



Title	幼若期ストレスによって生じる成熟期ラットのうつ様行動に対するケタミンの効果とその神経基盤研究
Author(s)	相川, 勝洋
Description	配架番号 : 2435
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13421号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13421
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78249
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuhiro_Aikawa.pdf



学 位 論 文

幼若期ストレスによって生じる 成熟期ラットのうつ様行動に対するケタミンの効果と その神経基盤研究

(Studies about the effect of ketamine on the juvenile stress-induced depression-like
behavior and alteration of neural activity in adult rats)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

相 川 勝 洋

学 位 論 文

幼若期ストレスによって生じる 成熟期ラットのうつ様行動に対するケタミンの効果と その神経基盤研究

(Studies about the effect of ketamine on the juvenile stress-induced depression-like
behavior and alteration of neural activity in adult rats)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

相 川 勝 洋

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
要旨	2
略語表	5
緒言	7
【第1章】	
背景	9
実験材料および実験方法	11
実験結果	14
考察	16
小括	18
【第2章】	
背景	19
実験材料および実験方法	21
実験結果	25
考察	34
小括	36
【第3章】	
背景	37
実験材料および実験方法	39
実験結果	41
考察	43
小括	45
総括および結論	46
謝辞	48
利益相反	49
引用文献	50

発表論文目録および学会発表目録

本研究の内容は以下の論文に投稿中である。

Katsuhiro Aikawa, Takayuki Yoshida, Yu Ohmura, Mitsuhiro Yoshioka, Yuji Morimoto

Subanesthetic Ketamine Rapidly Reverses Depression-like Alterations Derived from Juvenile Stress in Adult Rats.

Neuropharmacology (投稿中)

本研究の一部は以下の学会で発表した。

相川勝洋、吉田隆行、大村優、泉剛、吉岡充弘、森本裕二

幼若期ストレスによるラットのうつ様行動に対するケタミンの効果とその神経基盤研究

第47回日本神経精神薬理学会 2017年9月28～30日・札幌

要旨

【背景と目的】

現在、うつ病は世界で約3億人が罹患する深刻な疾患であり、発病には虐待などの幼少期の強いストレスが強く関係することが知られている。これは、シナプス新生・刈り込みなどの重要な過程にある幼若期の脳が強いストレスに曝露されることにより、成長後も遷延する機能異常が生じるためであると考えられている。実際このような患者はストレス感受性が高く、うつ病を始めとした精神疾患の発病率が高い事、うつ病に陥った場合治療抵抗性を示す傾向があることが報告されている。2000年のBarmanらの報告以降、画期的な抗うつ薬として注目を集めているケタミンについて、ヒト・動物を対象にした数多くの研究が行われているが、幼若期ストレスを負荷された対象への効果に着目した研究は現在のところ見当たらない。そのため、治療抵抗性うつ病の要因である幼若期ストレスを負荷した動物を用いて、ケタミンの抗うつ効果を検証することは有意義であると考えた。

うつ病の病態生理は完全には解明されていないが、気分のコントロールに重要な内側前頭前野の興奮性伝達、すなわちグルタミン酸系伝達の減弱が重要な要素であり、ケタミンはこの変化を回復させることで抗うつ効果を発揮すると考えられている。そこで本研究では、「幼若期ストレスに起因する成熟期のうつ様行動および減弱した内側前頭前野の興奮性伝達をケタミンが回復させる」という仮説を設定し、行動学的変化および内側前頭前野のグルタミン酸伝達系に焦点を当て、ケタミンの有効性について検証することとした。

【材料と方法】

実験には、妊娠 Wistar/ST 系ラットから産まれた雄性ラットを用いた。生後21日齢で母子分離し、幼若期ストレスとして25日齢まで5日間連続した足蹠電気刺激ストレス(3wFS)を負荷した。対照としては電気刺激を与えないラットを用いた。10週齢に達した後ケタミン10mg/kgもしくは生理食塩水(VEH)を腹腔内投与した上で、うつ様行動である強制水泳試験における無動時間の比較、内側前頭前野 Prelimbic 領域(PL)第V層錐体細胞を対象とした Whole-cell patch-clamp 法による電気生理学的解析、および共焦点レーザー顕微鏡を用いた樹状棘突起(spine)の形態解析を行った。実験群として、ラットを3wFSおよびケタミン投与の有無により4群に分けた。

統計は主に two-way analysis of variance (ANOVA) を用い、交互作用が有意であった場合には one-way ANOVA による単純主効果の比較を行った。

【結果】

強制水泳試験：VEH 群において 3wFS により immobility が増加し ($p=0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより immobility が減少した ($p=0.02$)。つまり、3wFS によって増加した immobility がケタミンにより回復することが示された。

Whole-cell patch-clamp 記録：自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) に関して、VEH 群において 3wFS により振幅が低下し ($p<0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより振幅が増加した ($p<0.001$)。また、VEH 群において 3wFS で頻度が減少し ($p<0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより増加した ($p<0.001$)。すなわち、3wFS によって減少した sEPSC の振幅および頻度がケタミンにより増加する事が示された。テトロドトキシンを用いた微小 EPSC (mEPSC) の測定を行ったところ、VEH 群において 3wFS により振幅が減少し ($p<0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより増加した ($p<0.001$)。また、VEH 群において 3wFS は頻度を減少させ ($p<0.001$)、3wFS 群において、ケタミンにより頻度が増加した ($p<0.001$)。つまり、3wFS によって減少した振幅および頻度が、ケタミンにより回復したことが示された。

蛍光染色による形態評価：先端樹状突起の spine の密度が、VEH 群において 3wFS により減少した ($p<0.001$)。3wFS 群において、ケタミンにより回復傾向が見られた ($p=0.097$)。また成熟 spine の比率に関しては、ケタミンの主効果を認め ($p=0.003$)、ケタミンにより成熟 spine が増加する事が示された。すなわち、3wFS によって先端樹状突起上の spine の密度が減少し、ケタミンにより密度の回復傾向と、成熟 spine の比率増加が生じた。基底樹状突起の spine に関しては、3wFS およびケタミンの効果は認められなかった。

【考察】

3wFS によって増加した強制水泳試験における無動時間がケタミンにより回復したことから、ケタミンが幼若期ストレスにより生じたうつ様変化を回復させたことが行動学的に示唆された。さらに内側前頭前野の sEPSC が 3wFS によって減少しケタミンにより増加したことから、内側前頭前野のグルタミン酸系伝達が行動変化と関連していることが示された。これらの関連性は先行研究と一致しており、幼若期ストレスにより成熟後も内側前頭前野における EPSC が減弱することが、うつ様行動を引き起こしていることが示唆された。シナプスの性質的变化を詳細に検証するため mEPSC を測定した結果、同様に振幅および頻度が 3wFS により低下し、ケタミンにより増加した。mEPSC の振幅は、シナプス後部の AMPA 型受容体の数または機能の増減を反映するが、それを裏付けるように先端樹状突起上の棘突起の AMPA 型受容体の数が 3wFS により減少し、ケタミンにより回復することが形態学的に示された。逆に、基底樹状突起の spine の形態は 3wFS およびケタミンにより変化しなかったことから、う

うつ様行動には先端樹状突起からの興奮性入力が寄与していることが示唆された。ストレスにより内側前頭前野第 I-II 層、つまり第 V 層錐体細胞の先端樹状突起が位置する部位の容量が減少する事が先行研究により報告されており、本研究における EPSC の結果は、この変化を反映している可能性がある。

本研究は相関研究であることから、今後ケタミンの効果を打ち消すブロッカーを用いて、因果関係を明らかにすることが必要である。さらに、一般的にケタミンの抗うつ効果は、単回投与の後約 7 日間持続する事が知られているが、治療抵抗性の高い幼若期ストレスを経験したヒトおよび動物で、どのような時間経過を辿るのかに関して、今後検討の必要がある。

【結 論】

ケタミンが幼若期ストレスに起因するうつ様変化に対して有効であるかどうかを、3wFS を負荷したラットを用いて行動学的、電気生理学的、形態学的に検証した。その結果、ケタミンは内側前頭前野 PL 第 V 層錐体細胞の先端樹状突起におけるグルタミン酸伝達を改善する事で、幼若期ストレスにより生じたうつ様変化を回復させることが示唆された。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	analysis of variance
BDNF	brain derived neurotrophic factor
EPSC	excitatory postsynaptic current
FST	forced swimming test
GABA	gamma-aminobutyric acid
IEI	inter-event interval
IL	infralimbic cortex
i.p.	intraperitoneal injection
IPSC	inhibitory postsynaptic current
PL	prelimbic cortex
mTOR	mammalian target of rapamycin
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartate
RMP	resting membrane potential

SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
VEH	vehicle
3wFS	3-week foot shock

緒言

うつ病は、人類が直面している深刻な社会問題の一つである。現在世界では3億人以上がうつ病に苦しんでいると言われており、今や個人の社会的自立を妨げる最大の原因になっている(WHO, 2018b)。うつ病は気分に関連する多くの障害を伴うが、それらは患者の生活の質を著しく棄損するばかりでなく、社会生産性の低下、患者への保障や治療に伴う莫大な経済的損失の原因となっている。また世界における自殺者は毎年80万人に達する(WHO, 2018c)が、多くの場合その背景にはうつ病が存在する(Hawton et al., 2013)。うつ病は単なる個人の精神障害に止まらず、社会基盤を揺るがし、患者やその家族の生活、最悪の場合命すら奪う重大な疾患である。

うつ病の原因は主に強いストレスであるが、虐待などの幼児期のストレスが成人期のうつ病の発症率を上げることが知られている(Anda et al., 2010 ; Heim and Nemeroff, 2001 ; Lupien et al., 2009)。子供に対する虐待は世界的に深刻な問題であり、WHOの報告では世界の成人の4人に一人が身体的虐待を、女性の5人に1人、男性の13人に1人が性的虐待を小児期において経験しているとされる(WHO, 2018a)。幼若期ストレスに曝露される事の重大な問題の一つとして、その後の人生において長く負の影響が残存するという点が挙げられる(McEwen et al., 2012 ; Skilbeck et al., 2018)。Tunnardら(Tunnard et al., 2014)は入院中のうつ病患者を調査し、幼少期の虐待などを経験した患者が62%に達すること、さらにこの患者群では治療抵抗性や自殺企図を伴う確率が高い事を報告した。幼若期の脳では神経伝達に関連する劇的な変化が生じており(Spear, 2000)、シナプス形成と刈り込み現象が盛んに行われることにより効率的な神経回路網が形成される(Andersen, 2003)。脳の発達にとって重要なこの過程が、強いストレスに曝露されることによって障害され、以後のストレスに対する感受性・脆弱性が増すと考えられている(Klengel et al., 2014)。これらの事実を総合すると、現在もしくは将来うつ病に苦しむ患者には、幼児期のストレスを背景にもつケースが少なくないと考えられる。

うつ病が及ぼす社会的影響の甚大さに反して、うつ病に対する治療成績は現在においても満足できるものではない。既存の抗うつ薬は効果発現まで数週間を要し、初期治療に反応しない患者も約7割にのぼる(Trivedi et al., 2006)。この状況は半世紀以上続いており、新規抗うつ薬の出現が切望されてきた。近年、1963年に開発されて以来麻酔薬として世界中で使用されているケタミンが、この状況を打開する有望な抗うつ薬として注目されている。ケタミンは α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (:AMPA) 型受容体、カニン酸型受容体と共にグルタミン酸受容体のサブタイプの一つである *N*-methyl-*D*-aspartate (:NMDA) 型受容体のアンタゴニストであり、下行抑制系を賦活化することで強力な鎮痛効果を発揮する。同時に、ケタミンは投与さ

れた者に独特の神経精神症状をもたらす。この作用は、ケタミンが脳皮質の活動を抑制する半面、脳辺縁系を活性化させるという薬理学的特徴（解離性作用）によるものであり、このことからケタミンは解離性麻酔薬とも呼ばれる。麻酔作用を発揮する以下の用量（subanesthetic dose: ヒトでは約 0.5 mg/kg）のケタミンに抗うつ作用があることが Berman ら(Berman et al., 2000)により報告されたのは 2000 年のことである。投与から数時間以内に効果が発現するという既存の抗うつ薬に無い即効性に加え、治療抵抗性のうつ病患者への有効性や自殺企図を軽減させる(Ballard et al., 2014 ; Grunebaum et al., 2018)効果も明らかとなり、ケタミンは従来の治療限界を克服する次世代の抗うつ薬として一躍脚光を浴びることとなった。Berman らの報告以降約 20 年間、ケタミンの抗うつ効果の機序を解明するため、同時に安全で有効性の高い抗うつ薬を開発するための研究が世界中で繰り広げられてきた(Newport et al., 2015 ; Sanacora et al., 2017 ; Zarate et al., 2006)。これまでの動物実験により、ストレスによって惹起されたうつ様行動や、気分のコントロールに重要な部位である内側前頭前野や海馬などに生じた変化を、ケタミンが回復させる事が解明されている(Duman, 2018 ; Duman et al., 2012)。

前述の通り、幼少期の虐待経験を持つ患者はうつ病の発症率が上昇し、また難治性を示す傾向がある。しかし、ケタミンの抗うつ効果に関するこれまでの動物を用いた実験は、思春期もしくは成熟期に慢性ストレスを負荷した動物が用いられており、幼若期ストレスを負荷した成熟期の動物を対象にした研究はない。このような背景から、本研究では「幼若期ストレスに起因する成熟期のうつ様行動および神経学的変化をケタミンが回復させる」という仮説を立て、3 週齢で 5 日間連続した電気刺激ストレスを与えて幼若期ストレスを負荷したラットを用い、10 週齢におけるケタミンの抗うつ効果を検討した。第 1 章では、強制水泳試験を用いてうつ様行動の変化を行動学的に検討した。第 2 章では、うつと深い関りがある内側前頭前野を対象として、Whole-cell patch-clamp 法を用いて、抗うつ効果の神経基盤を電気生理学的に検討した。最後に第 3 章では、Whole-cell patch-clamp 法で用いた錐体細胞を蛍光染色することで、グルタミン酸受容体の発現量を反映する棘突起（spine）の形態を観察した。

第1章 強制水泳試験による行動学的検討

虐待などの幼少期のストレスは、情動ストレスに対する感受性を亢進させ、成長後のうつ病の発症率を上げることが知られている(Menke and Binder, 2014)。幼少期に過酷な環境に置かれた場合、軽微なストレスに対しても安全な場所に閉じこもるなどの行動パターンを獲得することは、生存率を高めるための適応とも言える。しかし、環境が改善した後も過剰な防御反応が遷延する場合は病的な状態となり、社会生活を営む上で多大な支障を来す。幼若期のストレス暴露が、内側前頭前野や海馬などに機能のおよび形態的異常を引き起こすことがうつ病患者の脳を用いた研究(Kang et al., 2012)で明らかになっており、このメカニズムを解明するため、幼若期にストレスを負荷した動物を用いた研究が行われてきた。

本研究では幼若期ストレス負荷の方法として、生後3週齢に達したラットに5日間連続した足蹠電気刺激(3-week foot shock: 3wFS)を与える方法(Matsumoto et al., 2008)を用いた。3wFSは、3週齢に達した動物を個別に脱出不可能な専用のBox内に入れ、金属製のグリッドの床を通じて足底に電気ショックを負荷する手法であり、3wFSを負荷されたラットは成熟期の異常行動や脳の機能異常をきたすことが報告されている(Hiraide et al., 2012; Kimura et al., 2011; Konno et al., 2007; Koseki et al., 2009; Lyttle et al., 2015; Matsumoto et al., 2008; Matsuzaki et al., 2011; Matsuzaki et al., 2009)。またLyttleら(Lyttle et al., 2015)は、3wFSを負荷されたラットは成熟後に強制水泳試験(Forced swim test: FST)における無動時間が延長するとともに、内側前頭前野の体積減少、および錐体細胞の萎縮性変化が生じることを報告した。本研究ではこれらの先行研究を基に、幼若期ストレス負荷の手法として3wFSを採用した。

ストレスを負荷されることにより、動物は様々な行動変化を示す。例として恐怖刺激に対するすくみ行動や、不安による探索行動の減少などが挙げられるが、これらをつ様行動としてパラメータ化し増減を比較することが、抗うつ薬の効果判定などの際に広く行われている。本研究では、成熟後のうつ様行動の評価としてはFSTを用いた。FSTは1978年Porsoltら(Porsolt et al., 1978)により報告されて以来、その簡便性と信頼性から頻繁に用いられており(Cryan et al., 2005)、ケタミンの抗うつ効果に関する研究においても行動学的手法として利用される(Li et al., 2010; Yamaguchi et al., 2018; Zanos et al., 2016)。FSTは脱出が不可能な、十分な深さの水が入った容器に実験動物を入れ、一定時間行動を観察・記録する方法である。対象の動物は、最初は脱出を試みて激しく動くが、次第に疲労と絶望から呼吸に必要な最低限の動きしか見せなくなる。これを無動(immobility)と定義し、この時間が多い程うつ様行動が増加していると評価する。本研究では15分間のFSTを行い(Jutkiewicz et al., 2006; Ohmura

et al., 2011 ; Yamaguchi et al., 2018)、幼若期ストレスおよびケタミンが immobility の量に与える影響について調べた。

緒言で述べた通り、幼若期ストレスを負荷した動物を対象にケタミンの抗うつ効果を検討した報告は現在のところ見当たらないが、慢性ストレスを負荷した動物を用いた先行研究では、ケタミンはストレスによって増加したうつ様行動、および内側前頭前野や海馬の萎縮性変化を回復させたという結果が数多く報告されている(Li et al., 2010 ; Li et al., 2011)。内側前頭前野や海馬は幼若期ストレスによっても遷延性に障害されることが報告されており、このことは虐待がその後の人生においてストレスに対する脆弱性を増加させることと深く関係していると考えられている(Ishikawa et al., 2015 ; Lupien et al., 2009 ; Lyttle et al., 2015 ; Yamamuro et al., 2018)。これらの先行研究から、ケタミンは幼若期ストレスによって内側前頭前野に惹起された遷延性変化を改善させることで、成熟期においてうつ様行動を減少させる可能性があると考えた。第1章では幼若期ストレスに起因する成熟期ラットのうつ様行動に対するケタミンの効果について検討した。

[1-1] 実験材料および実験方法

1) 実験動物

日本 SLC から購入した Wister/ST 系妊娠ラットから産まれた雄性ラットを用いた。生後 10-14 日目に雌雄を判別し、雄のみを母ラットと共に飼育ケージに残した。仔ラットを生後 21 日目に母子分離し、室温 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル（照明点灯時間：19:00 - 7:00）、食餌、水制限なしの環境下で飼育した。全ての実験はラットの活動期に当たる暗期（7:00 - 19:00）に実施した。実験は、「北海道大学における動物実験に関する指針」に準拠して行った。

2) 幼若期ストレス負荷

電気刺激は専用の電撃ショック箱（FS-Box：幅 30 cm、奥行き 30 cm、高さ 27 cm；Med Associates Inc., St. Albans, VT, USA）の床に 1 cm 間隔で並べられた直径 3 mm のスチールグリッドを介して、shock generator（Medical Agent, Japan）を用いて負荷した。ラットを飼育ケージから FS-Box に移したのち 5 分間自由探索させ、その後 5 回の連続した電撃ショック（電流 0.5 mA、持続時間 2 秒、刺激間隔 30 秒）に曝露した。さらに FS-Box 内に入れたまま 5 分間経過させた後、飼育ケージに戻した（3wFS 群）。対照群（noFS 群）には電気刺激を負荷せず、3wFS 群と同時間（12.5 分）FS-Box に入れるのみとした。その後実験に用いるまで、介入は必要最小限として上記の条件で飼育し、生後 69 日目にケタミン投与、70 日齢に FST を行った。

3) 薬物投与

本研究では、ケタミンの抗うつ効果を評価するために最も頻用されている 10 mg/kg を採用した(Li et al., 2010 ; Li et al., 2011 ; Zanos et al., 2016)。実験に用いるおよそ 16 時間前に、ラットに対しケタミン（Daiichi Sankyo, Tokyo）10 mg/kg を生理食塩水で全量 2 ml に希釈したもの（Ket 群）もしくは生理食塩水（VEH 群）を腹腔内投与した。無動時間に対するケタミンの効果の用量依存性を観察するため、3wFS に曝露した上でケタミン 1 mg/kg を腹腔内投与した群も設定した。ケタミンの希釈はラットへの投与直前に行った。生まれてからストレス負荷を経て、実験に用いるまでの時系列と、3wFS 負荷のプロトコル、およびケタミンの投与から実験までの流れを図 1-1 に示す。

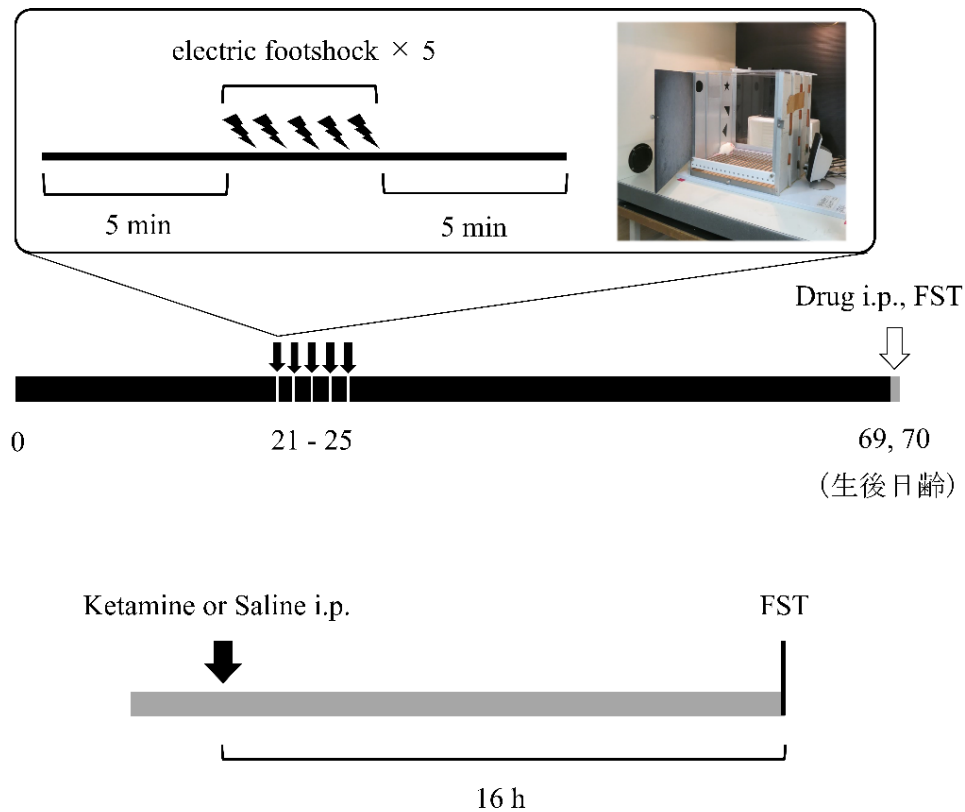


図 1-1 幼若期ストレス負荷と薬物投与プロトコル

4) 強制水泳試験

生後 70 日齢に FST を実施した。内径 20 cm、高さ 60 cm の円柱型アクリル製シリンダーに 45 cm の高さまで水 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) を入れた装置を用い、容器内の水は FST を行う度に交換した。強制水泳試験は 15 分間行い、その様子をビデオカメラで記録した。行動パラメータの分類基準は、Cryan ら(Cryan et al., 2005)の基準を改変したものを用いた (表 1)。この基準に従い、後日個体と処置を盲検化した状態で 5 秒毎にラットの行動を分類し、うつ様行動である immobility のカウントを比較した(Jutkiewicz et al., 2006)。FST はラットにとって強いストレスであり、その後の実験結果に影響を及ぼす可能性があることから(Sarkar and Kabbaj, 2016)、FST に用いたラットは他の実験には用いなかった。

immobility: 浮いているだけ、もしくは水面に顔を出すために必要最低限の動きしかしていない状態
swimming: 前脚を動かし水面を水平方向に移動する動き。移動距離の目安は、一秒間にシリンダーに沿って円周の 1/4 以上か、シリンダーの半径以上
climbing: 脱出のため容器の壁を登ろうとして、両前脚を水面上に出す垂直方向への動き
diving: 水面下の出口を探索するための、能動的な潜水行動
head shaking: 顔の水を払うため頭を振る動き

表 1 Forced swim test の行動分類基準 (Cryan ら(Cryan et al., 2005)の基準を改変)

5) 統計解析

統計解析ソフトは SPSS ver. 23 (IBM, CA, USA)を用いた。結果は平均値±SEM で表し、 $p < 0.05$ を有意とした。解析には two-way analysis of variance (ANOVA) を使い、交互作用が有意だった場合 one-way ANOVA による単純主効果の検定を行った。

ケタミンの効果の用量依存性を見るために 3wFS に曝露しケタミン 1 mg/kg を投与した群を追加したが、ケタミン 0 mg/kg (VEH)、ケタミン 10 mg/kg 群に関して繰り返し検定を行うことになるため統計解析は行わなかった。

[1-2] 実験結果

1) 3wFS およびケタミンが FST の無動時間に与える影響

強制水泳試験の結果を図 1-2 に示す。two-way ANOVA で、3wFS とケタミンの交互作用を認めた ($F(1,24)=16.61, p<0.001$)。one-way ANOVA により単純主効果の検定を行ったところ、VEH 群において 3wFS により immobility が増加し ($F(1,12)=20.225, p=0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより immobility が減少した ($F(1,12)=7.235, p=0.02$)。つまり、3wFS によって増加した immobility が、ケタミンにより回復することが示された。

noFS 群において、ケタミンは immobility を増加させた (one-way ANOVA, $F(1,12)=11.2, p=0.006$)。興味深いことに、3wFS の有無で、ケタミンを投与した場合のうつ様行動の増減が逆になる結果となった。

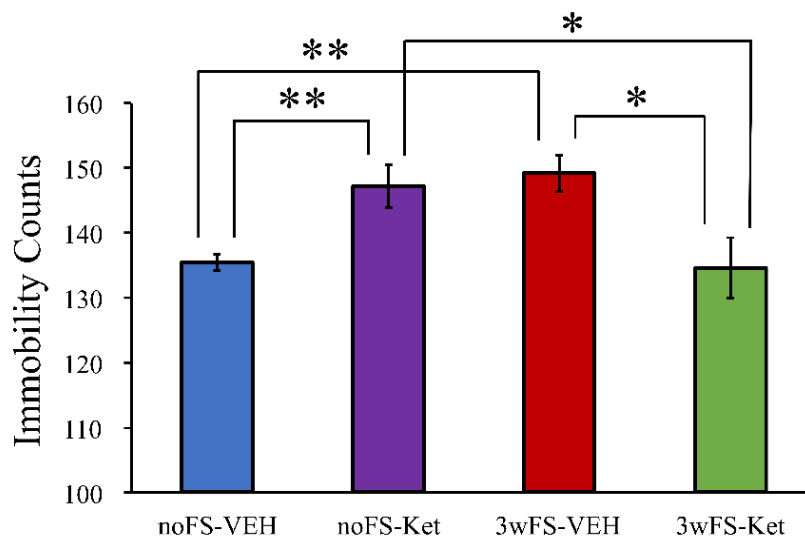


図 1-2 3wFS とケタミンが immobility counts に与える影響

データは平均値±SEM で表示。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。N : 各群 7 匹。

2) 3wFS 群の immobility に対するケタミンの用量依存性

ケタミンの用量依存性を調べるため、3wFS を受けたラットに対しケタミン 1 mg/kg を投与した群を追加し、3wFS-VHE (ケタミン 0 mg/kg) 群、3wFS-Ket (ケタミン 10 mg/kg) 群と比較した。グラフを図 1-3 に示す。同じデータを繰り返し使用しているため統計学的解析はしていないが、ケタミン 1 mg/kg に immobility を減少させる効果は認めなかった。

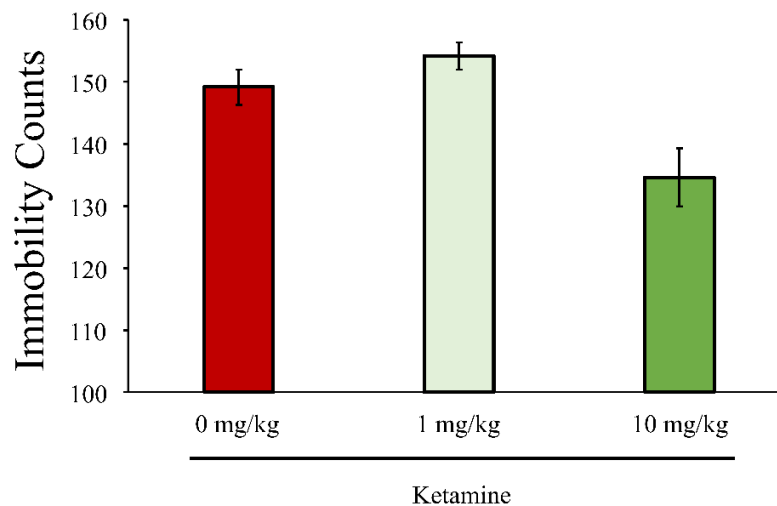


図 1-3 ケタミンの効果の用量依存性

データは平均値±SEM で表示。同データに対する繰り返し検定を防ぐため、統計学的検討は実施せず。N：各群 7 匹。

[1-3] 考察

3wFS を負荷されたラットは、FST でうつ様行動の増加を示した。この結果は Lytle ら(Lytle et al., 2015)の報告を再現し、3wFS による影響が 10 週齢時において残存していることを示唆している。ヒトにおいて幼若期ストレスがその後の人生においてうつ病の発症率を上げる(Anisman et al., 1998 ; Heim and Nemeroff, 2001)ことや、げっ歯類を対象にした多くの研究で、幼若期ストレスにより成熟期まで遷延するうつ様行動を報告した先行研究(Ishikawa et al., 2015 ; Yamamuro et al., 2018)が多数存在することからも、この結果は妥当と考えられる。

3wFS により増加した無動時間は、ケタミン投与により noFS-VEH 群と同程度まで回復しており、ケタミンが幼若期ストレスに起因するうつ様行動を回復させたことが示唆された。FST で無動時間が変化することは、運動量の変化による影響を受けていないか解釈の際に留意する必要がある。本研究では Open field test などラットの運動量を直接計測はしていないが、先行研究ではケタミン 10 mg/kg の投与は、ラットの行動量を増加させないことが示されており(Hetzler and Wautlet, 1985 ; Podkowa et al., 2016)、FST の無動時間の差は運動量変化によるものではなく、うつ様行動を反映したものと考えられる。

noFS 群においては、ケタミン投与により逆に無動時間が増加するという興味深い結果となった。ストレスを負荷していないマウスに対しケタミンを投与した先行研究では、FST での無動時間減少を報告した研究もあり(Autry et al., 2011 ; Zanos et al., 2016)、今回の結果とは異なる。一方で、(R)-ケタミンを用いた最近の研究では、ストレスを負荷していないマウスではストレスを負荷されたラットよりも、抗うつ効果を得るために多くの(R)-ケタミンが必要であった(Fukumoto et al., 2017 ; Yang et al., 2017)との記述があり、事前のストレス負荷の有無によりケタミンに対する反応が異なる可能性も示唆される。しかしケタミンの抗うつ効果に関する先行研究で、本研究のようにストレスとケタミンの有無で 4 群に分けて比較検討した研究は見当たらない。先行研究からは、noFS-Ket 群で無動時間が増加したことに対する十分な考察は困難であるため、第 2 章以降も引き続き noFS-Ket 群を加え、うつ様行動が増加した原因を調べるため電気生理学的、形態学的実験を行う方針とした。

幼若期ストレスに起因するケタミンの効果の用量依存性検討したところ、ケタミン 1 mg/kg はうつ様行動を減少させないことが示された(統計解析はしていないが、結果から自明)。ケタミンの用量依存性を観察した先行研究では、げっ歯類において抗うつ効果を発揮するケタミンの量は 5-10 mg/kg とされており、多くても (> 50 mg/kg) 少なくとも (< 2 mg/kg) 抗うつ効果を発揮しない(Li et al., 2010 ; Zanos et al., 2016)ことが先行研究で示されている。本研究で設定したケタミン 1 mg に関しては、抗うつ効果を

発揮しないとされている用量であり、FST で無動時間が減少しなかったことは妥当と考える。ケタミンがおおよそ 5-10 mg/kg という特定の範囲でのみ効果を発揮するメカニズムは完全には解明されていないが、前述の用量のみで内側前頭前野において細胞外グルタミン酸濃度が増加すること(Moghaddam et al., 1997)や、mammalian target of rapamycin (mTOR) などシナプス新生に関わる蛋白が増加すること(Li et al., 2010)から、抗うつ効果の発現には特定の範囲の脳内ケタミン濃度が達成される必要があると考えられている。FST でうつ様行動の回復を認めなかったことから、3wFS に曝露しケタミン 1 mg を投与した群に対する検討は第 2 章以降では行わないこととした。

[1-4] 小括

- FST を用いて、3wFS に起因する 10 週齢ラットのうつ様行動の増加を確認した。
- ケタミン 10 mg/kg は、3wFS により増加した 10 週齢ラットのうつ様行動を減少させた。
- noFS ラットでは、ケタミン 10 mg/kg によりうつ様行動が逆に増加した。
- 低用量のケタミン（1 mg/kg）は、幼若期ストレスに起因するうつ様行動を減少させなかった。

第 2 章

内側前頭前野第 V 層錐体細胞に対する電気生理学的検討

うつ病の病態生理は未だ完全には明らかになっていないが、ヒトでは認知機能や感情のコントロールに重要な前頭前野や海馬の機能低下が密接に関わっていることが明らかにされている(Drevets et al., 1997 ; Sullivan and Gratton, 2002)。例えば、うつ病患者では前頭前野および辺縁系の容積が減少すること(MacQueen and Frodl, 2011 ; Price and Drevets, 2010)が知られている。同様に、幼少期に虐待を経験したうつ病患者においても、前頭前野、海馬などの機能および体積が低下すること(Andersen et al., 2008 ; Bremner et al., 1997 ; Vermetten et al., 2003 ; Vythilingam et al., 2002)が報告されている。また幼若期ストレスを負荷された動物を用いた研究でも、成熟期に内側前頭前野や海馬の萎縮および関連した行動異常が生じることが、多くの研究により明らかとなっている(Ishikawa et al., 2015 ; Lupien et al., 2009 ; Lyttle et al., 2015 ; Yamamuro et al., 2018)。これらの事実は、ヒト、動物ともに幼若期のストレスが成熟後において前頭前野（または内側前頭前野）の機能低下を引き起こすことがうつ病の重要な発症機序である事を示唆している。

Li ら(Li et al., 2011)は、慢性ストレスを負荷されたラットを用いて、うつ様行動が増加している個体では内側前頭前野 Prelimbic 領域 (PL) 第 V 層錐体細胞に入力する興奮性シナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current: EPSC) が減弱していること、さらにケタミンがこれらの変化を回復させることを報告した。このことから、ストレス負荷によって減少した PL 第 V 層錐体細胞の EPSC を回復させる事が、ケタミンの抗うつ効果の重要なメカニズムの一つと考えられる。幼若期ストレスが内側前頭前野に遷延性の障害を惹起するという先行研究の結果、および Li らの報告から、第 1 章でケタミンがうつ様行動を減少させた背景には、内側前頭前野第 V 層錐体細胞において減弱した EPSC をケタミンが回復させた可能性があると考えられた。

これまでのケタミンの抗うつ効果に関する研究は EPSC の回復との関連に焦点を当てたものが多いが、実際は正常な精神機能は EPSC のみではなく、対となる抑制性伝達 (Inhibitory postsynaptic current: IPSC) とのバランスの上に成り立っている(Luscher et al., 2011 ; Popoli et al., 2011 ; Sanacora et al., 2012)。IPSC の本態は、 γ -aminobutyric-acid (GABA) 作動性介在ニューロンから放出された GABA がシナプス後細胞の受容体に結合することにより、細胞内に流入する塩化物イオンである。EPSC はシナプス後細胞の細胞膜を脱分極させるが、IPSC は逆に膜電位を過分極させることにより、活動電位の発生を抑制する。IPSC は脳の無秩序な発火をコントロールすることで正常な機能を維持するのに不可欠であり、それを担う GABA 受容体の機能異常はてんかんなどの疾患を引き起こすことが知られている(Koe et al., 2009)。近年、慢性ストレスにより内

側前頭前野 Infralimbic 領域 (IL) 第 V 層錐体細胞において IPSC が増加する事が報告され(McKlveen et al., 2016)、EPSC の減弱のみならず IPSC の増加がうつ病の病態生理と直接関連していることが示唆されている。ケタミンは NMDA 受容体のみならず、GABA 受容体、 μ オピオイド受容体、ムスカリン型アセチルコリン受容体、モノアミン受容体など多彩な受容体に作用する事が知られている(Maher et al., 2017)。しかし、GABA 受容体を介したシグナルにどう影響を及ぼすか、それが抗うつ効果と関係しているかについて言及した研究は見当たらない。

これらの背景から、第 2 章では内側前頭前野の興奮性上昇が Whole-cell patch-clamp 法を用いて内側前頭前野第 V 層錐体細胞の EPSC、および IPSC を中心に電気生理学的变化を検討し、第 1 章で得られた結果の神経基盤を検証することとした。

[2-1] 実験材料および実験方法

1) 実験動物

第 1 章 1) 実験動物と同様。

2) 幼若期ストレス負荷

3wFS の負荷方法に関しては第 1 章 2) 幼若期ストレス負荷と同様。

3) 薬物投与

投与方法に関しては第 1 章 3) 薬物投与と同じ。FST は全例 69 日齢でケタミン投与、70 日齢で実験に用いたのに対し、Whole-cell patch clamp 法は前日にケタミン投与した上で、生後 70-90 日齢の期間で実施した。

4) 脳スライス作成

投薬を行ったラットを CO₂ で麻酔した後速やかに断頭し脳を取り出した。摘出した脳は pH7.4 に調整し 95% O₂ と 5% CO₂ の混合気体で bubbling した氷冷 low-Na⁺ solution (120 choline-Cl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 28 NaHCO₃, 8 MgCl₂ · 6 H₂O, 22 d-glucose; 単位 mM) 内にて即座に冷却した。次に、スライサー (VT1200S, Leica, Germany) で厚さ 300 μm の mPFC を含む急性環状断スライスを作製した。組織の回復のため、作成したスライスを 35°C の low-Na⁺ solution と人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid: ACSF; 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 20 d-glucose; 単位 mM) の 1:1 混合液にて 30 分定温放置した後、さらに室温の ACSF 中で 30 分経過させた後、Whole-cell patch-clamp 法に用いた。

5) Whole-cell patch-clamp 法

Whole-cell patch-clamp 法は、Neher と Sakmann(Neher et al., 1968)により開発された patch-clamp 法を発展させ、Hamill(Hamill et al., 1981)らにより報告された方法で、細胞単位で膜電位、膜電流の計測を可能にする。測定方法には、電位を固定し細胞に流れる微小電流を記録する電位固定法と、一定の電流を流して膜電位の変化を記録する電流固定法がある。第 2 章では、第 1 章で示された結果の神経基盤を検討するため、Whole-cell patch-clamp 法を用いて内側前頭前野第 V 層錐体細胞の電気生理学的変化を

検討した。

実験には赤外線 CCD カメラ (IR filter-removed DP72, Olympus, Tokyo) を搭載した正立型顕微鏡 (BX51WI, Olympus, Tokyo) を用いた。還流液としては 32°C に保温した ACSF を用い、ガラス電極は内液を入れた状態での抵抗値 3-5 M Ω のものを用いた。電氣的刺激の負荷とデータ取得には Axopatch 200B amplifier and Clampex 10.6 software (Molecular Devices, CA, USA) を、データ解析には Clampfit 10.4 (Molecular Devices, CA, USA) を使用した。実際に記録を取得した PL および IL 領域と、Whole-cell patch-clamp 法による記録中の画像例を図 2-1 に示す。

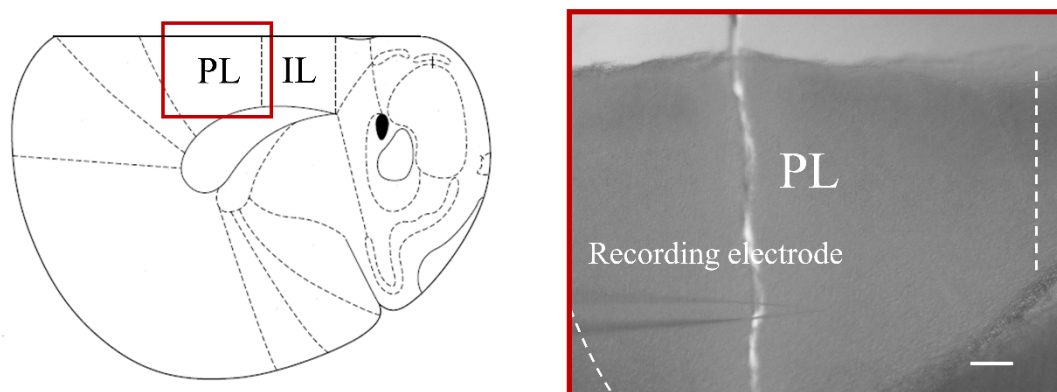


図 2-1 内側前頭前野を含む環状断スライスのシェーマと、実際に Whole-cell patch-clamp 法で記録を取得した PL 第 V 層部位。Scale bar : 100 μ m。

5-1) 電流固定法による記録

電流固定法の記録電極内液には、6 KCl, 130 K_D-gluconate, 10 NaCl, 0.5 EGTA, 2 MgCl₂, 0.16 CaCl₂, 10 HEPES, 4 (2Na)-ATP, 0.4 (2Na)-GTP (単位 mM) の組成を用いた。電位固定法では、発火閾値 (threshold)、活動電位の振幅 (amplitude)、半値幅 (half width)、活動電位の発火頻度 (firing frequency) のデータを取得した。発火閾値は、400 pA の電流を 1 秒間細胞に流すことで膜電位を上昇させ、最初の活動電位が生じた電位を測定した。活動電位の振幅は、単発の活動電位が出現する電流 (1 nA 前後) を 3 ms 注入することで単波形を誘導し、活動電位の始点から頂点までの電位幅を測定した。半値幅は単波形の全振幅の midpoint の電位における活動電位の幅の時間を測定した。発火頻度は、-0.2 nA から 0.5 nA まで、0.05 nA 刻みの電流を 500 ms 注入し、膜電位の変化および発生する活動電位の数を記録した。この過程で、電流を流さないとき (0 nA) のデータを静止膜電位として記録し、-0.2 nA から 0 nA までの電流を流した際、電流を止

める直前の膜電位をプロットし、その傾きを膜抵抗として算出した。

なお、発火閾値、活動電位の振幅、半値幅に関しては実験初期に 3 群（noFS-VEH vs 3wFS-VEH vs 3wFS-Ket）比較のデザインでデータを取得していた時期のものであるため、noFS-Ket 群のデータは存在しない。なお、ACSF と電極内液の駅間で差は約 9 mV であったので、この数値は得られた結果から補正した。

5-2) 電位固定法による記録

電位固定法の記録電極内液には、7.5 CsCl, 127.5 Cs-methanesulfonate, 0.6 EGTA, 10 HEPES, 2.5 MgCl₂, 4 Na₂-ATP, 0.4 Na₃-GTP, Na₂ phosphocreatine（単位 mM）の組成液を用いて、自発性興奮性シナプス後電流（spontaneous EPSC: sEPSC）と自発性抑制性シナプス後電流（spontaneous IPSC: sIPSC）をそれぞれ -70 mV と 0 mV に膜電位固定して測定した。EPSC および IPSC は、それぞれ AMPA および NMDA 受容体阻害剤である 3 mM キヌレン酸（Sigma, SL, USA）と GABA_A 受容体阻害剤である 0.1 mM ピクロトキシン（Nacalai Tesque, Kyoto）を用いて薬理的に確認した。次に、シナプスの性質を詳細に評価するため、電位依存性 Na チャネルブロッカーである 0.5 μ M テトロドトキシン（Nacalai Tesque, Kyoto）を還流液に添加することで、微小興奮性シナプス後電流（miniature EPSC: mEPSC）と微小抑制性シナプス後電流（miniature IPSC: mIPSC）を調べた。効果を十分に得るため、還流液にテトロドトキシンを加えてから少なくとも 15 分経過後にデータを取得した。データの解析には、Mini Analysis (Synaptosoft Inc, CA, USA) を用いた。閾値は 5 pA に設定し、自動解析で検出できなかったイベントやアーチファクトは目視で修正した。解析には、sEPSC ; 6 秒間、mEPSC ; 20 秒間、sIPSC ; 3 秒間、mIPSC ; 6 秒間に発生した各シナプス電流のデータを用いた。

6) 統計解析

統計解析ソフトは SPSS ver. 23 (IBM, CA, USA) を用い、結果は平均値 $\pm$ SEM で示した。3 群間での発火閾値、活動電位の振幅、半値幅の比較には、one-way ANOVA を用いた。4 群の比較では two-way ANOVA を用い、交互作用が有意だった場合は one-way ANOVA で単純主効果の検定を行った。発火頻度の比較には注入電流の要素を加えた three-way ANOVA を行った。Mauchly の球面性試験が有意だった場合、Greenhouse-Geisser 補正を用いた。EPSC および IPSC のデータは正規分布しないため、比較には通常 Kolmogorov-Smirnov test が用いられるが、本研究では幼若期ストレスおよびケタミンの交互作用・主効果を検討するため、two-way ANOVA を用い、単純主効果で有意差が検出された場合は有意水準 0.0125 (0.05/4: Bonferroni 補正) で Mann-Whitney U test

を行った。この結果 $p > 0.0125$ だった場合、有意差なしとみなした。

[2-2] 実験結果

1) 3wFS およびケタミンが PL 第 V 層錐体細胞発火閾値、活動電位振幅、半値幅に与える影響

発火閾値、活動電位振幅、半値幅の結果を図 2-2 に示す。これらの項目に関して有意差は認めなかった。

なお、本データを取得した時期は、noFS-Ket 群を設定していなかったため、3 群間の比較となっている。3wFS およびケタミンの影響を認めなかったため、本項目に関しては noFS-Ket 群を設定した後にはデータを取得しなかった。

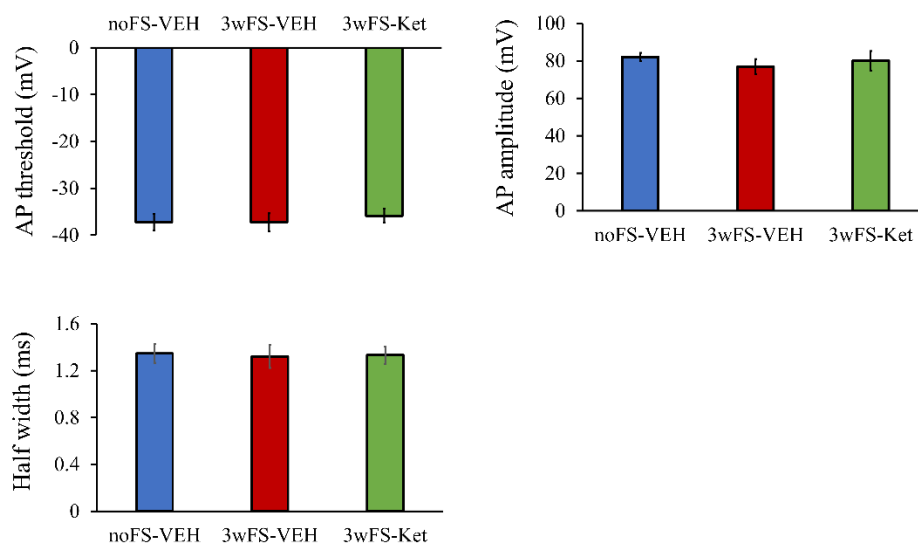


図 2-2 3wFS とケタミンが PL 第 V 層錐体細胞の発火閾値、振幅および半値幅に与える影響

データは平均値±SEM で表示。これらの項目に関して、群間に有意差を認めなかった。N : noFS-VEH (8), 3wFS-VEH (6), 3wFS-Ket (7)。AP: action potential。

2) 3wFS およびケタミンが PL 第 V 層錐体細胞の発火頻度を与える影響

発火頻度の結果を図 2-3 に示す。Mauchly の球面性検定が有意であったため ($W < 0.001, p < 0.001$)、Greenhouse-Geisser の補正を適用した。3wFS、ケタミン、注入電流の間の交互作用は有意ではなく (three-way ANOVA, $F(1.729, 53.597) = 0.293, p = 0.715$)、ケタミンの主効果を認めた ($F(1,31) = 32.388, p < 0.001$)。

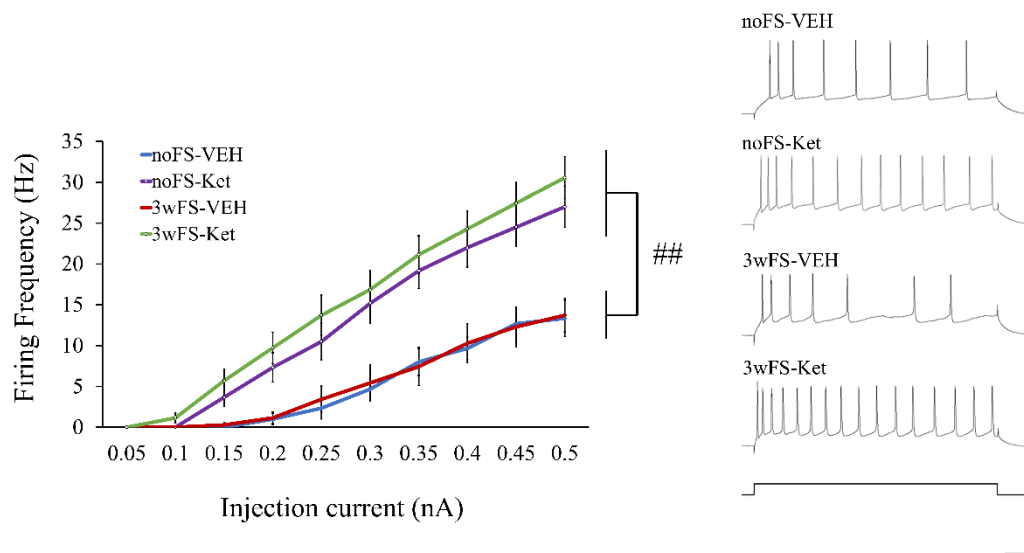


図 2-3 3wFS とケタミンが PL 第 V 層錐体細胞の発火頻度を与える影響と、0.5 nA の電流を注入した際の典型的電位変化

データは平均値±SEM で表示。## $p < 0.01$ 。N : noFS-VEH (9), noFS-Ket (12), 3wFS-VEH (7), 3wFS-Ket (7)。Scale bar : 高さ 20 mV, 0.5 nA、横 : 0.05 ms。

次に膜抵抗と静止膜電位の結果を図 2-4 に示す。膜抵抗に関して、3wFS とケタミンの交互作用を認めず ($F(1,31)=0.213, p=0.648$)、ケタミンの主効果を認めた ($F(1,31)=4.751, p=0.037$)。一方、静止膜電位には有意差は認めなかった。

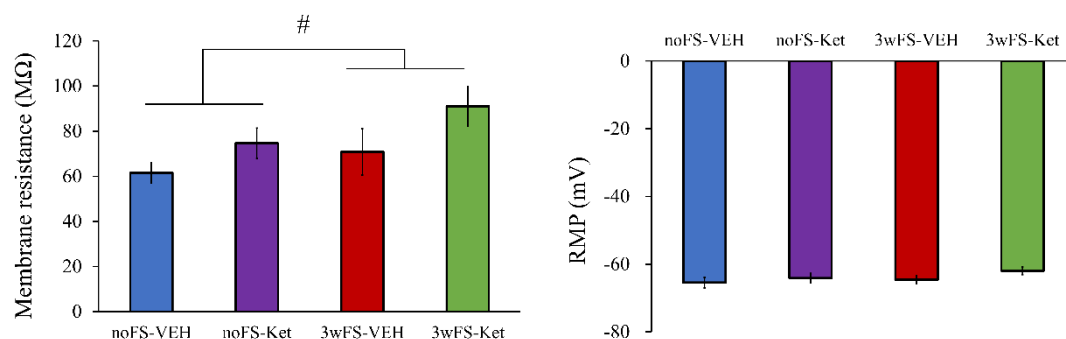


図 2-4 PL 第 V 層錐体細胞の膜抵抗と静止膜電位の比較

データは平均値±SEM で表示。# $p<0.05$ 。N : noFS-VEH (9), noFS-Ket (12), 3wFS-VEH (7), 3wFS-Ket (7)。RMP: Resting membrane potential。

部位によるケタミンの効果に際があるか検討するため、発火頻度、膜抵抗、静止膜電位に関して **Infralimbic cortex (IL)** 第 V 層錐体細胞でもデータを取得した (図 2-5) が、いずれも有意差を認めず、ケタミンが発火頻度を増加させる効果は PL に特異的な事が示された。

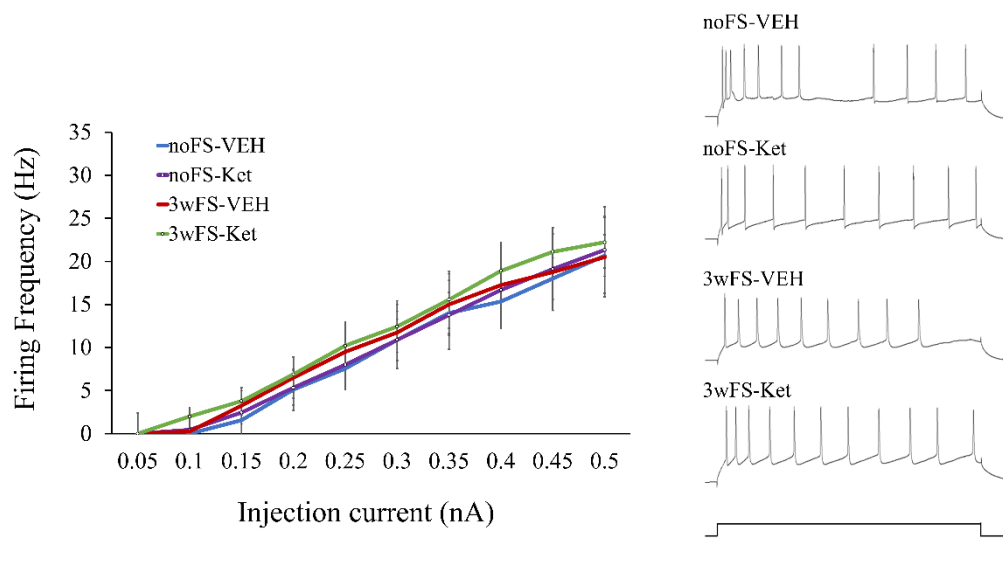


図 2-5 3wFS とケタミンが PL 第 V 層錐体細胞の発火頻度に与える影響と、0.5 nA の電流を注入した際の典型的電位変化

データは平均値±SEM で表示。N : noFS-VEH (9), noFS-Ket (9), 3wFS-VEH (8), 3wFS-Ket (9)。Scale bar : 高さ 20 mV, 0.5 nA 横 : 0.05 ms。

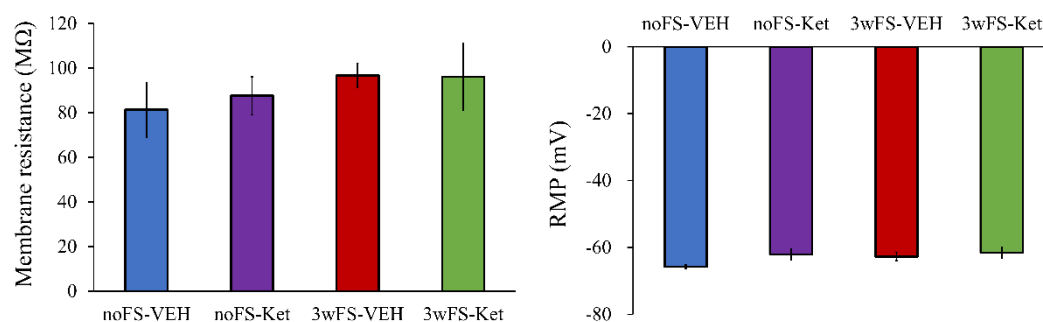


図 2-6 IL 第 V 層錐体細胞の膜抵抗と静止膜電位の比較

データは平均値±SEM で表示。# $p < 0.05$ 。N : noFS-VEH (9), noFS-Ket (9), 3wFS-VEH (8), 3wFS-Ket (9)。RMP: Resting membrane potential。

3) 3wFS およびケタミンが sEPSC の振幅（振幅）および波形発生間隔（Inter-event interval: IEI）に与える影響

各群の sEPSC の振幅および IEI の解析結果と代表的波形を図 2-7 に示す。振幅に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミンの間に交互作用を認めた ($F(1,6128)=75.684$, $p < 0.001$)。one-way ANOVA で単純主効果の検定を行ったところ、VEH 群において 3wFS により振幅が低下し ($F(1,2355)=51.096$, $p < 0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより振幅が増加する ($F(1,3403)=72.351$, $p < 0.001$) 結果となった。すなわち、3wFS により低下した振幅がケタミンにより回復する事が示された。noFS 群においては、ケタミンにより振幅が減少していることが示された (one-way ANOVA, $F(1,2724)=18.368$, $p < 0.001$)。

IEI に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミン投与の間に交互作用を認めた ($F(1,6062)=44.139$, $p < 0.001$)。one-way ANOVA で単純主効果の検定を行ったところ、VEH 群において 3wFS で IEI が増加し ($F(1,2319)=52.975$, $p < 0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより IEI が減少する ($F(1,3364)=181.193$, $p < 0.001$) 結果となった。つまり、3wFS によって減少した sEPSC の頻度が、ケタミンにより増加する事が示された。

noFS 群においては、ケタミンにより IEI が減少していた (one-way ANOVA, $F(1,2698)=35.028$, $p < 0.001$)。

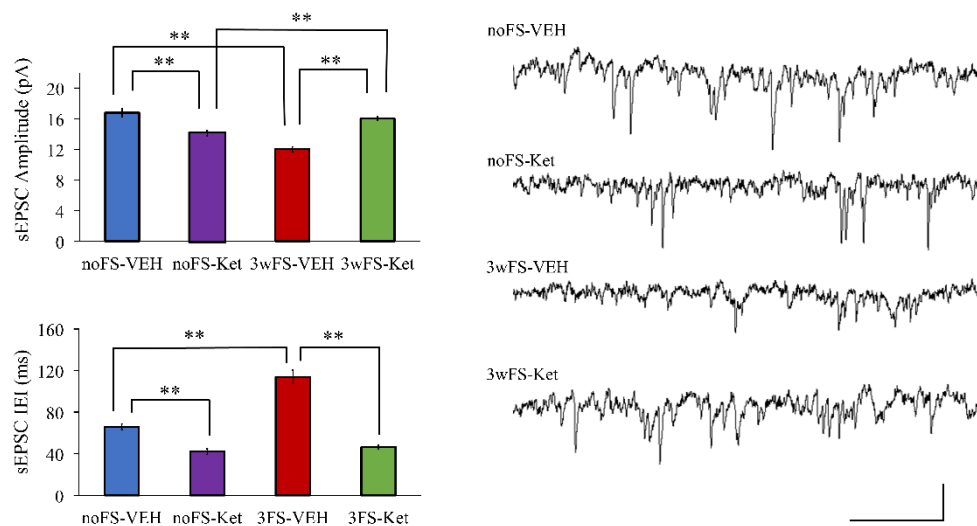


図 2-7 3wFS およびケタミンが sEPSC の振幅および頻度を与える影響と、各群の典型的波形

データは平均値±SEM で表示。** $p < 0.01$ 。N (記録細胞数) : noFS-VEH (15), noFS-Ket (11), 3wFS-VEH (21), 3wFS-Ket (19)。Bar: 高さ 10 pA, 幅 200 ms。

4) 3wFS およびケタミンが mEPSC の振幅および IEI に与える影響

mEPSC の振幅および IEI の結果と代表的波形を図 2-8 に示す。振幅に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミン投与の間に交互作用を認めた ($F(1, 6150) = 88.495, p < 0.001$)。one-way ANOVA による単純主効果の検定で、VEH 群において 3wFS により振幅が減少し ($F(1, 2905) = 41.107, p < 0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより振幅が増加する (one-way ANOVA, $F(1, 2676) = 39.018, p < 0.001$) 結果となった。つまり、3wFS によって減少した振幅が、ケタミンにより回復する事が示された。noFS 群においては、ケタミンにより振幅が減少する結果となった ($F(1, 3474) = 50.581, p < 0.001$)。

IEI に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミン投与の間に有意な交互作用を認めた ($F(1, 6110) = 110.582, p < 0.001$)。one-way ANOVA による単純主効果の検定により、VEH 群において 3wFS は IEI を増加させ ($F(1, 2885) = 153.226, p < 0.001$)、3wFS 群において、ケタミンにより IEI が減少する ($F(1, 2655) = 107.355, p < 0.001$) 結果となった。すなわち、3wFS によって減少した頻度が、ケタミンにより回復したことが示された。noFS 群においてケタミンは、IEI を増加させた ($F(1, 3455) = 14.141, p < 0.001$)。

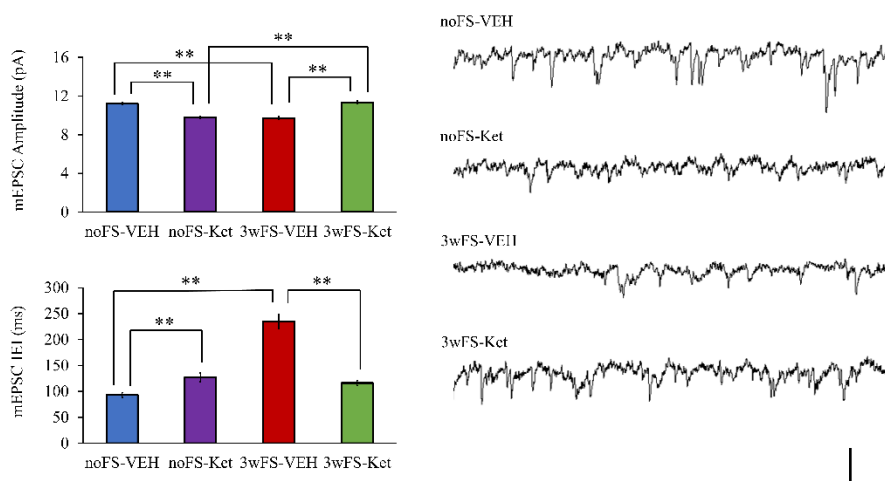


図 2-8 3wFS およびケタミンが mEPSC の振幅および頻度に与える影響

データは平均値±SEM で表示。** $p < 0.01$ 。N (記録細胞) : noFS-VEH (10), noFS-Ket (9), 3wFS-VEH (10), 3wFS-Ket (11)。Scale bar: 高さ 10 pA, 幅 200 ms。

5) 3wFS およびケタミンが sIPSC の振幅および IEI に与える影響

sIPSC の振幅および IEI を比較した結果と代表的波形を図に示す。振幅に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミン投与の間に交互作用を認めた ($F(1, 6626) = 10.534, p = 0.001$)。one-way ANOVA による単純主効果の検定を行ったところ、VEH 群において 3wFS により振幅が低下し ($F(1, 3118) = 65.373, p < 0.001$)、3wFS 群においてケタミンにより振幅が増加する ($F(1, 3497) = 76.817, p < 0.001$) 結果となった。つまり、3wFS によって減少した振幅が、ケタミンにより増加する結果となった。noFS 群においては、ケタミンにより振幅が増加した ($F(1, 2679) = 62.18, p < 0.001$)。

IEI に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミン投与の間に交互作用を認めた ($F(1, 6586) = 14.256, p < 0.001$)。one-way ANOVA で単純主効果の検定を行ったところ、3wFS 群においてケタミンにより IEI が減少し ($F(1, 3923) = 10.405, p = 0.001$)、noFS 群において、ケタミンにより IEI が減少する ($F(1, 2663) = 45.304, p < 0.001$) 結果となった。VEH 群において 3wFS で IEI が減少する傾向を認めたが、有意差は認めなかった (one-way ANOVA: $F(1, 3098) = 10.075, p = 0.002$; Mann-Whitney U test: $p = 0.037$)。

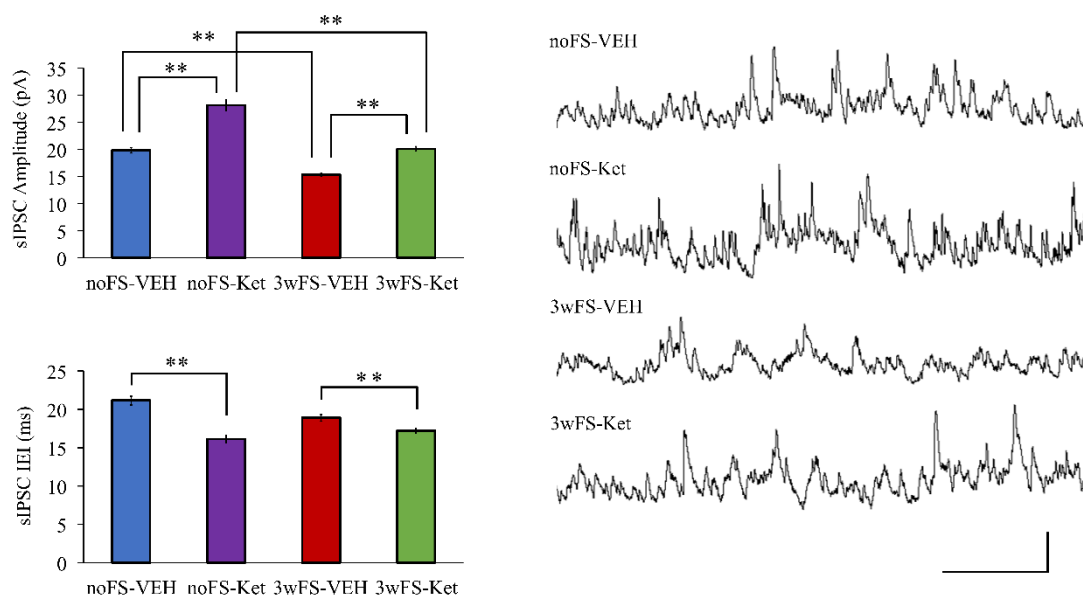


図 2-9 3wFS およびケタミンが sIPSC の振幅および頻度を与える影響

データは平均値±SEM で表示。** $p < 0.01$ 。N (記録細胞) : noFS-VEH (9), noFS-Ket (7), 3wFS-VEH (11), 3wFS-Ket (13)。Scale bar: 高さ 50 pA, 幅 200 ms

6) 3wFS およびケタミンが mIPSC の振幅および IEI に与える影響

mIPSC の振幅および IEI を比較した結果と代表的波形を図に示す。振幅に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミンの間に交互作用は認めず ($F(1, 9510) = 0.382, p = 0.536$)、3wFS の主効果を認めた ($F(1, 9510) = 165.715, p < 0.001$)。つまり 3wFS により、mIPSC の振幅が増加する結果となった。

IEI に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミンの間に交互作用を認めた ($F(1, 9476) = 34.322, p < 0.001$)。noFS 群において、ケタミンにより IEI が増加し ($F(1, 3867) = 4.508, p = 0.034$)、3wFS 群においてケタミンにより IEI が減少 ($F(1, 5609) = 67.467, p < 0.001$) する結果となった。

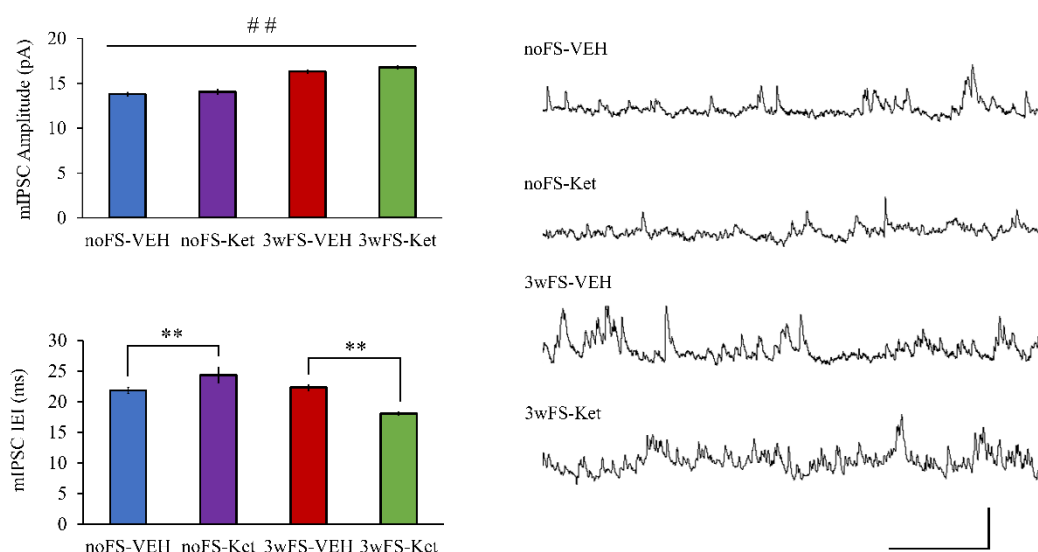


図 2-10 3wFS およびケタミンが mIPSC の振幅および頻度を与える影響

データは mean $\pm$ SEM で表示。** $p < 0.01$ 。## $p < 0.01$ 。N (記録細胞) : noFS-VEH (9), noFS-Ket (6), 3wFS-VEH (10), 3wFS-Ket (9)。Bar: 高さ 50 pA, 幅 200 ms

[2-3] 考察

第2章では、Whole-cell patch-clamp 法を用いて内側前頭前野第 V 層錐体細胞の電気生理学的変化について検討した。

電位固定法により、幼若期ストレスによってグルタミン酸系興奮性伝達が減弱し、ケタミンによりこの変化が回復することが示された。この結果と第1章で認めた行動学的変化は、うつ様行動と内側前頭前野第 V 層錐体細胞における EPSC が相関することを示した Li ら(Li et al., 2011)の報告と一致しており、幼若期ストレスに起因するうつ様変化に対するケタミンの有効性を支持していると考えられた。

sEPSC はシナプス前ニューロンの活動依存的なグルタミン酸放出によって引き起こされるシナプス電流であるのに対し、mEPSC はその頻度がシナプス前部におけるグルタミン酸の放出確率もしくは vesicle の数を、振幅がシナプス後部の AMPA 型受容体の発現数や機能を反映すると考えられている(Ishikawa et al., 2002 ; Liu et al., 1999 ; Oertner et al., 2002)。つまり、テトロドトキシンを用いて活動電位を抑制して mEPSC を調べることにより、シナプス自体の性質をより詳細に推察する事ができる。さらに、mEPSC の振幅および頻度はシナプスの安定性を反映することが知られている(Zhang et al., 2005)。そこで本研究では、幼若期ストレスおよびケタミンがシナプスの性質にどのような影響を及ぼしたかを検証するため mEPSC に関しても検討した。その結果、3wFS により mEPSC の振幅および頻度が有意に減少し、ケタミンによってこれらが回復することが示された。この結果は、EPSC の変化には、シナプス前／後部両方が関係していることを示している。詳細は第3章で述べるが、これまでの研究により、EPSC が改善するメカニズムとしてシナプス後部の受容体が増加する事は解明されている(Duman, 2014 ; Duman et al., 2016)。しかしシナプス前部からのグルタミン酸放出確率もしくは vesicle 数の低下が回復することを示したのは本研究が初めてである。このことは、ケタミンの抗うつ効果の作用点が、シナプス前部にも存在することを示した点で重要な知見と言える。

電流固定法により、PL 第 V 層錐体細胞の膜抵抗および発火頻度はケタミンにより有意に上昇することが示された。Klein ら(Klein et al., 2010)は、mPFC を障害することによりラットのうつ様行動が増加することを、さらに Hamani ら(Hamani et al., 2010a ; Hamani et al., 2010b ; Hamani and Temel, 2012)は mPFC を刺激することによってうつ様行動が減少することを報告した。このことから、内側前頭前野における活動電位の発生がうつ様行動と関連していると考えられ、ケタミンにより膜抵抗が上昇したことはうつ様行動の減少に寄与した可能性がある。細胞膜の電位変化はオームの法則 ($V = IR$) に従うため、入力電流 (I) が一定であれば、膜抵抗 (R) が大きい程膜電位 (V) の上昇は大きくなり、活動電位が発生し易くなる。膜抵抗の大きさはイオンチャネル

の性質の影響を受けることが知られている(Shikanai et al., 2012)。このことから、ケタミンが内側前頭前野第 V 層錐体細胞のイオンチャンネルにも作用する可能性を想定していたが、本研究で検証した活動電位のパラメータには差が無く、ナトリウム、カリウム、カルシウムイオンチャンネルなどの性質的变化を示唆する結果は得られなかった。ケタミンが膜抵抗を上昇させた機序に関しては、本研究の結果からは不明である。

興味深いことに、膜抵抗の上昇は同じ第 V 層でも IL の錐体細胞では認めなかった。PL と IL は機能的に差異があることが知られている。Vertes ら(Vertes, 2004)は、PL は辺縁系へ投射し認知機能を、IL は脳幹へ投射し自律神経系の支配に寄与していることを報告している。Jett ら(Jett et al., 2015)は、ストレスを負荷により低下したラットの認知機能をケタミンが改善させ、この変化は PL と腹側海馬を刺激することで再現されたことから、この間の興奮性伝達が認知機能に重要であると報告した。さらに Moshe ら(Moshe et al., 2016)は、ストレス負荷によりうつ様行動が増加したラットの PL を電氣的刺激することにより、FST での無動時間が減少することを報告した。これらの先行研究から考えると、ケタミンは PL の神経活動を増強することにより 3wFS で低下した認知機能を改善させ、それによって間接的にうつ様行動である強制水泳試験の無動時間が減少した可能性がある。一方、活動電位発生頻度および膜抵抗が上昇していたにもかかわらず、noFS-Ket 群ではうつ様行動が増加していた。神経活動が増強しているにも関わらず、うつ様行動が増加した原因については、第 3 章で、spine の形態的解析の結果を合わせて考察する。

本研究では IPSC についても検討したが、行動学的検討の結果とは一致しなかった。mIPSC の頻度は VEH 群において 3wFS の影響を受けず、3wFS 群においてケタミンによって増加していた。この結果は、IL 第 V 層においてストレスが mIPSC の頻度を増加させることを示した McKlveen ら(McKlveen et al., 2016)の報告とは異なるが、本研究では検討した部位が PL であるため、結果に差異が生じた可能性がある。本研究ではうつ様行動と IPSC に関連を見出すことはできなかったが、PL 第 V 層錐体細胞において、幼若期ストレスおよびケタミンが IPSC にも影響することが示された点は有意義であったと考える。今後 IPSC にも研究対象を広げていくことで、ケタミンの抗うつ効果に関する新たな知見が得られる可能性がある。

[2-4] 小括

- ・幼若期ストレスによって、成熟後における PL 第 V 層錐体細胞の EPSC が減弱した。
- ・幼若期ストレスによって減弱した sEPSC をケタミンが回復させたことが、うつ様行動が減少した背景にあったと考えられる。
- ・ケタミンはシナプス後部の受容体機能の増強のみならず、シナプス前部からのグルタミン酸の放出も増加させることで興奮性シナプス伝達を強化させることが示唆された。
- ・抑制性シナプス伝達に対して 3wFS およびケタミンが影響を及ぼすことが示されたが、うつ様行動との明らかな関連性は見いだせなかった。

第3章

内側前頭前野第V層錐体細胞の樹状棘突起に対する形態学的検討

錐体細胞の樹状突起上には、グルタミン酸受容体が数多く発現している棘突起(spine)と呼ばれる構造が多数存在する。一つ一つの spine は成熟度によってその形態が変化することが知られており、新生したばかりの spine は細い棒状であるが、成熟するほど頭部の径が大きく成長し、より多くの AMPA 型受容体を有するマッシュルーム型となる(Moench and Wellman, 2015 ; Rochefort and Konnerth, 2012)。つまり、樹状突起が長く伸び、spine 密度が高く、成熟型 spine の比率が高い程、その細胞は多くの興奮性入力を受け入れている事を示唆する。逆に樹状突起が短く、spine 密度が疎であれば、興奮性入力は少なくなると考えられる(Holtmaat and Svoboda, 2009 ; Kessels and Malinow, 2009)。興味深いことに、樹状突起長や spine の形態はストレスなどに反応して変化する事が知られており(Duman et al., 2016 ; Radley et al., 2006)、成熟期の慢性ストレス負荷によりうつ様行動が増加した動物では、内側前頭前野において錐体細胞の樹状突起や spine の萎縮性変化が生じることが報告されている(Li et al., 2010 ; Liu and Aghajanian, 2008 ; Moench and Wellman, 2015)。さらに、慢性ストレスから解放された一定時間後に、短縮した樹状突起長が回復することも報告されている(Radley et al., 2005)。錐体細胞の樹状突起や spine の形態と内側前頭前野の興奮性、ならびにうつ様行動は密接に関わっていると考えられている。このことは Kang ら(Kang et al., 2012)がうつ病患者の脳を解剖し、前頭前野の容積とシナプス数の減少を報告したことからも支持される。

幼若期ストレスは中枢神経系に epigenetic な変化を惹起することが報告されており(Menke and Binder, 2014)、その結果代表的ストレスホルモンであるグルココルチコイドの分泌に関わる視床下部-下垂体-副腎皮質系および神経新生に重要な脳由来神経成長因子(Brain derived neurotrophic factor: BDNF)の発現に関わる遺伝子に異常が生じ、正常なシナプス形成が障害されることが報告されている(McGowan et al., 2009 ; Roth et al., 2009)。幼若期ストレスが成熟後の spine の形態に及ぼす影響に関して言及した報告は少ないが、Lytle らは3週齢のラットに電気刺激ストレスを負荷することで、内側前頭前野錐体細胞の spine 密度の低下および樹状突起長の短縮が生じることを報告した(Lytle et al., 2015)。また、Yamamuro ら(Yamamuro et al., 2018)は2週齢時の社会的分離ストレスにより成熟後に内側前頭前野錐体細胞の樹状突起長が短縮し、EPSC が減弱することを報告した。このことは、幼若期ストレスによって成熟期において spine の萎縮が生じ、それが成熟期のうつ様行動や興奮性伝達の減少と関連していることを示唆している。

慢性ストレスを負荷した動物を用いた先行研究により、ケタミンは spine の新生・成

熟を促し、密度上昇と成熟 spine の比率を増加させることが分かっている(Duman et al., 2016 ; Duman et al., 2012 ; Li et al., 2011)。Duman ら(Duman and Aghajanian, 2012)はケタミン投与約2時間後に、ラットの脳において AMPA 型受容体サブユニットの一つである GluA1 を始めとした、シナプス新生を示唆するタンパクの発現が増加していることを報告した。2 時間というタイムラグがケタミンの抗うつ効果のオンセットと一致することからも、ケタミン投与をトリガーにした AMPA 型受容体の増加による興奮性シグナルの増加が、ケタミンが抗うつ効果を発揮する重要な作用機序と考えられている(Li et al., 2011 ; Zanos et al., 2016)。ケタミンが spine 形成を誘導するメカニズムは完全には解明されていないが、有力な仮説として、GABA 作動性インターニューロンの disinhibition hypothesis がある(Duman et al., 2012)。これは、ケタミンが GABA 作動性インターニューロンの NMDA 型受容体を選択的にブロック→インターニューロンの活性が低下しシナプス前細胞への抑制性シグナルが減少 (disinhibition) →シナプス前細胞の興奮性が増加することによるシナプス間隙へのグルタミン酸の放出増加、という機序で錐体細胞への興奮性入力が一時的に増加し、それが引き金となってシナプス後の錐体細胞で BDNF の放出→トロポミオシン関連チロシンキナーゼ B (TrKB) への BDNF の結合→セリン/スレオニンキナーゼの活性化→mTORC1 の活性化が生じ、最終的に AMPA 型受容体の増加によるシナプス新生・成熟が起こり、持続的な興奮性伝達の増強が生じるとされている。このことは、錐体細胞においてケタミンにより EPSC が増加することからも支持される(Li et al., 2010 ; Li et al., 2011)。これらの事実から、うつ病の重要な神経基盤およびケタミンの作用メカニズムに、前頭前野におけるグルタミン酸系神経伝達の回復が重要な役割を担っていると考えられている。

幼若期ストレスによって spine の萎縮が生じ、かつこの変化をケタミンが回復させることが示されれば、幼若期ストレスにより惹起されたうつ様変化にケタミンが有効である、という本研究の仮説を形態学的に裏付けることが可能となる。第2章で PL 第 V 層錐体細胞の mEPSC を調べた結果、振幅が 3wFS により減少し、ケタミンにより回復することを認めた。このことから、シナプス後部の受容体の数もしくは機能が増大していると考えられた。第3章では、Whole-cell patch-clamp に用いた細胞の形態を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することで、第2章で得られた結果を形態学的に検証することとする。

[3-1] 実験材料および実験方法

1) 実験動物

第1章 1) 実験動物と同様。

2) 幼若期ストレス負荷

第2章 2)と同じ。

3) 薬物投与

第2章 3)と同じ。

4) 脳スライス作成

第2章 4)と同じ。

5) 蛍光染色

whole-cell patch-clamp 法に用いた脳スライスを、4%パラホルムアルデヒド 0.1 M Phosphate buffer 溶液 (pH 7.3) に移し一晩 4 °Cにて浸漬固定した。スライスを 0.1% Triton (Triton X-100, Bio-Rad, CA, USA) を含んだ 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS) にて 30 分間室温静置した後、0.1% Triton 含有 0.01 M PBS にて希釈した 10% Normal donkey serum (Sigma, USA) にて 30 分間、室温静置によるブロッキングを行った。0.1% Triton 含有 0.01 M PBS にて 1600 倍に希釈したストレプトアビジン Alexa Fluor® 488 (Jackson Immuno Research, PA, USA) を 2 時間、遮光にて室温静置した。0.1% Triton 含有 0.01 M PBS にて 10 分間×3回の洗浄をした後、スライスを Prolong™ (Thermo Fisher Scientific, OR, USA) を用いてスライドガラスに上に封入した。

6) Spine の 3D イメージ取得

3D イメージは共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000) と FV10-ASW ver3.1 (ともに Olympus, Tokyo) を用いて取得した。先端および基底樹状突起上の棘突起を、対物レンズ 60 倍、デジタルズーム 2 倍、Z-stack 0.5 μm の条件で撮像した。spine の形態的データを取得する領域の基準は、先端樹状突起：(1) 主要樹状突起の分岐から軟膜 (Pia) 側の領域

である tuft 部位、(2) Pia から 200 μm 以内、(3) 樹状突起の径が 1 μm 以上（一定の太さの樹状突起同士で比較するため）、(4) 樹状突起が極度に beading（ビーズ飾り状の形態）していない部位（spine との区別が困難なため）、基底樹状突起：(1) 細胞体から直接伸びている分枝、(2) 細胞体近傍の spine 密度が疎な部分は除外、とした。記録を取得した代表例を図 3-1 に示す。

取得した画像から Image J (Schneider et al., 2012) と SPISO (Mukai et al., 2011) を用いて spine の直径と密度を測定した。前述の通り spine 頭部の直径はシナプス伝達の強度を反映するため、spine を mature ($>0.6\mu\text{m}$) と immature ($<0.6\mu\text{m}$) に分類 (Amatrudo et al., 2012) し、その割合を算出した。

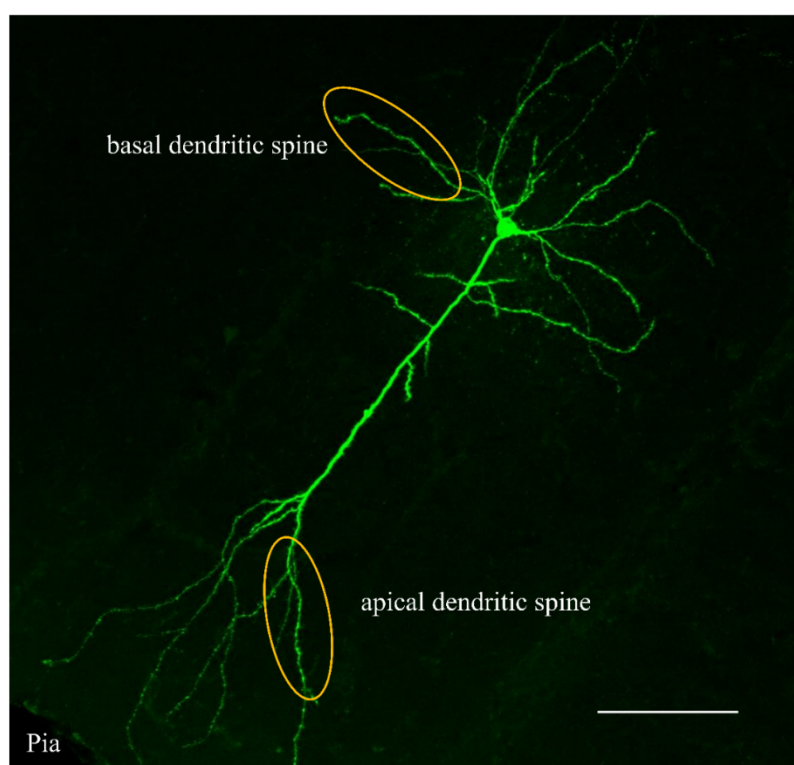


図 3-1 蛍光染色された PL 第 V 層錐体細胞と、データ取得に使用した領域（楕円）太さが 1 μm を超え、鮮明に染色された樹状突起を選択し、60 倍対物レンズと 2 倍デジタルズームを用い、spine の画像を取得した。Scale bar 100 μm

7) 統計学的手法

統計解析ソフトは SPSS ver. 23 (IBM, CA, USA) を用いた。群間の比較は two-way ANOVA を用い、交互作用が有意だった場合は one-way ANOVA で単純主効果の検定を行った。

[3-2] 実験結果

1) 3wFS およびケタミンが樹状突起上の spine の密度および成熟度に及ぼす影響

データを取得した樹状突起の長さは、noFS-VEH 群：112±22、noFS-Ket 群：111±14、3wFS-VEH：115±16、3wFS-Ket 群：118±24 (mean±SD、単位 μm) であった。先端樹状突起上の spine 密度および Spine の成熟度の結果を図 3-2 に示す。密度に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミン投与の間に有意な交互作用を認めた ($F(1.39) = 5.464, p = 0.025$)。one-way ANOVA による単純主効果の検定により、VEH 群は 3wFS により spine 密度の有意な低下を認めた ($F(1.21) = 23.508, p < 0.001$)。3wFS 群では、ケタミンにより spine 密度が増加する傾向が見られた ($F(1.20) = 3.032, p = 0.097$)。つまり、3wFS により spine 密度が低下し、その変化はケタミンにより改善する傾向が見られた。成熟 spine の割合に関する解析において、two-way ANOVA で 3wFS とケタミン投与間に交互作用は認めず ($F(1.39) = 1.902, p = 0.176$)、ケタミンの主効果を認めた ($F(1.39) = 10.044, p = 0.003$)。ケタミンにより、spine の成熟が促される可能性が示された。

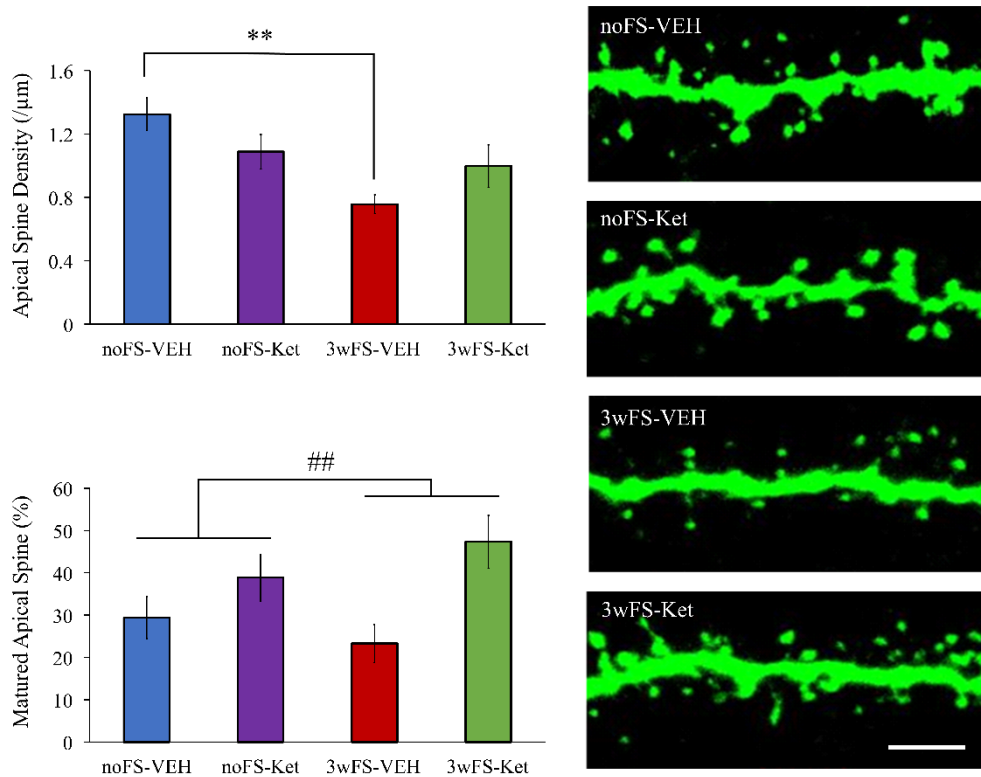


図 3-2 先端樹状突起の spine 密度と、成熟 spine の割合および各群の典型的画像
データは平均値±SEM で表示。** $p < 0.01$ 。## $p < 0.01$ 。N : noFS-VEH (11), noFS-Ket (10), 3wFS-VEH (12), 3wFS-Ket (10)。Scale bar 5 μm。

2) 基底樹状突起についての解析

データを取得した樹状突起の長さは、noFS-VEH 群 : 119 ± 16 、noFS-Ket 群 : 126 ± 22 、3wFS-VEH 群 : 109 ± 17 、3wFS-Ket 群 : 103 ± 22 (mean $\pm$ SD、単位 μm) であった。基底樹状突起上の Spine 密度および成熟度の結果を図に示す。先端樹状突起とは対照的に、基底樹状突起においてはいずれも 3wFS およびケタミンによる有意差は認めなかった。

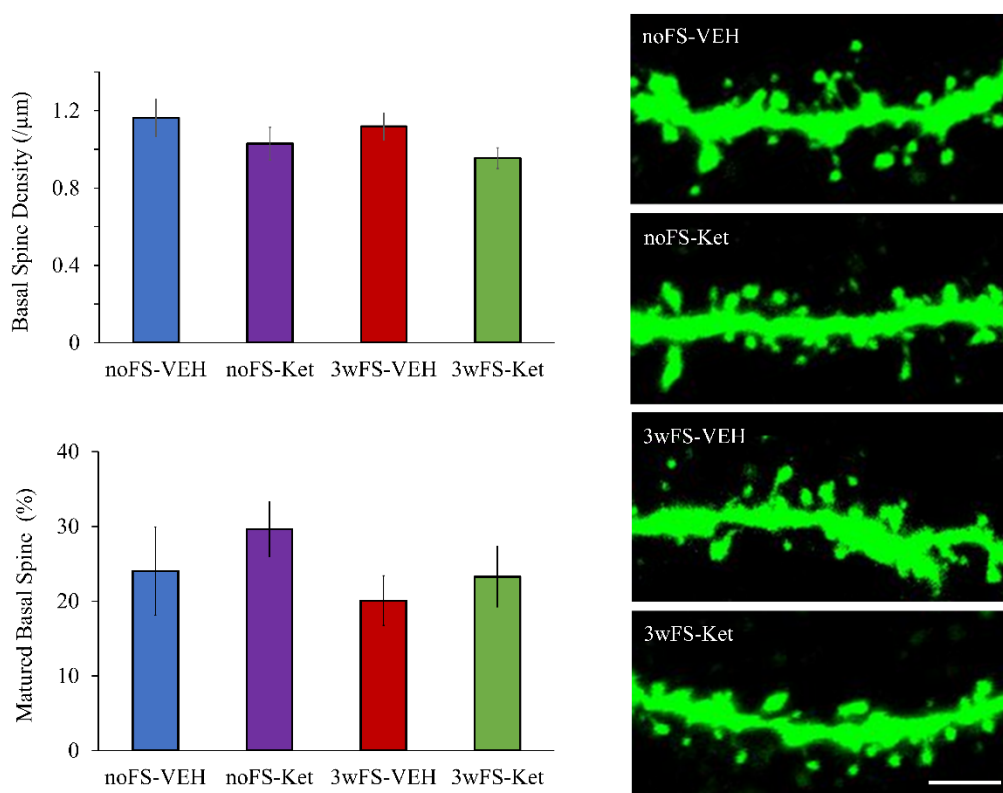


図 3-3 基底樹状突起の spine 密度と、成熟 spine の割合および各群の典型的画像
データは平均値 $\pm$ SEM で表示。N : noFS-VEH (11), noFS-Ket (10), 3wFS-VEH (11), 3wFS-Ket (13)。Scale bar 5 μm 。

[3-3] 考察

第3章では、幼若期ストレスにより PL 第 V 層錐体細胞先端樹状突起上の spine 密度が減少すること、およびケタミンが成熟 spine の比率を増加させることが示された。この結果は、Li ら(Li et al., 2011)の報告と類似しているが、本研究は spine 密度が有意に回復しなかった点で異なる結果となった。この点に関しては、ケタミン投与から脳スライス作成までの時間が影響している可能性がある。Li らがケタミン投与から 24 時間後に実験を行ったのに対し、本研究では 16 時間後に行っている。動物実験では、ケタミン投与後、AMPA 型受容体の発現を促進するタンパクが 72 時間後まで増加すること(Li et al., 2010)や、ヒトでは 24 時間後に抗うつ効果が最大になる(Pešić et al., 2016)ことが報告されているため、16 時間後ではシナプスの密度が回復途中であった可能性がある。密度に関して、3wFS 群における単純主効果の解析の結果が $p = 0.097$ と有意傾向であったことから、spine が回復途中にあったことが示唆される。本研究では密度に有意差は無かったものの、シナプス後部の AMPA 型受容体が増加していることは成熟 spine の密度が増加していたことより明らかであり、第2章での mEPSC 振幅の増大の結果を形態学的に裏付けている。

noFS-Ket 群において、ケタミンにより先端樹状突起上の成熟 spine 比率が増加した。これは、ケタミンによる spine 新生が、3wFS の有無に関わらず生じることを示している。内側前頭前野におけるグルタミン酸系興奮伝達の回復は抗うつ効果の重要なメカニズムである一方、過剰な興奮性入力によりうつ様行動が増加することが先行研究により報告されている(Moghaddam and Javitt, 2012 ; Schobel et al., 2013)。本研究で noFS-Ket 群でうつ様行動が増加した機序として、成熟 spine 比率が増加し、増加した AMPA 型受容体に対するグルタミン酸の過剰入力に関与していた可能性が考えられる。

本研究では、PL 錐体細胞先端樹状突起の spine に変化を認めた。慢性ストレスを負荷されたラットでは、内側前頭前野の錐体細胞の先端樹状突起の萎縮性変化が生じることが報告されている(Li et al., 2010 ; Li et al., 2011 ; Liu and Aghajanian, 2008 ; Radley et al., 2005)。また、うつ病、あるいはストレスを負荷されたヒトおよび動物では、内側前頭前野の体積および錐体細胞の spine の萎縮が生じていることが数多く報告されている(Kang et al., 2012 ; Li et al., 2011 ; Lyttle et al., 2015 ; Tripathi et al., 2019)。内側前頭前野の体積の減少は、錐体細胞の先端樹状突起の萎縮、つまり興奮性入力の減少を反映していると考えられ、この結果は第2章で mEPSC の振幅が 3wFS により減少し、ケタミンにより回復したこととも一致する。幼若期ストレスにより、内側前頭前野第 V 層錐体細胞の先端樹状突起への興奮性入力が増加し、ケタミンにより回復したことが、うつ様行動の背景にあることが示唆される結果となった。

一方、基底樹状突起の spine には変化を認めなかった。PL の基底細胞は扁桃体基底

外側複合体 (basolateral amygdala: BLA) から入力を受けており(Liu et al., 2015)、ストレスによってこの伝達は増強する事が知られている。逆に BLA を不活性化することで、この変化が防げることも報告されている(Tripathi et al., 2019)。3wFS により BLA から錐体細胞の基底樹状突起へ過剰な入力が生じ、先端樹状突起の短縮を生じた可能性がある。逆に、入力が低下しない基底樹状突起の spine には、変化が生じなかったと考えられる。この点に関しては、BLA を含めた更なる検討が必要である。

[3-4] 小括

- ・内側前頭前野第 V 層錐体細胞の先端樹状突起において、3wFS による spine 密度の低下を認めた。
- ・ケタミンにより、先端樹状突起の spine 成熟度が増加したが、基底樹状突起では、この変化は認めなかった。
- ・noFS ラットにおいてうつ様行動が増加した背景には、増加したシナプス間隙のグルタミン酸による興奮毒性による、受容体の機能低下が関与している可能性がある。

総括および結論

本研究では、「幼若期ストレスに起因する成熟期のうつ様行動および減弱した内側前頭前野の興奮性伝達をケタミンが回復させる」という仮説に基づき、行動学的、電気生理学的、および形態学的検討を行い、以下の知見を得た。

1) 幼若期ストレス負荷により内側前頭前野第 V 層錐体細胞の EPSC が減弱し、ケタミンにより回復した。この変化は、本研究、および先行研究で示された強制水泳試験におけるうつ様行動の増減と一致していた。

2) mEPSC の検討をした結果、ケタミンは、シナプス前部からのグルタミン酸の放出と、シナプス後部の AMPA 型受容体の数または機能を変化させる可能性が示された。また spine の形態学的検討の結果と合わせ、EPSC の振幅の増減は、先端樹状突起の AMPA 型受容体の数が変化していることに起因していることが示唆された。

これらの結果は、慢性ストレスによりうつ様行動が増加したラットを用いて、ケタミンによりうつ様変化が回復することを示した先行研究の結果と一致しており、幼若期ストレスにより惹起されたうつ様変化が、ケタミンにより回復するという仮説を支持する結果であった。

一方で、PL 第 V 層錐体細胞の発火頻度と膜抵抗がケタミンにより選択的に増加し、IPSC も 3wFS やケタミンにより影響されることも示されたが、この点に関してはうつ様行動との明らかな相関は得られなかった。

結論として、本研究の結果は、3wFS を負荷したラットにおいて成熟期の行動学的、電気生理学的、ならびに形態学的変化をケタミンが回復させたことを示しており、ケタミンが虐待などの既往を持ち、難治性うつに苦しむ患者に対する有効性を示唆している。虐待を受けてから時間が経過した後に投与しても有効性を示した点に関しては、より現実的な治療薬としての条件を備えていると言える。

本研究は相関研究であるため、上記を証明するためには、ラパマイシンなどのケタミンの効果を打ち消す薬物を使用し、因果関係を解明する必要がある(Li et al., 2010)。さらに本研究ではケタミンの効果がどの程度継続するのかに関しては検討していない。慢性ストレスを負荷されたラットを用いた先行研究では抗うつ効果は約 1 週間継続するとされているが、幼若期ストレスに関しては先行研究がなく不明である。幼若期のストレス曝露によってエピジェネティックな変化による持続的な変化が生じる点や、これらの既往を持つうつ病患者が治療抵抗性を示す傾向があることを考

えると、成熟期慢性ストレスを負荷した既存の研究とは結果が異なる可能性も否定できない。この点に関して、幼若期ストレスを負荷した動物を用いて、今後解明していく必要があると考える。

謝辞

本研究の機会を与えて頂き、懇切丁寧なご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院神経薬理学教室 吉岡充弘教授ならびに麻酔・周術期医学分野森本裕二教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験計画立案ならびに電気生理学的実験、形態学的実験において多大なるご助言・ご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院神経薬理学教室 吉田隆行助教に深謝いたします。また、行動学的実験、統計解析において大変有益なご助言を頂きました北海道大学大学院医学研究院神経薬理学教室 大村優講師に深謝致します。実験手技に関して多大なるご助言を賜りました北海道医療大学臨床薬理毒理学講座 泉剛教授に感謝申し上げます。また論文校正において多大なる協力を賜りました北海道大学大学院医学研究院神経薬理学教室 西谷直也助教に御礼申し上げます。

学生生活を共に過ごし、多大なご支援を頂きました隈元晴子さん、小冷碧さん、王冊さん、熊倉侑紀さん、根深真央さん、笹森瞳さん、工藤愛さんに深く感謝いたします。また、学生生活・実験を支えて頂いた秘書の武山美香さん、菊池康子さん、助手の松原博美さん、谷守重紀さんに御礼申し上げます。

また、4年間多大なるご協力を頂きました北海道大学大学院医学研究院神経薬理学教室ならびに北海道大学大学院医学研究院麻酔・周術期医学教室の皆様へ深謝いたします。

最後に、学生生活を通じて励まし続けてくれた家族・友人に心から感謝いたします。

平成31年3月25日
北海道大学大学院医学院
麻酔・周術期医学教室

相川 勝洋

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Amatrudo, J.M., Weaver, C.M., Crimins, J.L., Hof, P.R., Rosene, D.L., and Luebke, J.I. (2012). Influence of highly distinctive structural properties on the excitability of pyramidal neurons in monkey visual and prefrontal cortices. *J. Neurosci.* 32, 13644-13660.
- Anda, R.F., Butchart, A., Felitti, V.J., and Brown, D.W. (2010). Building a framework for global surveillance of the public health implications of adverse childhood experiences. *Am. J. Prev. Med.* 39, 93-98.
- Andersen, S.L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 3-18.
- Andersen, S.L., Tomada, A., Vincow, E.S., Valente, E., Polcari, A., and Teicher, M.H. (2008). Preliminary evidence for sensitive periods in the effect of childhood sexual abuse on regional brain development. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 20, 292-301.
- Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J., and Merali, Z. (1998). Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 149-164.
- Autry, A.E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E.S., Los, M.F., Cheng, P.F., Kavalali, E.T., and Monteggia, L.M. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475, 91-95.
- Ballard, E.D., Ionescu, D.F., Vande Voort, J.L., Niciu, M.J., Richards, E.M., Luckenbaugh, D.A., Brutsché, N.E., Ameli, R., Furey, M.L., and Zarate, C.A. (2014). Improvement in suicidal ideation after ketamine infusion: relationship to reductions in depression and anxiety. *J. Psychiatr. Res.* 58, 161-166.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., and Krystal, J.H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry* 47, 351-354.
- Bremner, J.D., Randall, P., Vermetten, E., Staib, L., Bronen, R.A., Mazure, C., Capelli, S., McCarthy, G., Innis, R.B., and Charney, D.S. (1997). Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse--a preliminary report. *Biol. Psychiatry* 41, 23-32.
- Cryan, J.F., Valentino, R.J., and Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 547-569.
- Drevets, W.C., Price, J.L., Simpson, J.R., Todd, R.D., Reich, T., Vannier, M., and Raichle, M.E. (1997). Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 386, 824-827.

Duman, R.S. (2014). Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. *Depress. Anxiety* 31, 291-296.

Duman, R.S. (2018). Ketamine and rapid-acting antidepressants: a new era in the battle against depression and suicide. *F1000Res* 7.

Duman, R.S., and Aghajanian, G.K. (2012). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 338, 68-72.

Duman, R.S., Aghajanian, G.K., Sanacora, G., and Krystal, J.H. (2016). Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat. Med.* 22, 238-249.

Duman, R.S., Li, N., Liu, R.J., Duric, V., and Aghajanian, G. (2012). Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 62, 35-41.

Fukumoto, K., Toki, H., Iijima, M., Hashihayata, T., Yamaguchi, J.I., Hashimoto, K., and Chaki, S. (2017). Antidepressant Potential of (J. *Pharmacol. Exp. Ther.* 361, 9-16.

Grunebaum, M.F., Galfalvy, H.C., Choo, T.H., Keilp, J.G., Moitra, V.K., Parris, M.S., Marver, J.E., Burke, A.K., Milak, M.S., Sublette, M.E., et al. (2018). Ketamine for Rapid Reduction of Suicidal Thoughts in Major Depression: A Midazolam-Controlled Randomized Clinical Trial. *Am. J. Psychiatry* 175, 327-335.

Hamani, C., Diwan, M., Isabella, S., Lozano, A.M., and Nobrega, J.N. (2010a). Effects of different stimulation parameters on the antidepressant-like response of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *J. Psychiatr. Res.* 44, 683-687.

Hamani, C., Diwan, M., Macedo, C.E., Brandão, M.L., Shumake, J., Gonzalez-Lima, F., Raymond, R., Lozano, A.M., Fletcher, P.J., and Nobrega, J.N. (2010b). Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *Biol. Psychiatry* 67, 117-124.

Hamani, C., and Temel, Y. (2012). Deep brain stimulation for psychiatric disease: contributions and validity of animal models. *Sci. Transl. Med.* 4, 142rv148.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100.

Hawton, K., Casañas I Comabella, C., Haw, C., and Saunders, K. (2013). Risk factors for suicide in individuals with depression: a systematic review. *J. Affect. Disord.* 147, 17-28.

Heim, C., and Nemeroff, C.B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol. Psychiatry* 49, 1023-1039.

Hetzler, B.E., and Wautlet, B.S. (1985). Ketamine-induced locomotion in rats in an open-field. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22, 653-655.

Hiraide, S., Saito, Y., Matsumoto, M., Yanagawa, Y., Ishikawa, S., Kubo, Y., Inoue, S., Yoshioka, M., and Togashi, H. (2012). Possible modulation of the amygdala on metaplasticity deficits in the

hippocampal CA1 field in early postnatally stressed rats. *J. Pharmacol. Sci.* 119, 64-72.

Holtmaat, A., and Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 647-658.

Ishikawa, J., Nishimura, R., and Ishikawa, A. (2015). Early-life stress induces anxiety-like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 41, 442-453.

Ishikawa, T., Sahara, Y., and Takahashi, T. (2002). A single packet of transmitter does not saturate postsynaptic glutamate receptors. *Neuron* 34, 613-621.

Jett, J.D., Boley, A.M., Girotti, M., Shah, A., Lodge, D.J., and Morilak, D.A. (2015). Antidepressant-like cognitive and behavioral effects of acute ketamine administration associated with plasticity in the ventral hippocampus to medial prefrontal cortex pathway. *Psychopharmacology (Berl.)* 232, 3123-3133.

Jutkiewicz, E.M., Torregrossa, M.M., Sobczyk-Kojiro, K., Mosberg, H.I., Folk, J.E., Rice, K.C., Watson, S.J., and Woods, J.H. (2006). Behavioral and neurobiological effects of the enkephalinase inhibitor RB101 relative to its antidepressant effects. *Eur. J. Pharmacol.* 531, 151-159.

Kang, H.J., Voleti, B., Hajsan, T., Rajkowska, G., Stockmeier, C.A., Licznarski, P., Lepack, A., Majik, M.S., Jeong, L.S., Banasr, M., et al. (2012). Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat. Med.* 18, 1413-1417.

Kessels, H.W., and Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61, 340-350.

Kimura, S., Togashi, H., Matsumoto, M., Shiozawa, T., Ishida, J., Kano, S., Ohashi, A., Ishikawa, S., Yamaguchi, T., Yoshioka, M., et al. (2011). Serotonin(1A) receptor-mediated synaptic response in the rat medial prefrontal cortex is altered by early life stress: in vivo and in vitro electrophysiological studies. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 31, 9-15.

Klein, J., Winter, C., Coquery, N., Heinz, A., Morgenstern, R., Kupsch, A., and Juckel, G. (2010). Lesion of the medial prefrontal cortex and the subthalamic nucleus selectively affect depression-like behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 213, 73-81.

Klengel, T., Pape, J., Binder, E.B., and Mehta, D. (2014). The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders. *Neuropharmacology* 80, 115-132.

Koe, A.S., Jones, N.C., and Salzberg, M.R. (2009). Early life stress as an influence on limbic epilepsy: an hypothesis whose time has come? *Front. Behav. Neurosci.* 3, 24.

Konno, K., Matsumoto, M., Togashi, H., Yamaguchi, T., Izumi, T., Watanabe, M., Iwanaga, T., and Yoshioka, M. (2007). Early postnatal stress affects the serotonergic function in the median raphe nuclei of adult rats. *Brain Res.* 1172, 60-66.

- Koseki, H., Matsumoto, M., Togashi, H., Miura, Y., Fukushima, K., and Yoshioka, M. (2009). Alteration of synaptic transmission in the hippocampal-mPFC pathway during extinction trials of context-dependent fear memory in juvenile rat stress models. *Synapse* 63, 805-813.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G., and Duman, R.S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959-964.
- Li, N., Liu, R.J., Dwyer, J.M., Banasr, M., Lee, B., Son, H., Li, X.Y., Aghajanian, G., and Duman, R.S. (2011). Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol. Psychiatry* 69, 754-761.
- Liu, G., Choi, S., and Tsien, R.W. (1999). Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron* 22, 395-409.
- Liu, R.J., and Aghajanian, G.K. (2008). Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 359-364.
- Liu, R.J., Ota, K.T., Dutheil, S., Duman, R.S., and Aghajanian, G.K. (2015). Ketamine Strengthens CRF-Activated Amygdala Inputs to Basal Dendrites in mPFC Layer V Pyramidal Cells in the Prelimbic but not Infralimbic Subregion, A Key Suppressor of Stress Responses. *Neuropsychopharmacology* 40, 2066-2075.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., and Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 434-445.
- Luscher, B., Shen, Q., and Sahir, N. (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 16, 383-406.
- Lyttle, K., Ohmura, Y., Konno, K., Yoshida, T., Izumi, T., Watanabe, M., and Yoshioka, M. (2015). Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. *Brain Res.* 1616, 88-100.
- MacQueen, G., and Frodl, T. (2011). The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Mol. Psychiatry* 16, 252-264.
- Maher, D.P., Chen, L., and Mao, J. (2017). Intravenous Ketamine Infusions for Neuropathic Pain Management: A Promising Therapy in Need of Optimization. *Anesth. Analg.* 124, 661-674.
- Matsumoto, M., Togashi, H., Konno, K., Koseki, H., Hirata, R., Izumi, T., Yamaguchi, T., and Yoshioka, M. (2008). Early postnatal stress alters the extinction of context-dependent conditioned fear in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89, 247-252.
- Matsuzaki, H., Izumi, T., Horinouchi, T., Boku, S., Inoue, T., Yamaguchi, T., Yoshida, T., Matsumoto, M., Togashi, H., Miwa, S., et al. (2011). Juvenile stress attenuates the dorsal

hippocampal postsynaptic 5-HT_{1A} receptor function in adult rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 214, 329-337.

Matsuzaki, H., Izumi, T., Matsumoto, M., Togashi, H., Yamaguchi, T., Yoshida, T., Watanabe, M., and Yoshioka, M. (2009). Early postnatal stress affects 5-HT_{1A} receptor function in the medial prefrontal cortex in adult rats. *Eur. J. Pharmacol.* 615, 76-82.

McEwen, B.S., Eiland, L., Hunter, R.G., and Miller, M.M. (2012). Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62, 3-12.

McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., Turecki, G., and Meaney, M.J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat. Neurosci.* 12, 342-348.

McKlveen, J.M., Morano, R.L., Fitzgerald, M., Zoubovsky, S., Cassella, S.N., Scheimann, J.R., Ghosal, S., Mahbod, P., Packard, B.A., Myers, B., et al. (2016). Chronic Stress Increases Prefrontal Inhibition: A Mechanism for Stress-Induced Prefrontal Dysfunction. *Biol. Psychiatry* 80, 754-764.

Menke, A., and Binder, E.B. (2014). Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. *Dialogues Clin. Neurosci.* 16, 395-404.

Moench, K.M., and Wellman, C.L. (2015). Stress-induced alterations in prefrontal dendritic spines: Implications for post-traumatic stress disorder. *Neurosci. Lett.* 601, 41-45.

Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A., and Daly, D. (1997). Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 17, 2921-2927.

Moghaddam, B., and Javitt, D. (2012). From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology* 37, 4-15.

Moshe, H., Gal, R., Barnea-Ygael, N., Gulevsky, T., Alyagon, U., and Zangen, A. (2016). Prelimbic Stimulation Ameliorates Depressive-Like Behaviors and Increases Regional BDNF Expression in a Novel Drug-Resistant Animal Model of Depression. *Brain Stimul.* 9, 243-250.

Mukai, H., Hatanaka, Y., Mitsuhashi, K., Hojo, Y., Komatsuzaki, Y., Sato, R., Murakami, G., Kimoto, T., and Kawato, S. (2011). Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis. *Cereb. Cortex* 21, 2704-2711.

Neher, R., Riniker, B., Maier, R., Byfield, P.G., Gudmundsson, T.V., and MacIntyre, I. (1968). Human calcitonin. *Nature* 220, 984-986.

Newport, D.J., Carpenter, L.L., McDonald, W.M., Potash, J.B., Tohen, M., Nemeroff, C.B., and Treatments, A.C.o.R.T.F.o.N.B.a. (2015). Ketamine and Other NMDA Antagonists: Early

Clinical Trials and Possible Mechanisms in Depression. *Am. J. Psychiatry* 172, 950-966.

Oertner, T.G., Sabatini, B.L., Nimchinsky, E.A., and Svoboda, K. (2002). Facilitation at single synapses probed with optical quantal analysis. *Nat. Neurosci.* 5, 657-664.

Ohmura, Y., Jutkiewicz, E.M., and Domino, E.F. (2011). L-DOPA attenuates nicotine withdrawal-induced behaviors in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 98, 552-558.

Pešić, V., Petrović, J., and M Jukić, M. (2016). Molecular Mechanism and Clinical Relevance of Ketamine as Rapid-Acting Antidepressant. *Drug Dev Res* 77, 414-422.

Podkowa, K., Pochwat, B., Brański, P., Pilc, A., and Pałucha-Poniewiera, A. (2016). Group II mGlu receptor antagonist LY341495 enhances the antidepressant-like effects of ketamine in the forced swim test in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 233, 2901-2914.

Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., and Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 22-37.

Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., and Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 379-391.

Price, J.L., and Drevets, W.C. (2010). Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 192-216.

Radley, J.J., Rocher, A.B., Janssen, W.G., Hof, P.R., McEwen, B.S., and Morrison, J.H. (2005). Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp. Neurol.* 196, 199-203.

Radley, J.J., Rocher, A.B., Miller, M., Janssen, W.G., Liston, C., Hof, P.R., McEwen, B.S., and Morrison, J.H. (2006). Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* 16, 313-320.

Rocheftort, N.L., and Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep* 13, 699-708.

Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J., and Sweatt, J.D. (2009). Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol. Psychiatry* 65, 760-769.

Sanacora, G., Frye, M.A., McDonald, W., Mathew, S.J., Turner, M.S., Schatzberg, A.F., Summergrad, P., Nemeroff, C.B., and Treatments, A.P.A.A.C.o.R.T.F.o.N.B.a. (2017). A Consensus Statement on the Use of Ketamine in the Treatment of Mood Disorders. *JAMA Psychiatry* 74, 399-405.

Sanacora, G., Treccani, G., and Popoli, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62, 63-77.

Sarkar, A., and Kabbaj, M. (2016). Sex Differences in Effects of Ketamine on Behavior, Spine Density, and Synaptic Proteins in Socially Isolated Rats. *Biol. Psychiatry* 80, 448-456.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675.

Schobel, S.A., Chaudhury, N.H., Khan, U.A., Paniagua, B., Styner, M.A., Asllani, I., Inbar, B.P., Corcoran, C.M., Lieberman, J.A., Moore, H., et al. (2013). Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spreading pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate as a driver. *Neuron* 78, 81-93.

Shikanai, H., Yoshida, T., Konno, K., Yamasaki, M., Izumi, T., Ohmura, Y., Watanabe, M., and Yoshioka, M. (2012). Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* 32, 14415-14426.

Skilbeck, K.J., Johnston, G.A.R., and Hinton, T. (2018). Long-lasting effects of early-life intervention in mice on adulthood behaviour, GABA. *Pharmacol. Res.* 128, 179-189.

Spear, L.P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417-463.

Sullivan, R.M., and Gratton, A. (2002). Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology* 27, 99-114.

Tripathi, S.J., Chakraborty, S., Srikumar, B.N., Raju, T.R., and Shankaranarayana Rao, B.S. (2019). Basolateral amygdalar inactivation blocks chronic stress-induced lamina-specific reduction in prefrontal cortex volume and associated anxiety-like behavior. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 88, 194-207.

Trivedi, M.H., Rush, A.J., Wisniewski, S.R., Nierenberg, A.A., Warden, D., Ritz, L., Norquist, G., Howland, R.H., Lebowitz, B., McGrath, P.J., et al. (2006). Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am. J. Psychiatry* 163, 28-40.

Tunnard, C., Rane, L.J., Wooderson, S.C., Markopoulou, K., Poon, L., Fekadu, A., Juruena, M., and Cleare, A.J. (2014). The impact of childhood adversity on suicidality and clinical course in treatment-resistant depression. *J. Affect. Disord.* 152-154, 122-130.

Vermetten, E., Vythilingam, M., Southwick, S.M., Charney, D.S., and Bremner, J.D. (2003). Long-term treatment with paroxetine increases verbal declarative memory and hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 54, 693-702.

Vertes, R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51, 32-58.

Vythilingam, M., Heim, C., Newport, J., Miller, A.H., Anderson, E., Bronen, R., Brummer, M., Staib, L., Vermetten, E., Charney, D.S., et al. (2002). Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. *Am. J. Psychiatry* 159, 2072-2080.

- WHO (2018a). Child maltreatment [<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/child-maltreatment>] (2018.10.28)].
- WHO (2018b). Depression [<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>] (2018.10.28)].
- WHO (2018c). Mental health [http://www.who.int/mental_health/suicide-prevention/en/] (2018.10.28)].
- Yamaguchi, J.I., Toki, H., Qu, Y., Yang, C., Koike, H., Hashimoto, K., Mizuno-Yasuhira, A., and Chaki, S. (2018). (2R,6R)-Hydroxynorketamine is not essential for the antidepressant actions of (R)-ketamine in mice. *Neuropsychopharmacology*.
- Yamamuro, K., Yoshino, H., Ogawa, Y., Makinodan, M., Toritsuka, M., Yamashita, M., Corfas, G., and Kishimoto, T. (2018). Social Isolation During the Critical Period Reduces Synaptic and Intrinsic Excitability of a Subtype of Pyramidal Cell in Mouse Prefrontal Cortex. *Cereb. Cortex* 28, 998-1010.
- Yang, C., Qu, Y., Abe, M., Nozawa, D., Chaki, S., and Hashimoto, K. (2017). (R)-Ketamine Shows Greater Potency and Longer Lasting Antidepressant Effects Than Its Metabolite (2R,6R)-Hydroxynorketamine. *Biol. Psychiatry* 82, e43-e44.
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P.J., Georgiou, P., Fischell, J., Elmer, G.I., Alkondon, M., Yuan, P., Pribut, H.J., Singh, N.S., et al. (2016). NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature* 533, 481-486.
- Zarate, C.A., Singh, J.B., Carlson, P.J., Brutsche, N.E., Ameli, R., Luckenbaugh, D.A., Charney, D.S., and Manji, H.K. (2006). A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 856-864.
- Zhang, J., Yang, Y., Li, H., Cao, J., and Xu, L. (2005). Amplitude/frequency of spontaneous mEPSC correlates to the degree of long-term depression in the CA1 region of the hippocampal slice. *Brain Res.* 1050, 110-117.