

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790193

研究課題名（和文） 記憶・情動・ストレス応答における新規活性酸素産生酵素の役割とその制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of role of NOX1/NADPH oxidase on memory, emotion and stress.

研究代表者

衣斐 督和（IBI MASAKAZU）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10336539

研究成果の概要：新規活性酸素産生酵素である NOX1/NADPH oxidase のノックアウトマウスを用いて行動解析を行った。その結果、NOX1/NADPH oxidase は非ストレス下では情動（不安）に影響を与えなかったが、単回ストレス負荷後の ACTH 増加とそれに続く不安レベルの増強に関与し、更に慢性ストレス負荷による副腎肥大とさらなる不安レベルの増加に寄与することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	0	2,800,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	180,000	3,580,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：NOX1/NADPH oxidase、活性酸素、神経

1. 研究開始当初の背景

中枢神経の機能調節に活性酸素の関与が報告されていたものの、その産生源は同定されていなかった。近年、遺伝子改変動物を用いた解析により、アルツハイマー病などの神経変性疾患に触媒サブユニットに NOX2 を構成する NADPH oxidase (NOX2/NADPH oxidase) が寄与することが明らかとなった。一方、NOX2 の新規ホモログが見いだされ、少なくとも5種類 (Nox1-5) の分子種が組織特異的に発現していることが明らかとなったが、神経系における役割については明らか

にされていなかった。報告者はNOX1 発現を抑制したPC12 細胞およびNox1 ノックアウトマウス (Nox1^{-/-}) の後根神経節ニューロンにおいて突起伸長が増強することを見いだしていた。この結果より Nox1 が神経機能や構造に影響することが示唆され、詳細な解析を行うことにした。まず中枢神経系における Nox1 mRNA 発現レベルを解析した結果、扁桃体および視床下部で強い発現が認められた。この知見は NOX1/NADPH oxidase が記憶・情動・ストレス応答に関与する可能性が示されたため、嫌悪刺激に対する記憶を受動回避試

験 (passive avoidance) の移行潜時を指標に検討した結果、Nox1^{-/-} で潜時の短縮が認められた。

2. 研究の目的

「中枢神経系において NOX1/NADPH oxidase が記憶・情動・ストレス応答に関与する」という仮説を検証することとした。具体的には Nox1^{-/-} を用いた行動解析および形態評価を行い、Nox1/NADPH oxidase の関わる記憶と情動、ストレス応答における役割とその制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経系の解剖学的評価

野生型マウスおよび Nox1^{-/-} マウスのパラフィンで包埋し厚さ 10 μm の連続切片を作製し、Nissl 染色により神経細胞数を解析した。また抑制性神経である GABA 作働性神経の形態を観察するために抗 calbindin (CB) 抗体および抗 calretinin (CR) 抗体で免疫染色を行った。一方、ドパミン (DA) 作働性神経およびノルアドレナリン (NE) 作働性神経の形態観察は抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体を用いて行った。

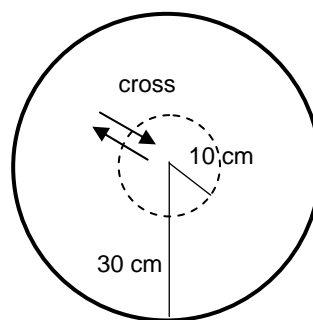
(2) ストレス負荷モデル

ストレスとして拘束ストレスを用いた。急性ストレスは3ヶ月齢野生型マウスまたは Nox1^{-/-} マウスを 50 ml コニカルチューブに入れ、0.5 - 4 時間保定することでストレスを負荷した。一方、慢性ストレスはマウスを毎日2時間の拘束ストレスを3週間継続して負荷することにより行った。情動の行動解析はストレス負荷終了後、10分経過した後に行った。

(3) 不安の評価

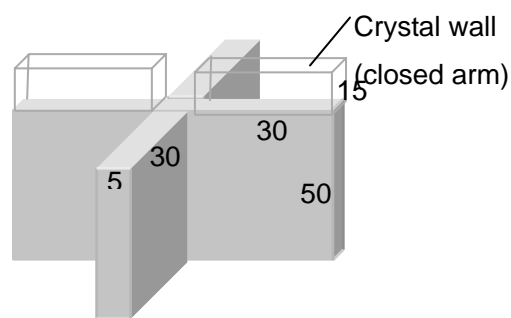
マウスの情動レベル (不安レベル) の行動評価は、open field test (OF) および高架十字迷路 (EPM) を用いて行った。

まず OF は半径 30 cm、高さ 50 cm の円柱にマウスを壁向きに入れ、5分間の軌跡を測定することで行った。情動は半径 10 cm の円を通過する回数およびそこでの滞在時間を評価指標として解析を行った。つまり通過回数および滞在時間の減少は不安レベルの増強を反映する。



OF 装置の概略図

EPM は高さ 50 cm に下に示す通路を十字に交差させ、2方向に壁をつけた迷路を作製して行った。マウスを壁のない open arm に向けて通路の交差点に置き、その後5分間の行動解析を行った。情動は open arm への移行回数または滞在時間を評価指標として解析を行った。つまりこれらの減少は不安レベルの増強を反映する。



EPM 装置の概略図

(4) 血清 ACTH 濃度の測定

拘束ストレス負荷後、エーテル麻酔下にて静脈血を採取し、EDTA を加えて 12000g、10分間遠心後に得られた上清を ACTH ELIZA Kit (MD Bioscience) を用いて測定した。

(5) 副腎重量の測定

慢性ストレス負荷後、エーテル麻酔下で副腎を摘出し、湿重量を測定、体重あたりの副腎重量で慢性ストレスによる副腎肥大を評価した。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系の解剖学的評価

顕微鏡下においてNissl 染色陽性の神経細胞数は野生型および $Nox1^{-/-}$ で著明な変化は見られず、更に海馬や大脳皮質などの層構造の異常も認められなかった。またGABA 作働性神経のマーカーである抗 CB 抗体や抗 CR 抗体による染色性、DA および NE作働性神経のマーカーである抗 TH 抗体の染色性は、記憶や情動に関連のある脳部位では両遺伝子群で差は認められなかった。しかし、摂食中枢である Ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) での CB 染色性の増加、Dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) での TH 染色性の増加が $Nox1^{-/-}$ で認められた。しかし、通常飼育下での摂食量は両遺伝子群で差は認められなかった。さらに嗅覚の調節神経回路の起始核である nucleus of lateral olfactory tract (LOT) での CR 染色性の欠落が $Nox1^{-/-}$ で認められた。今度、嗅覚における NOX1/NADPH oxidase の役割について解析していく予定である。

(2) 急性ストレスによる情動の変動

情動（不安）の評価に OF と EPM を用いて解析した。その結果、ストレスを負荷しない時は両遺伝子群で同程度の不安レベルであった（図1、2）。

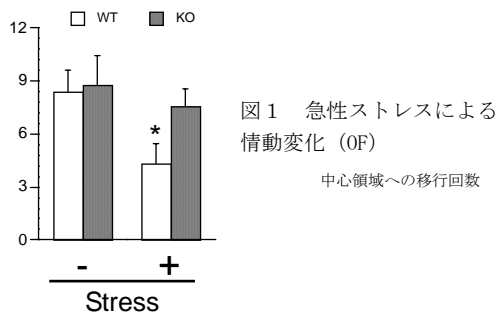


図1 急性ストレスによる情動変化 (OF)

中心領域への移行回数

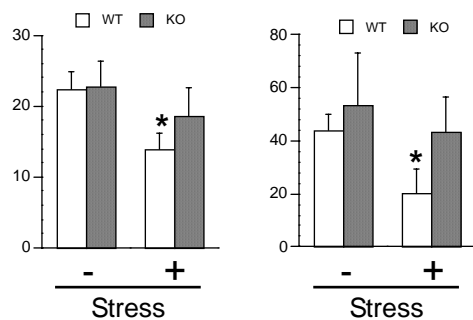


図2 急性ストレスによる情動変化 (EPM)

(左) open arm に入った回数の割合 (%)

(右) open arm での滞在時間 (s)

拘束ストレスの2時間負荷により、野生型

マウスで中心領域への移行回数の減少（図1）およびopen arm への移行回数と滞在時間の著明な減少が認められた（図2）。しかし、 $Nox1^{-/-}$ では減少は観察されず、急性ストレスによる不安増強作用は認められなかった。

(3) 急性ストレスによる血清 ACTH 増加

ストレスが生体に負荷されると HPA axis が活性化し、ストレスに対する生体の防御機構が働く。その活性化機序は視床下部の室傍核 (paraventric nucleus; PVN) の活性化により corticotrophine releasing hormone (CRH) の分泌亢進、CRH による下垂体からの ACTH 分泌促進、ACTH による副腎でのコルチゾール分泌によるネガティブフィードバックである。近年この CRH が生体の不安レベルを制御するとの報告がなされている。まずはじめに CRH ニューロンの活性化に着目し、ストレス負荷後の ACTH 産生量について解析を行った。その結果、両遺伝子群で30分をピークとする一過性の産生増加が認められたが、その増加は $Nox1^{-/-}$ で有意に抑制された（図3）。この結果より $Nox1$ /NADPH oxidase は CRH ニューロンの活性化または CRH と受容体 (CRHR1) による受容体活性化に関与することが考えられるため、現在この調節機構に注目し詳細な解析を行っている。

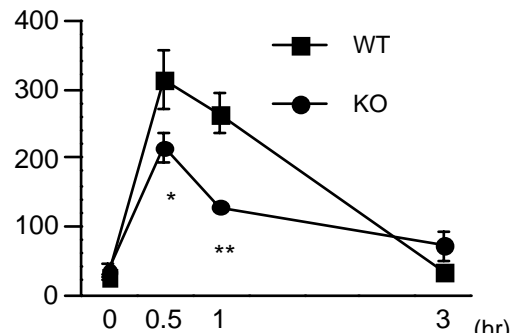


図3 急性ストレスによる血清 ACTH 濃度 (pg/ml) の変化

(4) 情動への慢性ストレスの影響

拘束ストレスを3週間負荷した後に、情動を OF および EPM で解析した。その結果、行動解析の直前に拘束ストレスを負荷しなくても野生型マウスでは有意な不安の増強が認められた。一方、 $Nox1^{-/-}$ では増強傾向はあるものの、有意なものではなかった（図4）。

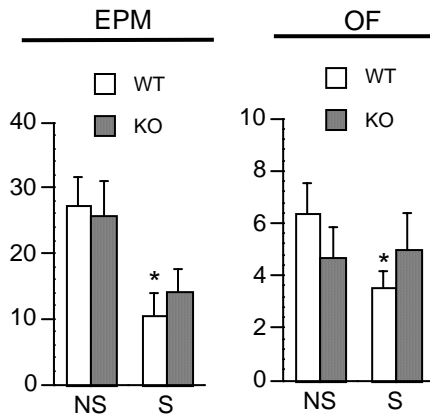


図4 情動への慢性ストレスの影響
 EPM: open arm に入った回数の割合 (%)
 OF: 中心領域への移行回数

(5) 副腎肥大への慢性ストレスの影響
 慢性ストレス下では HPA axis の破綻が生じ、ネガティブフィードバックが抑制される。そこで HPA axis 破綻の評価として副腎の肥大を解析した。慢性ストレスにより野生型では著明な副腎の肥大が認められたが、Nox1^{-/-}では野生型と比較して有意に抑制された (図5)。

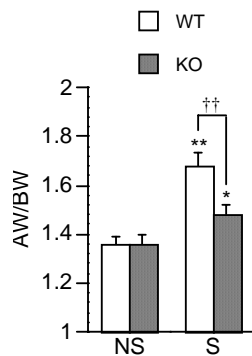


図5 慢性ストレスによる副腎肥大
 副腎重量 (mg) / 体重 (g)

本研究で得られた結果は活性酸素産生酵素がストレスによる情動変化に寄与することである。特に脳での役割が未だ不明な新規 NOX1/NADPH oxidase の一つを解明しつつあること、およびストレス社会で増加する不安障害に関与し、新たな治療薬の基礎的知見を提供することが出来るといった特色を有する研究である。

5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[その他]
 ホームページ等
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pharmaco/index.html>

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 衣斐 督和 (IBI MASAKAZU)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号: 10336539