

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18899

研究課題名(和文) 妊娠期のストレス曝露が誘発する子の情動障害に対する抑肝散の応用

研究課題名(英文) Effects of yokukansan to stress vulnerability in offspring induced by prenatal stress exposure

研究代表者

宮川 和也 (Miyagawa, Kazuya)

国際医療福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：10453408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中の母親へのストレスが、生まれた子の精神発達に影響を及ぼすことが臨床研究により報告されている。本研究では、胎生期ストレス曝露モデルマウスを作成し、その病態生理学的特徴の解明を試みた。その結果、脳内のヒストン修飾を基盤としたエピジェネティクス制御機構の異常が、胎生期ストレスによる子の精神発達障害に一部関与している可能性を見出した。さらに、胎生期ストレス刺激により惹起される情動障害に対する抑肝散の幼少期投与の効果について検討した結果、胎生期ストレス刺激により誘発される不安感受性の亢進は、抑肝散を離乳後4週間処置することにより改善し、その治療メカニズムにヒストン修飾が関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見は、妊娠期における強度なストレス曝露の危険性について警鐘を鳴らすものであり、妊婦のメンタルヘルスに対する意識向上につながると思う。また、その分子基盤にエピジェネティクス制御機構が関与することを見出したことから、新規治療戦略構築の一翼を担う。さらに、小児に対して使用実績のある抑肝散の幼少期投与の治療効果を実証したことから、小児に対する安全性の高い薬物治療の提案につながり、極めて意義深い研究成果であると思う。

研究成果の概要(英文)：that excessive prenatal stress induced long-term emotional abnormalities associated with disruption of epigenetic regulation.

In addition, chronic treatment with Yokukansan (YKS), the traditional Japanese medicine, at early life could partially recover the emotional disruption by exposure to excessive prenatal stress. Interestingly, we found that at least in part of the mechanism could be histone modification.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：胎生期ストレス 抑肝散 エピジェネティクス 不安 ヒストン脱アセチル化酵素 漢方薬

## 1. 研究開始当初の背景

脳機能の発達過程において、最も外界から影響を受けやすい時期は胎生期であり、この時期に過剰なストレスに曝露されることにより、中枢神経の発達や成長後の情動性の異常が惹起される可能性が考えられる。実際、妊娠期における母体への過度のストレス曝露が、子の成長後のストレス反応に影響を及ぼし得るという臨床報告がある。したがって、胎生期ストレスにより惹起される子のストレス反応性や精神症状の病態生理を明らかにするとともに、それらに対する適切な治療法を確立することが望まれる。我々は、以前の研究において、胎生期ストレス刺激を負荷した親マウスから生まれた仔マウスを用いて、行動学的・生化学的検討を行った。その結果、成長後、セロトニン (5-HT) 神経の発現異常を伴う、ストレス適応障害が惹起されることを明らかにし、胎生期ストレスが子の精神機能発達に影響を及ぼすという臨床的知見を裏付けた。

また、近年の分子生物学的な研究成果の累積により、多様な遺伝子情報の出納において、DNA あるいはヒストンなどのクロマチン修飾を中心とした、エピジェネティクス遺伝子発現調節機構が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。神経精神科領域においても、多くの分子生物学的研究が、各種精神疾患の病態生理におけるエピジェネティクスの関与を強く示唆している。我々も以前の研究において、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬をマウスの脳室内に投与することで化学的に脳内のヒストンアセチル化を誘導したところ、急性ストレス刺激による情動性の低下が回復すること、また、これは海馬ヒストン H3 アセチル化と経時的に相関することを見出している。

一方、漢方処方である抑肝散 (柴胡、蒼朮 (原典は白朮)、茯苓各、川芎、当帰、釣藤鈎、甘草) は、明代の小児医学書「保嬰撮要」の急驚風門の処方である。当初は小児の夜泣きや離乳に伴う精神不安などに対して、母児同服処方として造られたが、その後の応用範囲の拡大に伴い、現在では小児に限らず様々なストレス性精神疾患に適用されている。我々も以前の研究において、抑肝散がストレス適応促進効果を有していることを報告しており、抑肝散が胎生期ストレス負荷による情動障害に対して治療効果を示すことが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、胎生期ストレス刺激による仔のストレス脆弱性の病態生理学的特徴について、特にエピジェネティクス制御機構の関与について明らかにすること、さらに、抑肝散の治療効果の検証とそのメカニズムの解明を目的に、以下の検討を行った。

- (1) HDAC 阻害薬のストレス適応促進効果に関する行動薬理的・生化学的検討
- (2) 胎生期ストレス負荷モデルマウスの脳内エピジェネティクス機能分子の解析
- (3) 胎生期ストレス負荷モデルマウスに対する抑肝散の幼少期慢性投与の治療効果に関する行動学的・生化学的検討

## 3. 研究の方法

全ての実験には ICR 系マウスを用いた。なお、本研究は実験動物に対する動物愛護上の問題に配慮し、「国際医療福祉大学実験動物規定」を遵守した上で適切な実験動物の飼育および動物実験を実施した。

### (1) HDAC 阻害薬のストレス適応促進効果に関する行動薬理的・生化学的検討

マウスに 1 日 1 回 4 時間の拘束ストレスを 14 日間負荷するストレス非適応モデルマウス作成時において、1~13 日目の拘束ストレス負荷 2 時間前に HDAC 阻害薬である trichostatin A (TSA: 1650 $\mu$ M, 4 $\mu$ L) を脳室内投与し、14 日目の最終ストレス負荷直後にホールボード試験に従い情動性を確認し、脳サンプルを採取した。得られたサンプルを用いて、Western blot 法に従い種々のタンパク発現量を定量解析した。

### (2) 胎生期ストレス負荷モデルマウスの脳内エピジェネティクス機能分子の解析

交配翌日を胎生 0.5 日として、胎生 5.5 日目から 17.5 日目まで、1 日 1 回 6 時間 (10:00-16:00) の拘束ストレスを妊娠マウスに負荷した。分娩後は通常飼育を行い 21 日齢において離乳した。離乳後は通常飼育を行った。その後、行動試験に従い情動性の変化に関する再現性を確認した直後に脳サンプルを採取した。得られた脳サンプルを用いて、RT-PCR 法および Western blot 法に従い、エピジェネティクス制御機構関連分子の mRNA およびタンパク質発現量の変化を検討した。

### (3) 胎生期ストレス負荷モデルマウスに対する抑肝散の幼少期慢性投与の治療効果に関する行動学的・生化学的検討

(2) と同様に胎生期ストレス負荷モデルマウスを作成し、3 週齢において離乳した後、抑肝散 (1g/kg) を 1 日 1 回 29~31 日間経口投与した。抑肝散投与終了翌日に、高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験に従い不安様行動の確認を行い、その直後に脳サンプルを採取した。得られた脳サンプルから中脳領域を分画し、Histone Extraction Kit を用いて、ヒス

トン抽出した。その後、Histone H3 Modification Assay Kit を用いて、ヒストン H3 の修飾について網羅的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) HDAC 阻害薬のストレス適応促進効果に関する行動薬理的・生化学的検討

我々は、以前の研究において、ストレス強度を変えてマウスに慢性負荷することで、ストレス適応モデルとストレス非適応モデルを確立している。すなわち、ホールボード試験により新奇環境における情動行動をストレス反応の指標として評価したところ、1 時間の拘束ストレス刺激の単回負荷により誘発される穴のぞき行動の減少が、1 日 1 回 14 日間の繰り返し負荷により消失し、ストレスへの適応形成が認められる一方、4 時間の拘束ストレス刺激の繰り返し負荷では穴のぞき行動の減少は消失せず、ストレス適応形成は認められない。本研究では、ストレス非適応モデルマウスを作成する際に化学的に脳内でヒストンアセチル化を誘導することで、ストレス適応が形成されるかを検証した。その結果、各日 4 時間の拘束ストレス刺激を負荷する 2 時間前に TSA を脳室内投与したところ、ストレス負荷により惹起されるホールボード試験での穴のぞき行動の減少が非ストレス群と同程度まで回復し、ストレス適応が形成された

(図 1A)。さらに、脳内 5-HT 神経系の活性化がストレス適応形成に重要であるとのこれまでの我々の知見を踏まえ、TSA の脳室内投与により誘導されるストレス適応形成と脳内 5-HT 神経活性との関連についても検討した。その結果、TSA のストレス負荷前投与によりストレス適応が形成されたマウスの中脳において、5-HT 合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (TPH) のタンパク質量が増加していることを見出した (図 1B)。以上の結果より、脳内におけるヒストンアセチル化は、ストレスに対する認知・処理機構に影響を及ぼし、ストレス適応形成を促進する可能性が示唆された。また、TSA は、TPH 発現に関与する DNA 領域が存在するヒストンのアセチル化を亢進させることによりユークロマチンを誘導し、TPH 遺伝子の転写を活性化することで TPH タンパク質の発現を増加させたと考えられる。

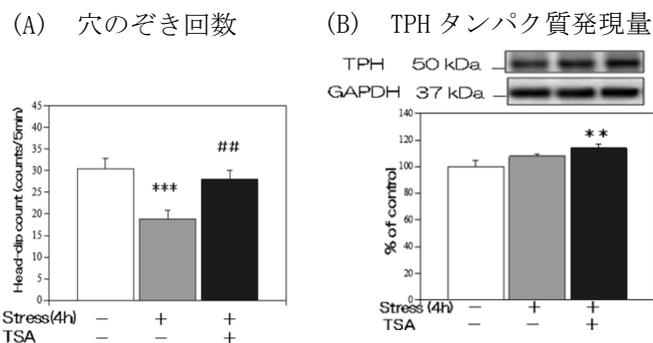


図 1 TSA のストレス適応促進効果と中脳 TPH タンパク質発現量の変化

##### (2) 胎生期ストレス負荷モデルマウスの脳内エピジェネティクス機能分子の解析

我々は、以前の研究において、胎生期ストレス負荷モデルマウスが成長後にストレス適応障害を惹起することを報告している。上述したように、ストレス適応形成に脳内ヒストン修飾を基盤としてエピジェネティクス制御機構の関与が示されたことから、本研究では、胎生期ストレスモデルマウスの脳内エピジェネティクス制御機構の変化を検証した。まず、胎生期ストレス負荷モデルマウスが脳内 5-HT 神経系の機能変化を伴うストレス適応障害を惹起する背景から、中脳領域におけるヒストン修飾を検証した。アセチル化ヒストン H3、リジン 4 アセチル化ヒストン H3、リジン 9 アセチル化ヒストン H3、リジン 27 アセチル化ヒストン H3、リジン 9 ジメチル化ヒストン H3、リジン 27 ジ/トリメチル化ヒストン H3、パンメチル-リジンの特異的抗体を用いて、それぞれのタンパク質発現量を Western blot 法に従い定量解析したが、いずれも特筆すべき変化は認められなかった。一方、上述したように、海馬ヒストンアセチル化が急性ストレス刺激に対する抵抗性形成に重要な役割を担う背景から、次に、海馬 HDAC mRNA 発現量を RT-PCR 法に従い検討した。その結果、胎生期ストレス負荷により、HDAC2 の mRNA 発現量の有意な増加が認められた。一方、HDAC2 以外の HDAC1~11 の mRNA 発現量に有意な増加は認められなかった (図 2)。

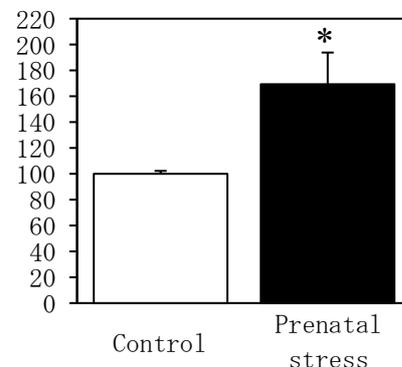


図 2 胎生期ストレス刺激による海馬 HDAC2 mRNA 発現量の変化

##### (3) 胎生期ストレス負荷モデルマウスに対する抑肝散の幼少期慢性投与の治療効果に関する行動学的・生化学的検討

我々は、以前の研究において、胎生期ストレス負荷モデルマウスが成長後に不安感受性が亢進することを報告している。また、抑肝散の幼少期慢性投与の治療効果を高架式十字迷路試験

に従い検証した結果、胎生期ストレス負荷—溶媒投与群においては、有意な open arms 滞在時間割合の減少が認められたが、この不安様行動の亢進は胎生期ストレス負荷—抑肝散投与群においては消失し、改善傾向が認められた (図 3)。本研究では、さらに、高架式十字迷路試験直後の脳サンプルを採取し、ヒストン H3 修飾を網羅的に解析した。なお、より高感度にヒストン修飾を検出するために、Histone Extraction Kit を用いて、ヒストン抽出を行った後に解析した。Histone H3 Modification Assay Kit によるヒストン修飾の解析より、リジン 27 トリメチル化ヒストン H3 およびセリン 28 リン酸化ヒストン H3 タンパク質発現量は、胎生期ストレス負荷により減少したが、抑肝散を幼少期に慢性的に投与することにより改善した (図 4)。

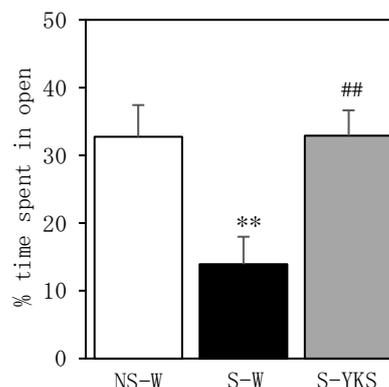


図 3 胎生期ストレス刺激による不安感受性亢進と抑肝散の効果

以上、本研究の結果より、胎生期ストレス負荷による成長後の情動障害に、ヒストン修飾を基盤としたエピジェネティクス制御機構が関与している可能性が考えられる。胎生期ストレスが、成長後の子の脳機能に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。胎生期ストレスによりヒストン修飾の変化が惹起され、子の遺伝子に負の刻印が残る可能性を見出した本知見は、世界に先駆けた研究成果である。また、抑肝散が胎生期ストレスによる情動障害を改善し、そのメカニズムに一部エピジェネティクス制御が関与する知見は、小児に対する安全性の高い薬物治療の提案につながり、かつ、新たな治療戦略の構築の一助となる極めて意義深い研究成果であると考える。

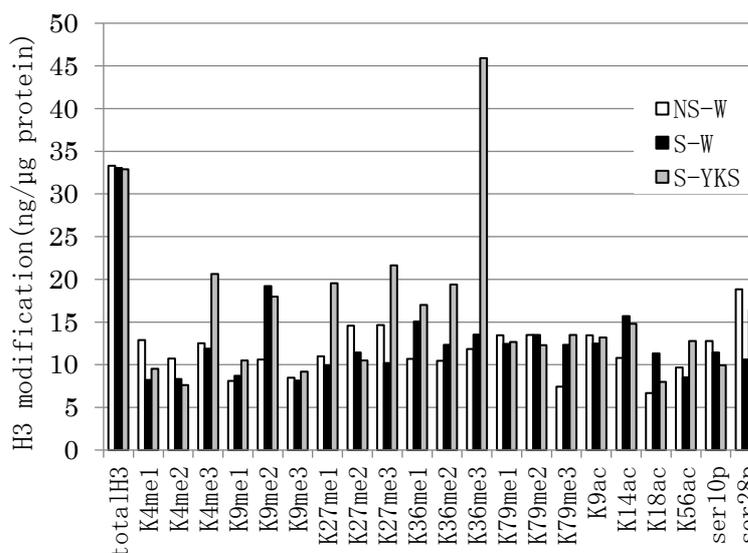


図 4 網羅的ヒストン H3 修飾解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsumi Saito, Kazuya Miyagawa, Hiroko Miyagishi, Kazuhiro Kurokawa, Akira Umeda, Yasumasa Okada, Minoru Tsuji, Hiroshi Takeda	4. 巻 188
2. 論文標題 Possible involvement of monoamine neurons in the emotional abnormality in Kir6.2-deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 251 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2018.02.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、武田弘太郎、辻 稔、武田弘志	4. 巻 147(4)
2. 論文標題 胎生期ストレス刺激が惹起するストレス脆弱性と脳内5-HT神経機能異常	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 212-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1254/fpj.147.212">https://doi.org/10.1254/fpj.147.212</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、黒川和宏、辻 稔、武田弘志	4. 巻 34
2. 論文標題 ヒストンアセチル化によるストレスレジリエンスの獲得	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ストレス科学	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Hiroshi Takeda, Kazuya Miyagawa, Atsumi Saito, Hiroko Miyagishi, Kazuhiro Saito, Kazuhiro Kurokawa, Hideaki Kato, Minoru Tsuji,
2. 発表標題 Possible involvement of histone acetylation in the resistance and adaptation to stress in mice
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuya Miyagawa, Atsumi Saito, Hiroko Miyagishi, Kazuhiro Saito, Kazuhiro Kurokawa, Minoru Tsuji, Hiroshi Takeda
2. 発表標題 Prenatal stress induces vulnerability to stress together with the abnormality of central serotonin neurons in mice - Possibility of treatment by Yokukansan-
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田弘志、宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、黒川和宏、辻 稔
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬のストレス適応形成促進作用における脳内セロトニン神経機能変化
3. 学会等名 国際医療福祉大学学会第8回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川和也、齋藤淳美、黒川和安、宮岸寛子、辻 稔、武田弘志
2. 発表標題 胎生期ストレスが惹起する後天的ストレス脆弱性のエピジェネティクス制御メカニズム
3. 学会等名 国際医療福祉大学学会第8回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、黒川和宏、辻 稔、武田弘志
2. 発表標題 胎生期ストレスが惹起する不安感受性の亢進と抑肝散の治療効果
3. 学会等名 第32回日本ストレス学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、黒川和宏、辻 稔、武田弘志
2. 発表標題 ヒストンアセチル化によるストレスレジリエンスの獲得
3. 学会等名 第32回日本ストレス学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsumi Mochida, Kazuya Miyagawa, Hidenao Kimijima, Hiroko Miyagishi, Kazuhiro Kurokawa, Minoru Tsuji, Akira Umeda, Yasumasa Okada, Hiroshi Takeda
2. 発表標題 Genetical and pharmacological inhibition of ATP-sensitive potassium channels induces anxiety-like behavior in mice
3. 学会等名 第92回日本薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川和也、齋藤淳美、黒川和宏、辻 稔、武田弘志
2. 発表標題 ヒストン修飾を介した縫線核セロトニン合成酵素の発現機構の解明
3. 学会等名 第7回国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田弘志、宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、黒川和宏、辻 稔
2. 発表標題 ストレス適応形成過程における海馬ヒストンアセチル化の意義
3. 学会等名 第7回国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田弘志、宮川和也、辻 稔
2. 発表標題 行動薬理学を基盤としたトランスレーショナルリサーチ～精神疾患治療薬の創薬・育薬を目指して～
3. 学会等名 第9回日本安全性薬理研究会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田弘志、宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、辻 稔
2. 発表標題 ストレス抵抗性形成機構の分子基盤の解明
3. 学会等名 第6回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、辻 稔、武田弘志
2. 発表標題 胎生期ストレス刺激が惹起する不安感受性の亢進に対する抑肝散の効果 5-HT神経機能を基盤とした脳内メカニズムの解明を中心に
3. 学会等名 第6回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮川和也、齋藤淳美、宮岸寛子、黒川和宏、加藤英明、辻 稔、武田弘志
2. 発表標題 胎生期ストレス刺激は脳内セロトニン神経機能分子の発現を障害する
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田弘志、宮川和也、持田(齋藤)淳美、宮岸寛子、黒川和宏、辻 稔
2. 発表標題 HDAC阻害薬のストレス適応促進作用における脳内ヒストン修飾変化の網羅的解析
3. 学会等名 第9回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川和也、持田(齋藤)淳美、黒川和宏、宮岸寛子、辻 稔、武田弘志
2. 発表標題 胎生期ストレスが惹起する脳内ヒストン修飾変化の網羅的解析
3. 学会等名 第9回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Miyagawa, Atsumi Mochida-Saito, Kazuhiro Kurokawa, Hidenao Kimijima, Minoru Tsuji, Hiroshi Takeda.
2. 発表標題 Possible involvement of histone acetylation in the stress responses associated with central 5-HT neuronal regulation in mice
3. 学会等名 6th Congress of AsCNP (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川和也、持田(齋藤)淳美、黒川和宏、辻 稔、武田弘志
2. 発表標題 胎生期ストレスが惹起する精神的脆弱性の分子基盤の解明と抑肝散の応用
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会年会・第6回アジア神経精神薬理学会・第29回日本臨床精神神経薬理学会年会 合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田弘志、宮川和也、黒川和宏、辻 稔
2. 発表標題 ストレスレジリエンスを制御する分子メカニズムの考究
3. 学会等名 第35回日本ストレス学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川和也、辻 稔、黒川和宏、持田（齋藤）淳美、高橋浩平、武田 弘志
2. 発表標題 ストレス適応および非適応モデルマウスの精神行動特性評価の実践
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuya Miyagawa, Minoru Tsuji, Hiroshi Takeda	4. 発行年 2018年
2. 出版社 NOVA Science Publishers	5. 総ページ数 20
3. 書名 Role of Epigenetic Mechanisms in the Post-traumatic Stress Disorder and Stress Resistance	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考