Whatman GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK) を、側面を白紙で覆ったアクリルボックス (W: 294 mm × D: 294 mm × H: 297 mm) の一角 (実験者から見て左手前の一隅) に固定し、TMT を滴下する 5 分前は自由行動パターンを測定し、5 分経過した時点で TMT を 20 μL 滴下して 10 分間恐怖環境下におけるマウスの行動パターンを観察した。テストボックスは、中央 (central zone)、回避エリア (avoidance zone)、TMT 側の半分のエリア (unavoidance zone)、TMT を滴下した床面 4 分の 1 に相当するエリア (TMT zone)、周囲エリア (peripheral zone) に分けし、マウスの恐怖反応は、TMT 滴下後の 10 分 (5 分 × 2) における各ゾーンの滞在時間、移動距離、侵入回数、さらにすくみ反応 (Freezing) 時間で評価した (Figure 1A-E)。

2.3 行動解析

マウスの行動解析 (freezing 時間や移動距離、滞在時間、エリア侵入回数) は、テストボックス上部から web カメラ (C920r, ロジクール) にて撮影し、それを ANY-maze

software (version 5.2, Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いてマウスの行動を追跡して解析した。Freezing 時間は、マウスが呼吸以外の動きを 1 秒間以上止めた時点で freezing 反応を示したと評価し、その持続時間の合計で評価した。Freezing 時間は、TMT 滴下 5 分前から滴下 10 分後までの計 15 分間を 1 分毎に測定して恐怖反応レベルの時間経過を調べ、さらに恐怖環境下での逃避行動パターンを TMT 刺激中の前半と後半の 5 分毎に評価を行った。

2. 4 尾懸垂テスト(TST)

尾部 2~3 cm の部分を S 字フックに固定し、ボックス内上部(高さ 42 cm)に取り付け、10 分間ビデオ撮影し、5 分毎の不動時間を測定した。

2. 5 高架式十字迷路による不安レベルの評価

高架式十字迷路(ブレインサイエンスアイデア)を用いて、10 分間の試験中に、マウスが center area 及び open arm (壁のない通路)に滞在した時間を測定し、その割合をもとに Any maze を用いて 不安レベルの評価を行った。

2. 6 アデノ随伴ウイルス(AAV)

本実験は、組み換え遺伝子実験の承認を得て行われた(No.2019004)。pAAV-PHP.eB ベクター(Addgene #103005)(両端を ITR 部分)の U6 プロモータの 5'側に shRNA-CRF (AGATTATCGGGAAATGAAA)を、CAG プロモータの 5'側に EGFP タグ配列を挿入して pAAV-crf-KD 遺伝子を作成した(#85741, Addgene, Watertown, MA, USA)。また、pAAV-PHP.eB ベクター(両端を ITR 部分)の U6 プロモータの 5'側に CAG プロモータを挿入し、CRF 遺伝子と T2A-RFP 遺伝子と FLAG タグ遺伝子(pCAGGS)を挿入して pAAV-CAGGS-CRF-OE (pAAV-CRF-OE) 遺伝子を作成した。これを HEK293T 細胞に PEI キットにてトランスフェクションし、得られたウイルスを AAVpro Concentrator (密度勾配遠心分離法)にて目的の濃度(1×10^{12} vg/mL, real time PCR にて力価を測定)まで濃縮した。CRF 遺伝子の発現レベルは、プラスミドの挿入した FLAG タグに対する一次抗体 (#015-22391, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., Tokyo, Japan) を検出することで確認した。

2. 7 脳内ウイルス投与法

全身麻酔薬(塩酸メドミジン 0.3 mg/kg, ミダゾラム 4 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg)で麻酔したマ

ウスを脳定位固定装置(Narishige group, SR-6M, Tokyo, Japan) に装着し、視床下部 (AP: +1.10 mm, L: ± 2.50 mm, DV: 3.54 mm)に、グルタミン酸受容体刺激薬で強力な神経毒性を有するイボテン酸をニューロシリンジ (32-guage, 7000.5, #65457-02, Hamilton Co., Japan)を用い、30 秒ごとに 0.01 μ L ずつ投与し、片側計 0.125 μ L のウイルスを両側に投与した。ウイルス投与 2 週間後に行動実験を行い、行動実験後に脳を採取して、後日に投与部位が視床下部であるか否かの確認は、GFP または RFP の一次抗体と CRF の一次抗体との共染色を行い、CRF がノックダウンされたか、もしくは過剰発現しているかを確認した。もしウイルス投与が目的の視床下部以外の場合は、本結果から除外した。

2. 8 免疫染色

TMT 刺激 2 時間後にマウスを塩酸メドミジン 0.3 mg/kg (和光純薬)+ミダゾラム 4 mg/kg(サンド株式会社)+酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg (和光純薬)の 3 種混合麻酔を行い、胸部切開により心臓を露呈し、左心室に冷却した 0.1 M リン酸バッファー(PBS)を投与し、直ちに右心房を切開して還流した。5 mL の PBS を還流後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)を 15 mL 還流して固定し、脳を採取して、48 時間 4°C の 4%PFA 内でさらに固定し、その後 30%スクロースに置換して脱水した。脱水後は視床下部を含む脳ブロックを凍結組織切片作製用包埋剤(No. 4566, ティッシュテック, サクラファインテックジャパン)で包埋し、-80°Cで 30 分間凍結した。その後、-20°Cの冷凍庫で保管した後、クリオスタット(CM1100, Leica, Wetzlar, Germany)で 20 μ m の薄切切片を作成してスライドガラス(CRE-01, クレストホワイト, 松浪硝子工業)上に 3~4 切片ずつ張り付けて乾燥させた。作成した脳切片は、PBS で洗浄後、0.01% Triton-X100 で処理し、その後クエン酸バッファーで加熱することで抗原抗体反応の賦活化した。その後、10%ロバ血清を含む PBS で 20 分間ブロッキングし、続けて Rabbit polyclonal anti-CRF (1:100, H-019-06, Phoenix Pharmaceuticals)および mouse monoclonal anti-c-fos antibody (1:50, SC-166940, Santacruz, USA)を一晩処置した。翌日、PBS で一次抗体を 10 分間 3 回洗浄し、続けて二次抗体をそれぞれ Donkey anti-rabbit IgG-alexa 488 (Cat.#ab150073, Abcam, Cambridge, MA, USA) と Donkey anti-mouse IgG-alexa555 (Cat. #ab150074,

Abcam) で室温で1時間処置した。二次抗体を PBS で 10 分間 3 回洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium (H-1000, VECTOR, Burlingame, California, USA) 用いてカバーガラスを付け、数分乾燥させた後に共焦点顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss, Germany) にて 20 倍および 40 倍レンズを用いて CRF と c-fos 由来の蛍光画像を取得した。画像データ上の白線の長さは全て 50 μm とする。

2.9 統計

2 群間の相関は、Kolmogorov-Smirnov テストで正規性を検定し、有意差がある場合は Pearson の積率相関係数で、正規性が認められない場合は Spearman の順位相関で算出して有意性を確認した。TMT 実験および TST 実験については、Two-way repeated measures ANOVA で分散分析検定を行い、その後 t-test または Bonferroni post hoc test にて群間比較を行った。CRH の発現率に関しては、One-way repeated measures ANOVA で分散分析した後、Bonferroni post hoc test にて群間比較を行った。全ての統計計算は、EZR ソフトウェアを用いて検定した¹⁹⁾。

なお、 $p < 0.05$ の時に有意差ありとし、 $p < 0.01$ の時に「**」と表記し、 $p < 0.05$ の時は「*」で表記した。

3. 結果と考察

3.1 恐怖感受性に及ぼす塩分摂取の効果

TMT による塩分摂取マウスのフリージング時間は、水摂取マウスのフリージング時間と同程度であり、塩分摂取が恐怖感受性に影響を及ぼさないことが分かった (Fig. 1C)。水摂取マウスでは、TMT 匂い刺激による恐怖環境下において中央エリア内の移動距離はフリージング時間と逆相関し、これは中央エリア内の滞在時間も中央エリアへの侵入回数もいずれもフリージング時間と逆相関する (Fig. 1A-B, D-F)。ところが、塩分摂取マウスの中央エリア内の移動距離や滞在時間、侵入回数が多いため (Fig. 1A and B)、フリージング時間との相関については、水摂取マウスと比べて相関係数が有意ではあるものの小さくなる傾向が認められた (Fig. 1A-B, D-F)。また、TMT による恐怖刺激後の尾懸垂テスト (TST) では、塩分摂取マウスの方が、不動時間が顕著に短く、塩分摂取が積極

的コーピングを増強していることが示唆された (Fig. 1G)。水摂取マウスでは、TMT により多くのマウスで不動時間が長くなるために、不動時間と TMT 刺激中の中央エリア内の移動距離や滞在時間、侵入回数がいずれも相関しないことが分かった (Fig. 1H-J)。ところが、塩分摂取マウスでは、積極的コーピングが増強するために、TST 中の不動時間が TMT 刺激中の中央エリア内の移動距離や侵入回数と有意に逆相関することが分かった (Fig. 1H and J)。ただし、滞在時間だけは相関性が認められなかった (Fig. 1I)。

3.2 不安行動に及ぼす塩分摂取の効果と TST 中の積極的コーピングとの関係

TMT による恐怖刺激中の塩分摂取マウスの中央嗜好性が高かったことから、不安レベルの違いが恐怖刺激中の中央エリアへの滞在時間や侵入回数、中央エリア内の移動距離を増加させ、それが TST 中の積極的コーピングを引き起こしている可能性が考えられる。そこで、塩分摂取マウスでは恐怖感受性ではなく不安レベルの違いが TST 中の積極的コーピングレベルに影響している可能性を考え、高架式十字迷路によりマウスの不安レベルを測定し、それらが TST 中の積極的コーピングレベルと相関するか否かを調べた。塩分摂取マウスでは、高架式十字迷路のオープンアーム内の移動距離、侵入回数、滞在時間全てで水摂取マウスよりも有意に増加することが分かった。また、中央エリア内の滞在時間も塩分摂取マウスの方が水摂取マウスよりも有意に長かった (Fig. 2C-G)。一方、塩分摂取マウスの TST 中の不動時間は、水摂取マウスと同レベルであった (Fig. 2H-J)。そこで、TST 中の不動時間が高架式十字迷路におけるオープンアームの移動距離、侵入回数、滞在時間と相関するか否かを調べたところ、前半 5 分 (Fig. 2K-M) と後半 5 分 (Fig. 2N-P) 共に水摂取および塩分摂取マウスで相関は認められなかった。以上の結果から、TMT による恐怖刺激中の中央嗜好性が TST 中の不動時間と相関するのは、不安レベルの低下というよりも恐怖環境下で逃避に対するモチベーションによることが明らかとなった。

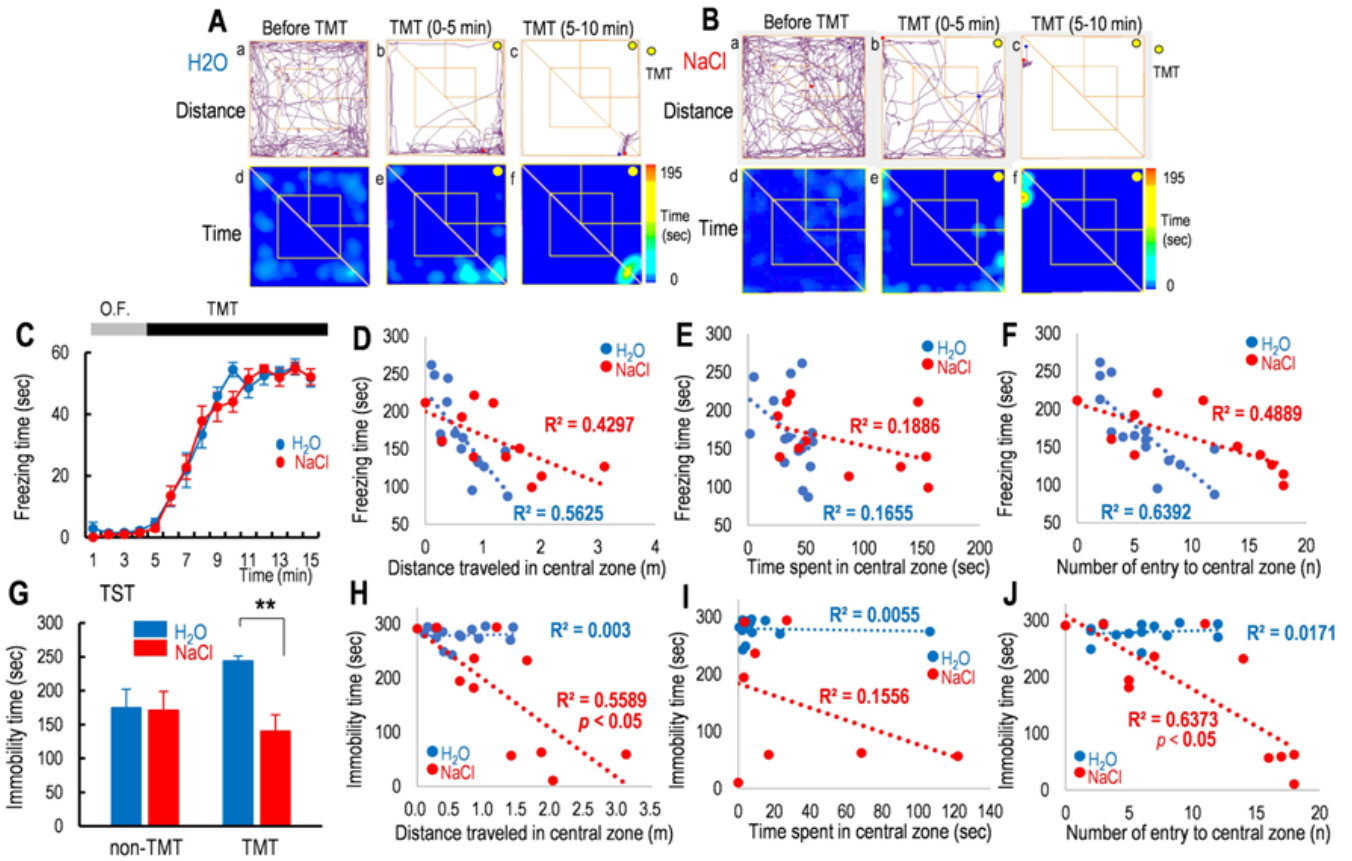


Fig. 1 Effects of salt intake on the behaviors and the freezing during TMT and the active coping behavior during TST

- (A) Behavioral patterns of water-intake mice before, during and 5 min after inescapable fear stress of TMT,
 (B) Behavioral patterns of high salt-intake mice before, during and 5 min after inescapable fear stress of TMT, a~c: distance traveled, d~f: time spent in,
 (C) Freezing time during TMT-induced fear stress,
 (D) Distance traveled in the avoidance area,
 (E) Time spent in the avoidance area,
 (F) Number of entries into the avoidance area,
 (G) Immobility time in the first half and the last 5 min during TST,
 (H) Relationship between distance traveled and freezing time in the TMT zone during TMT (first 5 min),
 (I) Relationship between freezing time and time spent in the TMT zone during TMT stimulation,
 (J) Relationship between freezing time and number of entries into the TMT zone during TMT stimulation (first 5 min)

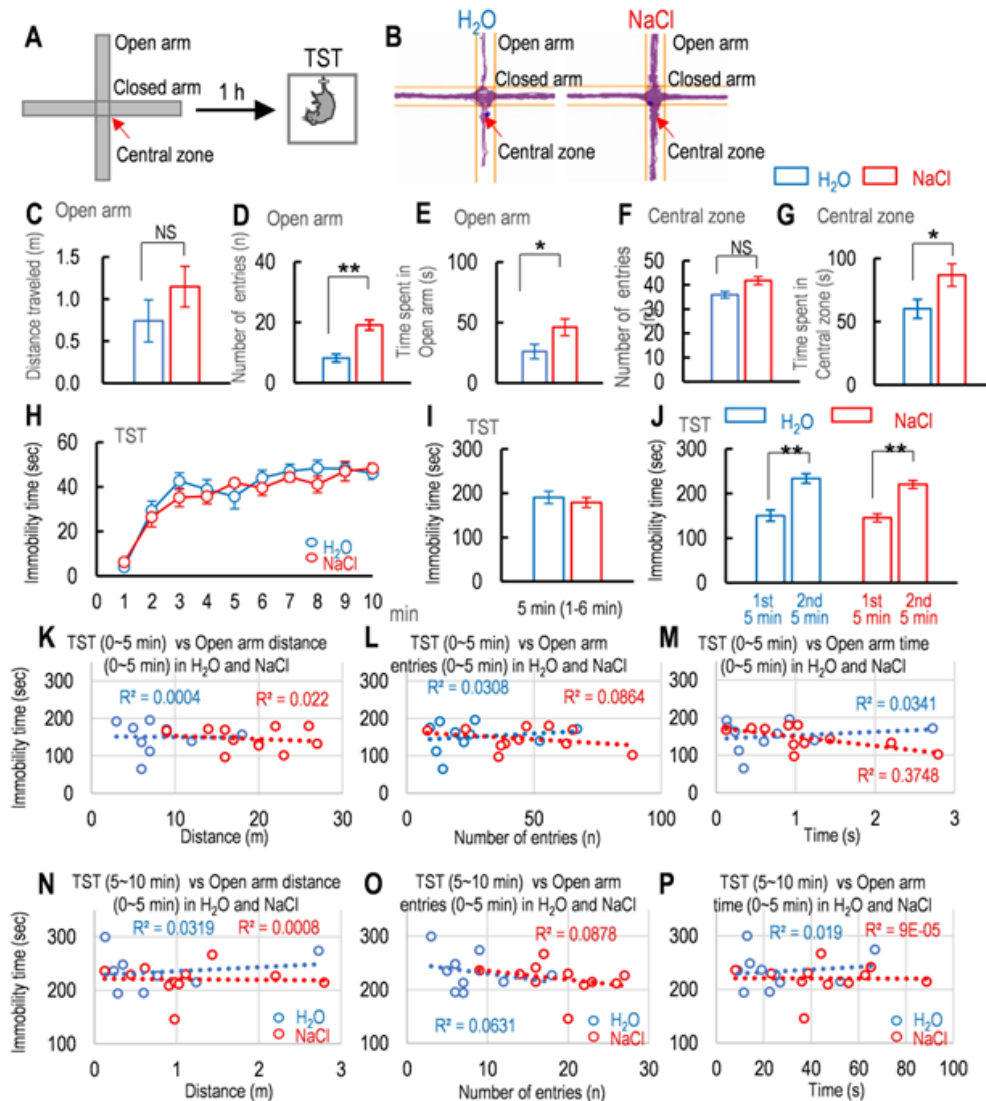


Fig. 2 The effect of 2% NaCl intake on mouse anxiety levels while using the elevated plus maze (EPM) and the correlation between immobility time during tail suspension test (TST) and the anxiety level.

(A) Schematic drawing shows the EPM and the schedule of TST.

(B) Traces of water- and sodium-intake mice moving on the EPM.

(C–E) Comparison between water- and sodium-intake mice in terms of distance traveled (C), number of entries (D), and time spent (E) in the open arm of the EPM.

(F, G) Comparison between the number of entries (F) and time spent (G) in the central zone of the EPM for water-intake mice ($n = 10$) and sodium-intake mice ($n = 11$).

(H) The time course of immobility time during 10 min of TST for water-intake mice ($n = 10$) and sodium-intake mice ($n = 11$).

(I) Immobility time during the first 6 min, except the first 1 min, of TST for water-intake mice ($n = 10$) and sodium-intake mice ($n = 11$).

(J) Summary of cumulative immobility time during the first (0–5 min) and last 5 min (5–10 min) 1 h after exposure to inescapable innate fear for water-intake mice ($n = 10$) and sodium-intake mice ($n = 11$).

(K–M) Correlation between immobility time during the first 5 min of TST and the distance traveled (K), number of entries (L), and time spent in the open arm of the EPM (M) for water-intake mice ($n = 10$) and sodium-intake mice ($n = 11$).

(N–P) Correlation between immobility time during the second 5 min of TST and the distance traveled (N), number of entries (O), and time spent in the open arm of the EPM (P) for water-intake mice ($n = 10$) and sodium-intake mice ($n = 11$). Statistically significant differences between two Pearson's correlation coefficients by Fisher's r -to- z transformation ($##p < 0.01$, $#p < 0.05$) are indicated. NS means not significant. R^2 is Pearson's correlation coefficient.

3.3 視床下部 CRF 発現に及ぼす塩分摂取の効果

当研究室では以前, TMT 刺激により視床下部室傍核 PVN における CRF 発現が増加すること, それが塩分摂取マウスでは TMT 恐怖刺激に寄る CRF 発現増加レベルが低下することを報告した。そこで本研究においても CRF 発現に及ぼす塩分摂取の効果を確認するため改めて CRF 発現レベルを水摂取マウスと塩分摂取マウスで比較した。その結果, 食塩を摂取していないマウスでは, TMT による恐怖刺激を与えると視床下部室傍核 PVN における CRF が増加するのに対し, 食塩摂取マウスでは, TMT による恐怖刺激を与えても視床下部室傍核 PVN における CRF 発現の増加が水摂取マウスのそれと比べて顕著に抑制されていることが確認された (Fig. 3A and B)。

3.4 視床下部 CRF 過剰発現モデルマウスを用いた塩分摂取の効果

Fig. 4 で作成した AAV ウイルスを 0.1 μ L ずつ両側の視床下部に投与し, 2 週間後に行動実験を行った。コントロールマウスには, CRF 遺伝子を挿入していない AAV ベク

ター由来のウイルスを投与し, GFP タグを指標に目的の位置にウイルスが投与しているかを GFP 抗体を用いて免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて確認した。CRF 過剰発現マウスの場合は, RFP タグが付いており, これも同様に RFP 抗体を用いて免疫染色し, 共焦点顕微鏡にてウイルスが目的の位置に投与されているか, また CRF が過剰に発現しているかなどを確認した。

これらのマウスに水と 2% 食塩水を 5 日連続で飲ませ, 5 日目に TMT 刺激を与え行動観察し, その 1 時間後に TST を 10 分間行った。その結果, 食塩摂取したコントロールウイルス群では, TST 中の不動時間が顕著に短くなった。しかし, 視床下部 CRF 過剰発現マウスでは, 食塩摂取しても不動時間は水摂取マウス群と同程度であった (Fig. 5D- F)。なお, コントロールウイルス投与群や CRF 過剰発現マウス群の恐怖感受性は, 水摂取群と同程度であり, TMT による恐怖感受性に影響を及ぼさないことを確認した (Fig. 5A-C)。

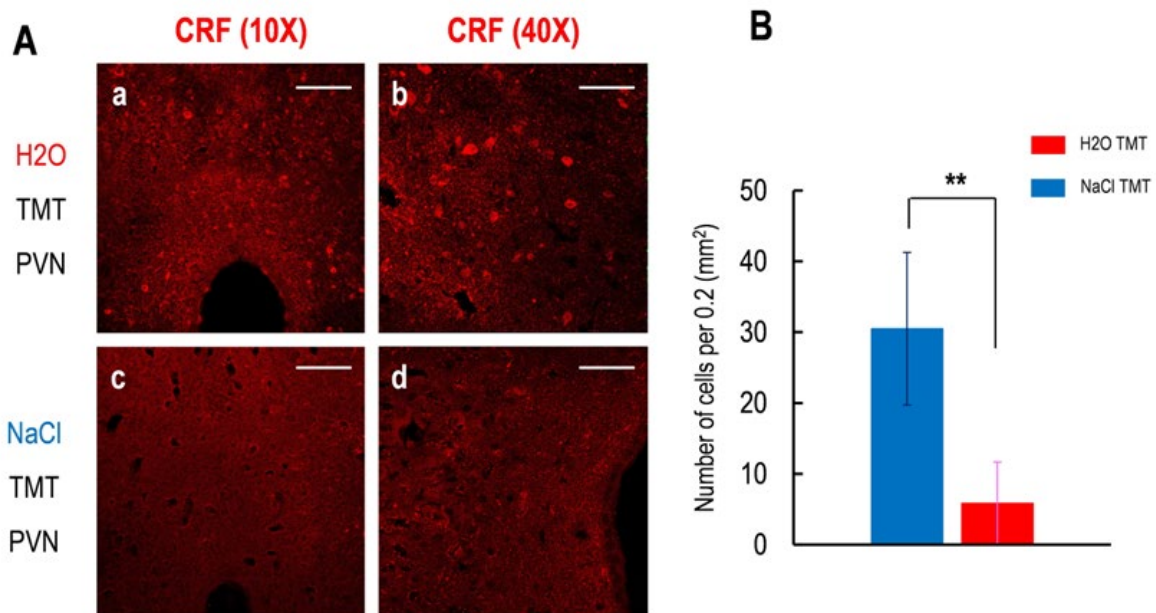


Fig. 3 Effects of salt intake on hypothalamic CRF expression induced by TMT fear stimulation (A) a, b CRF expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in mice without salt intake, c, d CRF expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in mice with salt intake, (B) Mean CRF expression in the hypothalamus in mice with and without salt intake during TMT stimulation.

3. 4 視床下部 CRF 過剰発現モデルマウスを用いた 塩分摂取の効果

Fig. 4 で作成した AAV ウイルスを 0.1 μ L ずつ両側の視床下部に投与し、2 週間後に行動実験を行った。コントロールマウスには、CRF 遺伝子を挿入していない AAV ベクター由来のウイルスを投与し、GFP タグを指標に目的の位置にウイルスが投与しているかを GFP 抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡にて確認した。CRF 過剰発現マウスの場合には、RFP タグが付いており、これも同様に RFP 抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡にてウイルスが目的の位置に投与されているか、また CRF が過剰に発現しているかなどを確認した。

これらのマウスに水と2%食塩水を5日連続で飲ませ、5日目にTMT刺激を与え行動観察し、その1時間後にTSTを10分間行った。その結果、食塩摂取したコントロールウイルス群では、TST中の不動時間が顕著に短くなった。しかし、視床下部CRF過剰発現マウスでは、食塩摂取しても不動時間は水摂取マウス群と同程度であった(**Fig. 5D-F**)。なお、コントロールウイルス投与群やCRF過剰発現マウス群の恐怖感受性は、水摂取群と同程度であり、TMTによる恐怖感受性に影響を及ぼさないことを確認した(**Fig. 5A-C**)。

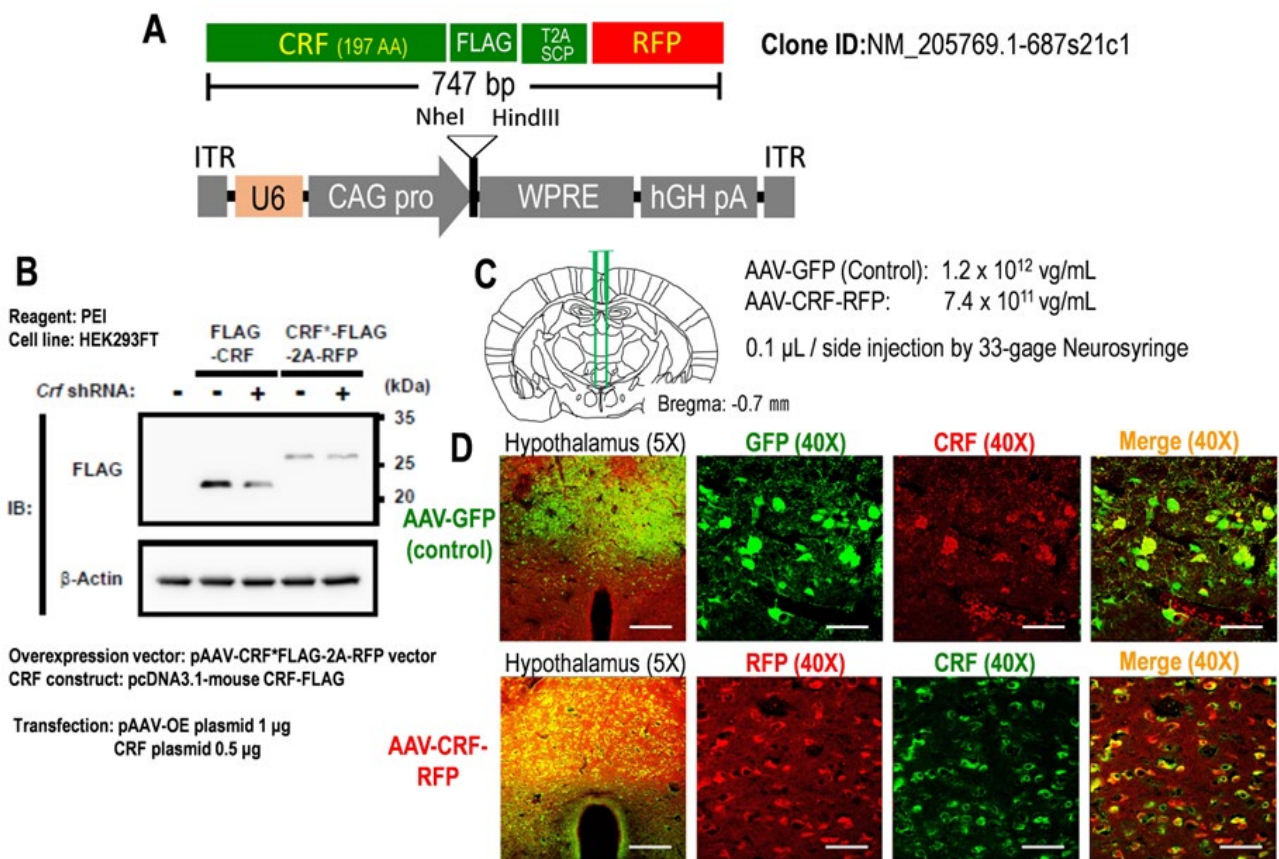


Fig. 4 Construct of adeno-associated virus (AAV: pAAV-PHP.eB) expression vector inducing CRF overexpression

- (A) CRF sequence and CRF overexpression construct of AAV-PHP.eB vector,
 (B) forced expression of CRF in HEK293 cells,
 (C) location of hypothalamus and concentration and dose of AAV virus administered,
 (D) RFP expression when AAV control virus and CRF overexpressing virus are administered regions (a and e) and RFP expression (b and f) and CRF expression (c and g) cells.

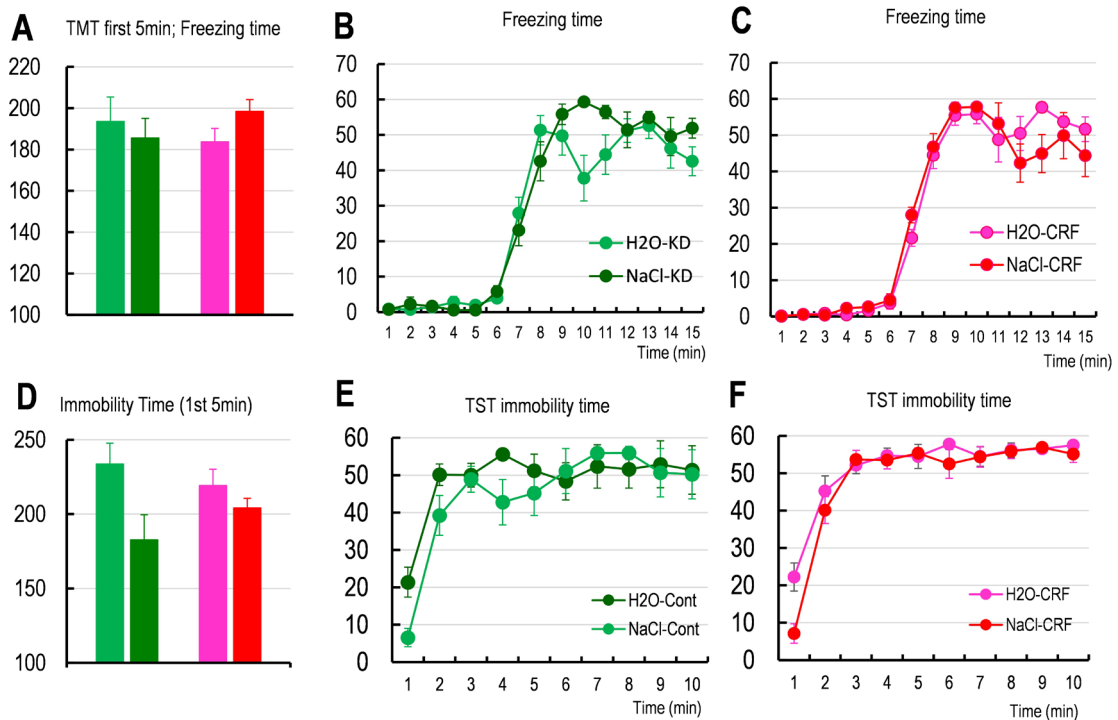


Fig. 5 Effects of salt intake on behavioral changes and freezing and learned helplessness formation during TMT fear stimulation.

- (A) freezing duration during TMT fear stimuli in water- or salt-saline-fed control mice and hypothalamic CRF overexpressing mice,
 (B) freezing over time during TMT fear stimuli in water- or salt-saline-fed control mice,
 (C) freezing over time during TMT fear stimuli in water- or salt-saline-fed hypothalamic CRF overexpressing mice freezing during TMT fear stimuli,
 (D) immobility time during TST in control mice consuming water or saline and hypothalamic CRF overexpressing mice,
 (E) immobility time during TST during TMT fear stimuli in control mice consuming water or saline,
 (F) immobility time during TST during TMT fear stimuli in control mice and hypothalamic CRF overexpressing mice ingesting water or saline.

3. 5 TMT 恐怖刺激前の行動様式と TMT 恐怖刺激中のフリージング時間および学習性無力感形成との関係に及ぼす食塩摂取の効果

次に、TMT による恐怖刺激を与える前のマウスの箱内における行動パターンと恐怖ストレス刺激中のフリージング時間の関係について調べました。その結果、塩分摂取や視床下部 CRF 過剰発現などいずれの場合においても恐怖ストレス前の中央エリアの移動距離や滞在時間進入

回数などは恐怖ストレス中のフリージング時間と関連しなかった (**Fig. 6A-L**)。また恐怖刺激前の行動様式と TST 中の不動時間との関係を調べたところ、フリージングと同様に恐怖刺激前の行動様式が TST 中の不動時間に影響を及ぼさないことが確認できた (**Fig. 7A-F**)。以上の結果から、TMT による恐怖ストレス刺激中のフリージング時間や TST 中の不動時間は、恐怖刺激を与える前から決定されているわけではないことが明らかとなった。

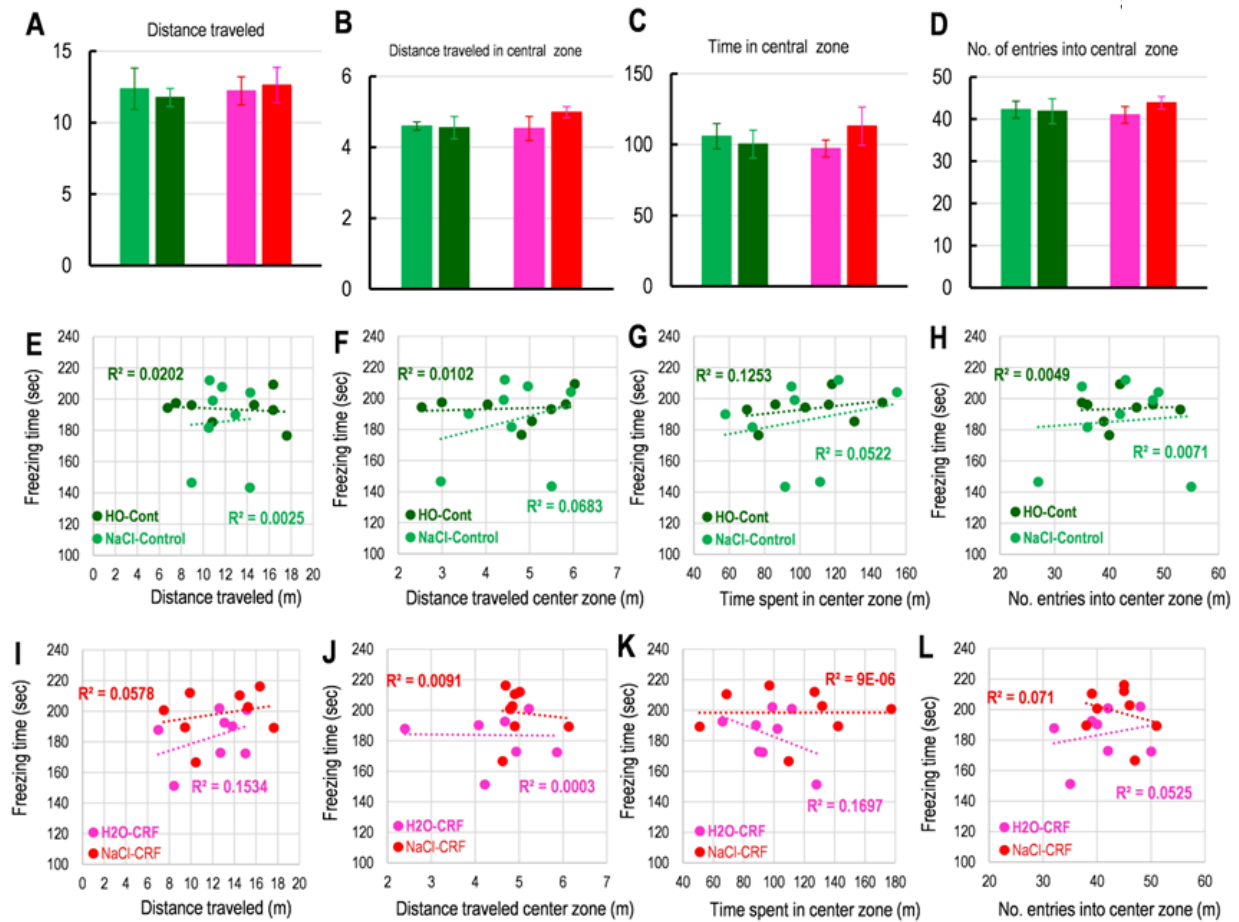


Fig. 6 Effects of salt intake on changes in behavioral patterns and the formation of freezing and learned helplessness induced by TMT fear stimuli.

- (A-D) Behavioral patterns of control and hypothalamic CRF overexpressing mice receiving water or salt solution before TMT fear stimulation (A) distance traveled, (B) distance traveled in the central area, (C) time spent in the central area, (D) number of entries into the central area,
- (E-L) Control (E-H) Correlation between distance traveled (E, I), distance traveled in the central area (F, J), time spent in the central area (G, K), number of entries into the central area (H, L) before TMT fear stimulation and freezing time during TMT stimulation in water or salt-fed mice (I-L) or in hypothalamic CRF overexpressing mice (I-L).

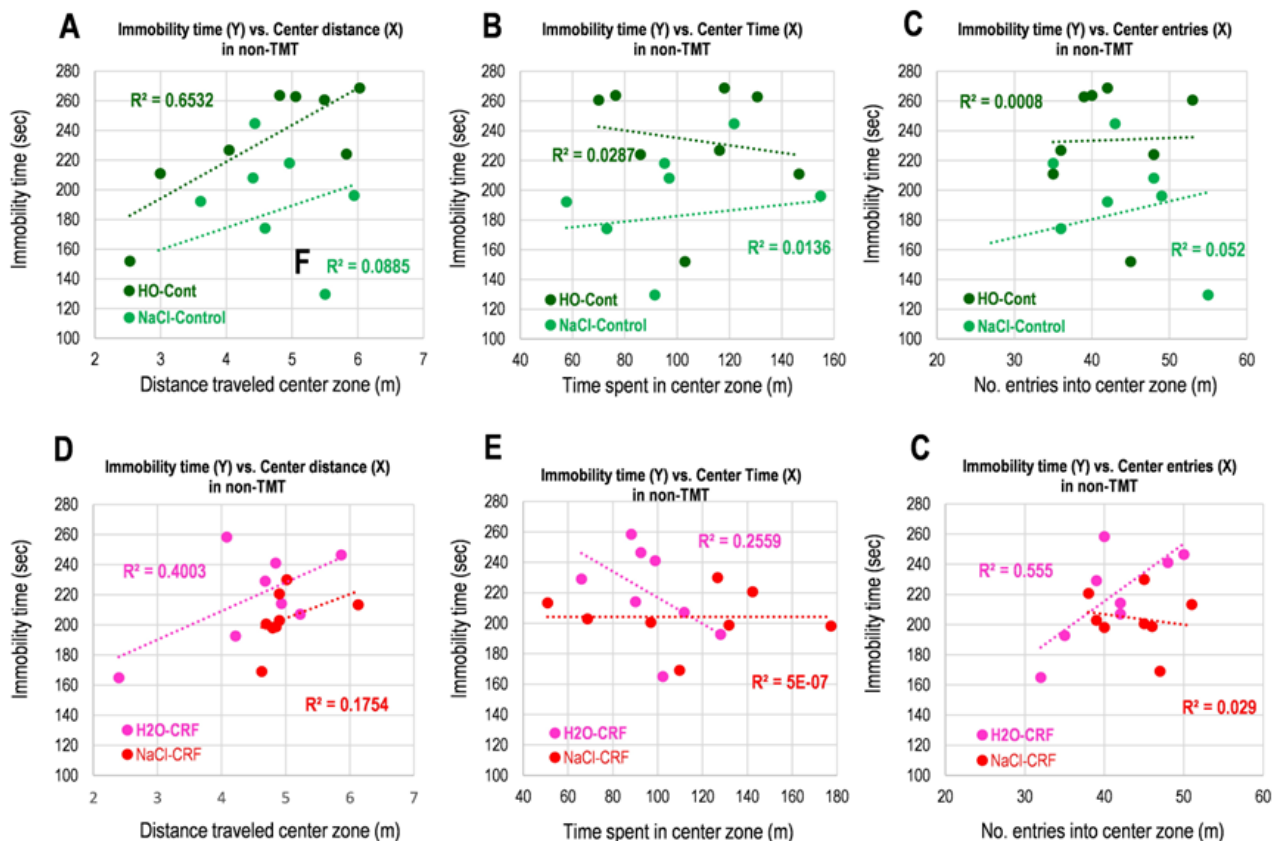


Fig. 7 Effects of hypothalamic CRF and salt intake on the behavioral pattern before TMT fear stimulation and the formation of learned helplessness after fear stimulation.

(A-C) Behavioral pattern of Control mice before TMT fear stimulation (A) distance traveled in the central area, (B) time spent in the central area, (C) correlation between the number of entries into the central area and immobility time during TST after TMT fear stimulation, (D-F) Hypothalamic CRF overexpression before TMT fear stimulation Behavioral pattern of mice (D) distance traveled in the central area, E: time spent in the central area, (F) correlation between the number of entries into the central area and immobility time during the TST after TMT fear stimulation.

3. 6 TMT 恐怖ストレス刺激中の行動様式とフリージング時間に及ぼす CRF 過剰発現マウスの食塩摂取の効果

コントロールウイルスを両側の視床下部に投与した 2% 食塩水摂取マウスでは, naive マウスと同様に行動量が増加しており (**Fig. 8A**), 中央エリアにおける移動距離も水摂取マウスと比べると有意に増加した (**Fig. 8B**)。また, 食塩水摂取マウスでは, TMT 刺激中のボックス内の移動距離とフリージング時間が有意に相関し, 特に中央エリア内の移動距離や滞在時間, 侵入回数ともフリージング時間が有意に相関するようになった (**Fig. 8E-H**)。

これに対し, 水摂取マウスのフリージング時間は, TMT 刺激中の移動距離や中央エリア内の移動距離や滞在時間, 侵入回数と無関係であった (**Fig. 8E-H**)。そこで視床下部で CRF を過剰発現した食塩水摂取マウスでは, TMT 刺激中のフリージング時間と移動距離や中央エリア内の移動距離, 滞在時間, 侵入回数との相関性が消失し, 水摂取マウスとほぼ同様の相関係数を示すことが分かった (**Fig. 8I-L**)。これらの結果から, 食塩水摂取マウスにおける TMT 刺激中の特異的な行動様式は, 視床下部の CRF 発現を介して生じている可能性が示唆された。

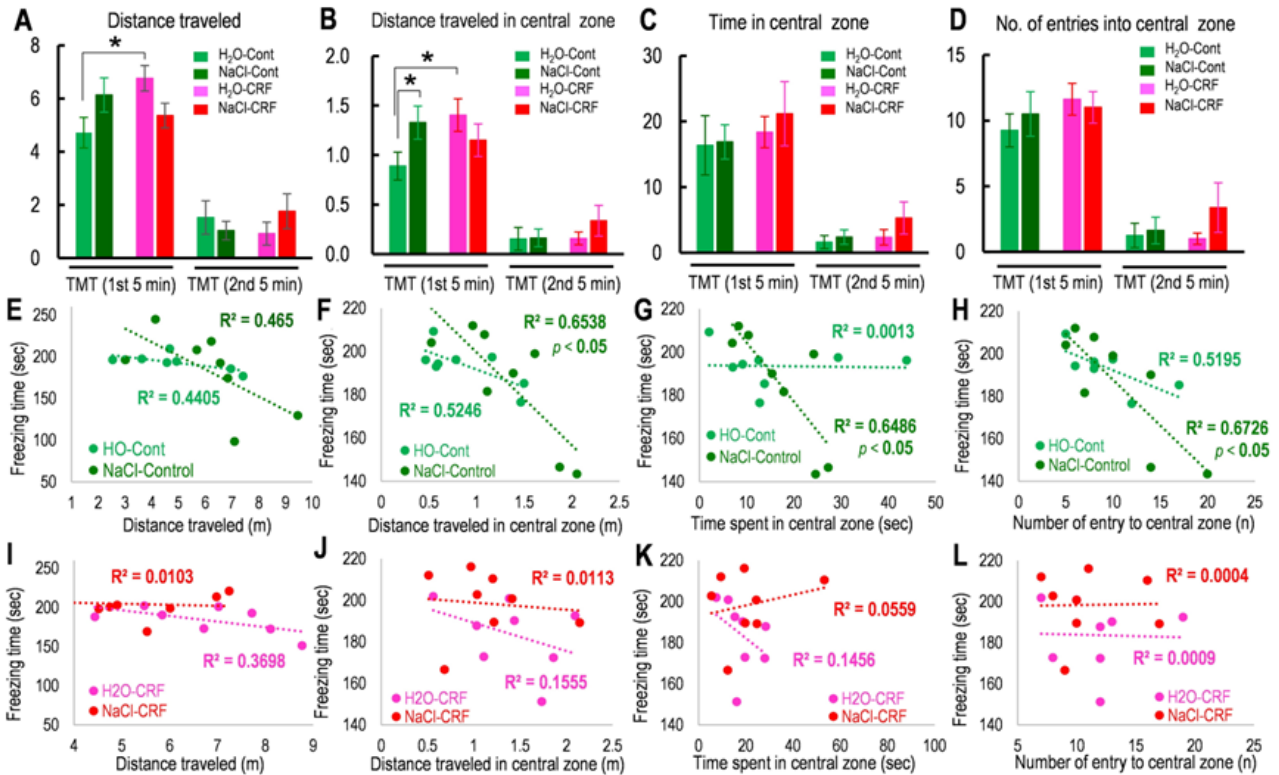


Fig. 8 Effects of salt intake on changes in behavioral patterns and the formation of freezing and learned helplessness induced by TMT fear stimuli.

(A-D) Behavioral patterns of control and hypothalamic CRF overexpressing mice ingesting water or salt solution during TMT fear stimuli (A) distance traveled, (B) distance traveled in the central area, (C) time spent in the central area, (D) number of entries into the central area,

(E-L) Control (E-H) Correlation between distance traveled (E, I), distance traveled in the central area (F, J), time spent in the central area (G, K), number of entries into the central area (H, L) before TMT fear stimulation and freezing time during TMT stimulation in water- or salt-fed mice (I-L) or in hypothalamic CRF overexpressing mice (I-L).

3. 7 視床下部 CRF 過剰発現マウスにおける TMT 恐怖ストレス刺激後の TST 中の不動時間に及ぼす TMT 刺激中の行動様式とフリージング時間の効果

最後に TMT による恐怖ストレス中の行動パターンが、その後の TST 中の不動時間に及ぼす影響を調べた。その結果、コントロールウイルスを投与した食塩水摂取マウスの TST 中における不動時間は、TMT による恐怖ストレス刺激中のボックス内の移動距離のみならず、ボックス内の中央エリアにおける移動距離や滞在時間、侵入回数と逆相関することが分かった (**Fig. 9A-D**)。しかし、視床下部で CRF を過剰発現したマウスでは食塩水摂取による TST 中の不動時間と TMT 恐怖刺激中の移動距離や中央エリア内の移動距離、滞在時間、侵入回数で成立した逆相関性が消失し、水だけを摂取していた視床下部 CRF 過剰発現マウスと同様の相関係数値が得られた (**Fig. 9E-H**)。

以上の結果から、恐怖ストレス後の TST 中における受動的コーピングの増加は視床下部の CRF 発現によって阻止され、恐怖刺激中にどのような行動様式を示すかが嫌悪ストレス時におけるコーピング方略を決定するかが明らかとなった。

4. まとめ

塩分摂取は、TMT 刺激中にボックスの中央領域への侵入回数を増加させ、恐怖刺激による TST 中の学習性無力感形成を阻止した。また塩分摂取マウスでは、TMT 恐怖刺激中の中央領域侵入回数が TST 中の学習性無力感レベルと逆相関した。これに対し、視床下部で CRF を強制発現させた Hy-AAV-CRF マウスでは、TMT による恐怖精神的ストレス中の中央エリアへ侵入回数や滞在時間は水だけを摂取したマウスと同程度であり、視床下部で CRF を過剰発現させると塩分摂取の効果が消失することが分か

った。さらに、Hy-AAV-CRF マウスでは、TMT 恐怖刺激中の行動パターンと学習性無力感レベルとの逆相関性が消失した。以上の結果から、塩分摂取による視床下部 CRF 発現抑制は、恐怖体験後に適切な行動パターンを誘

導するコーピング方略を可能にし、その結果として恐怖精神的ストレスによる学習性無力感形成が阻止されることが示唆された (Fig. 10)。

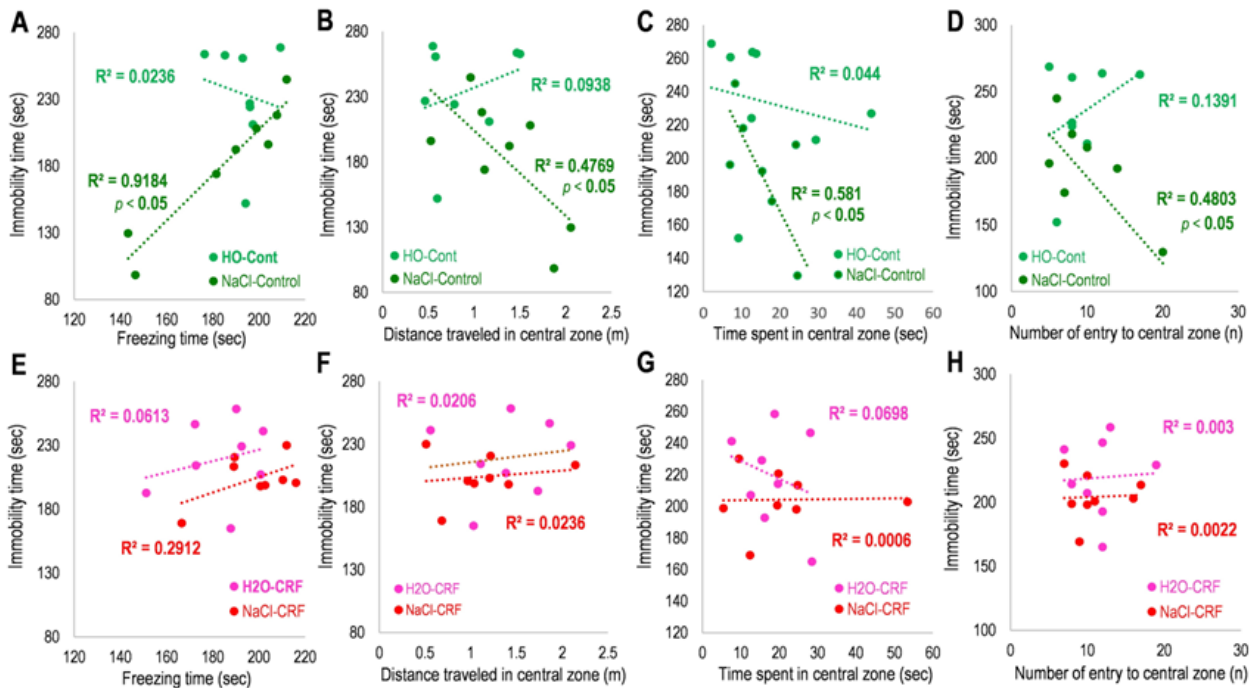


Fig. 9 Effects of hypothalamic CRF and salt intake on behavioral patterns during TMT fear stimulation and formation of learned helplessness after TMT stimulation.

- (A, E) Correlation between freezing time and immobility time during TST after TMT stimulation in control mice (A) and hypothalamic CRF overexpressing mice (E) during TMT fear stimulation,
 (B-D) Behavioral patterns of control mice during TMT fear stimulation (A) distance traveled in the TMT central area, (B) time spent in the central area, (C) number of times traveled to the central area and C: Correlation between the number of entries into the central area and the immobility time during TST after TMT fear stimuli,
 (E-H) Behavioral patterns of hypothalamic CRF overexpressing mice during TMT fear stimuli (D) distance traveled in the central area, E: time spent in the central area, F: number of entries into the central area and the immobility time during TST after TMT fear stimuli..

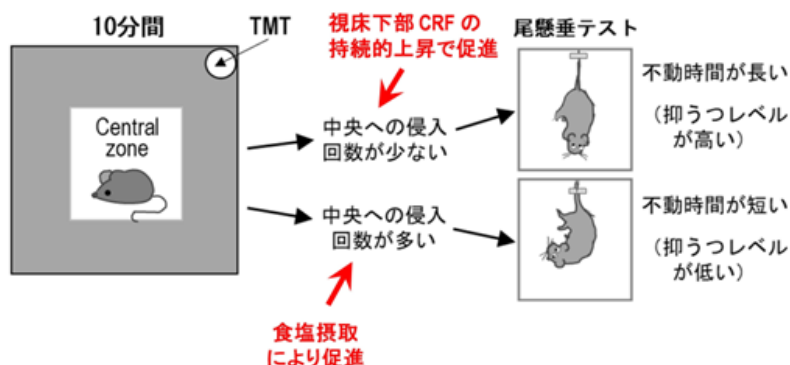


Fig. 10 Salt intake increases active coping.

Salt-fed mice showed higher central preference during the fearful stimulus, and higher central preference was associated with higher positive coping after the fearful stimulus. This suggests that salt intake may enhance resilience to stress by increasing the level of positive coping.

5. 文献

1. Dillon, D.G., Rosso, I.M., Pechtel, P., et al., *Depress Anxiety*, 31(3), 233 (2014)
2. Plotsky, P.M., Owens, M.J., and Nemeroff, C.B., *Psychiatr Clin North Am*, 21(2), 293 (1998)
3. Pagliaccio, D., Luby, J.L., Bogdan, R., et al., *Neuropsychopharmacology*, 39(5), 1245 (2014)
4. Kolodziejczyk, M.H. and Fendt, M., *Front Neurosci*, 14, 128 (2020)
5. Pan, X., Wang, Z., Wu, X., et al., *BMC Psychiatry*, 18(1), 324 (2018)
6. Steudte-Schmiedgen, S., Stalder, T., Schönfeld, S., et al., *Psychoneuroendocrinology*, 59, 123 (2015)
7. Yehuda, R., Kahana, B., Binder-Brynes, K., et al., *Am J Psychiatry*, 152(7), 982 (1995)
8. Galvão, A.C.M., Almeida, R.N., de Sousa Júnior, G.M., et al., *PLoS One*, 16(9), e0257251 (2021)
9. Jovanovic, T., Norrholm, S.D., Blanding, N.Q., et al., *Depress Anxiety*, 27(3), 244 (2010)
10. D'Elia, A.T.D., Juruena, M.F., Coimbra, B.M., et al., *BMC Psychiatry*, 21(1), 174 (2021)
11. Hourani, L.L., Williams, J., Forman-Hoffman, V., et al., *Depress Res Treat*, 2012, 425463 (2012)
12. Thompson, N.J., Fiorillo, D., Rothbaum, B.O., et al., *J Affect Disord*, 225, 153 (2018)
13. Mitchell, N.C., Gilman, T.L., Daws, L.C., et al., *Psychoneuroendocrinology*, 93, 29 (2018)
14. Gilman, T.L., Mitchell, N.C., Daws, L.C., et al., *Int J Neuropsychopharmacol*, 22(2), 137 (2019)
15. Petit-Demouliere, B., Chenu, F., and Bourin, M., *Psychopharmacology (Berl)*, 177(3), 245 (2005)
16. Leshem, M., *Physiol Behav*, 103(5), 453 (2011)
17. Shimizu, Y., Kadota, K., Koyamatsu, J., et al., *J Physiol Anthropol*, 34(1), 26 (2015)
18. Goldstein, P. and Leshem, M., *Appetite*, 79, 83 (2014)
19. Kanda, Y., *Bone Marrow Transplant*, 48(3), 452 (2013)

The Role of Hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone on the High Salt Intake-Induced Active Coping Behaviors after the Innate Fear Stress in Mice.

Kenjiro Seki¹, Tohru Matsuki²

¹Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Ohu University,

²Department of Cellular Pathology, Institute for Developmental Research,
Aichi Developmental Disability Center

Summary

Background: We have previously reported that the 5 consecutive-days of 2% sodium salt intake which does not cause hypertension promotes the induction of active coping behavior during tail suspension test (TST) after the cessation of the inescapable innate fear for 5 min caused by a component of fox faces, 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT). In addition, we found that the active coping behaviors during TST is significantly correlated with the preference of central zone during TMT-induced fear stress. This amount of sodium salt intake suppresses the expression of the corticotropin-releasing factor (CRF) in the hypothalamus even when the fear stress is subjected. In this study, we investigated whether the high salt intake affect to the anxiety level and tested whether the alteration of the anxiety level and then the overexpression of hypothalamic CRF prevent the high salt intake produces the correlation between central preference during TMT box and the active coping behavior during TST.

Methods: C57BL6/J mice (7-10 weeks old) with 2% salt or water-intake for 5 days were employed to the elevated plus maze (EPM) for 10 min 1 hour prior to the 10 min of TST. The immobility time as a coping behavior during TST for 10 min were recorded 1 hour after the TMT-induced fear stress in the acryl box (30×30×30 cm) in hypothalamic CRF overexpression (Hy-AAV-CRF) mice which were bilaterally injections of 0.1 µL adeno-associated virus vector (pAAV-PHP.eB) producing the CRF-AAV.

Results and Discussion: Two percent of salt-intake increased the number of entries and the time spent in the open arm of the EPM, indicating that high salt intake had an anxiolytic effect. However, neither the number of entries nor the time spent in the open arm of the EPM were correlated with immobility time during TST in sodium-intake mice. In Hy-AAV-CRF mice, the number of entries into the central area and the time spent in the central area during TMT-induced innate fear stress were similar to those in water-intake Hy-AAV-CRF mice, indicating that the effect of salt intake was abolished when CRF was overexpressed in the hypothalamus. Furthermore, the correlation between the preference of central zone in the box during TMT fear stress and immobility time during TST was disappeared in Hy-AAV-CRF mice. These results suggest that suppression of hypothalamic CRF expression by salt intake produces a central preference which is not produced by the lower anxiety level and the high salt-intake suppressed hypothalamic CRF expression is important for inducing the active coping behavior during TST.