

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591481

研究課題名（和文） 海馬におけるストレス応答機構に関する分子生物学的研究

研究課題名（英文） A molecular biological study on the stress-responsive system in the hippocampus

研究代表者

車地 暁生（KURUMAJI AKEO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00251504

研究成果の概要（和文）：マウスに新規環境ストレスを120分間負荷すると、海馬において、その発現量が急速かつ一過性に増加する遺伝子群があることがわかった。こういった変化を示す遺伝子は、不安惹起物質投与によって発現量が増加する遺伝子群の一部であることや、こういった変化は、ストレスによって増加する副腎皮質ホルモンの影響を受けないことがわかった。また、DNA マイクロアレイを用いて、新規環境ストレスに反応する新しい遺伝子群を同定した。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that a sharp and short-lasting increase in the gene expression of a set of genes was observed in the hippocampus of mice exposed to a new environment for 120 min. The set of genes were included in the anxiogenic drug-responsive genes previously reported, and the stress-response was independent from the increased hormones of adrenal cortices. In addition, a DNA microarray study revealed another set of genes responding to the stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1300000	390000	1690000
2010年度	1100000	330000	1430000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経学

キーワード：ストレス、海馬、遺伝子、コルチコステロン、行動量

1. 研究開始当初の背景

1) 精神疾患の発症や再発には、ストレスが関与している。統合失調症、気分障害や不安障害などの精神疾患では、生活上の出来事などの心理社会的ストレスが、その発症や再発に関与していることがわかっている。このストレスに応答する生物学的反応に関しては、

視床下部-下垂体-副腎(HPA)系によって統御されるステロイドホルモン分泌機構が重要であり、精神疾患の病態との関連も含めて詳細に研究されているが、このストレス応答システムには、大脳皮質、海馬や扁桃体などの脳内の神経回路も深く関与している（車地暁生と西川徹、医学のあゆみ；2001）。なかでも、海馬は、このHPA系の統御に関与してい

るだけでなく、記憶などの生理機能、神経細胞新生、さらに精神疾患患者の画像研究から、その病態との関連においても関心が集まり、神経科学および精神医学的研究において重要な研究対象となっている。この海馬においては、ストレス応答に関与する神経伝達機構(アセチルコリン、アミノ酸など)に関する知見は少しずつ集まっているものの、遺伝子発現の変化を詳細に調べた分子生物学的研究はさほど多くない。一方、このHPA系や神経回路が関与するストレス応答システムは、乳幼児期から成人に至る発達過程において完成されること、幼児期に受けたストレスは、精神疾患の発症に関与する可能性があることや成年期におけるストレス反応性に影響を与えると考えられるようになっており、このストレス応答システムの形成過程、また、このシステムに障害を与えるメカニズムやその障害の回復過程についても、これまでのところ十分にはわかっていない。また、精神疾患モデル動物におけるストレス応答性に関する分子生物学的研究も極めて少ない。

2) 車地(研究代表者)らは、不安を惹起し、ストレス研究に汎用されているFG 7142を実験動物に投与した先行研究において、サルでは、FG 7142を全身投与すると、大脳皮質の広汎な領域で、脳血流量とグルコース利用率が低下すること(Takamatsu et al., Brain Res; 2003)、ラットでは、成熟期には最初期遺伝子のひとつであるc-Fosタンパクの免疫活性が、大脳皮質、扁桃体内側核や外側手綱核において増加するが、幼若期ではこういった変化がみられず、生後発達依存的な変化があること(Kurumaji et al., J Neural Transm; 2003)、また、FG 7142投与によって、その遺伝子発現が変化する遺伝子に関して、DNAマイクロアレイ法や定量的RT-PCR法を用いた研究では、成熟マウスの大脳皮質において、7種類の遺伝子発現量が増加することを見だし、成熟マウスに拘束ストレスを負荷すると、そのうち5種類の遺伝子の発現量が脳皮質で増加することを報告している(Kurumaji et al., Neurosci Res; 2008)。

2. 研究の目的

ストレス応答に関しては、これまで、視床下部-下垂体-副腎および海馬をひとつのユニットとして、ステロイドホルモンの調節機構を中心に置いた分子生物学的研究がほとんどである。しかしながら、海馬のストレス応答に関する分子生物学的研究は、これまで十分には調べられておらず、「どの遺伝子が、どんなストレスに、どのような時間的展開でその発現量が増加するか」などの具体的かつ基本的な研究は極めて少ない。

先行研究では、成熟マウスの大脳皮質において、不安惹起物質であるFG7142投与によりその遺伝子発現量が増加する遺伝子を7種類見だし、そのうち数種類の遺伝子が拘束ストレス負荷やnovelty stressによって、遺伝子発現が増加することなど、これまで報告されていない研究成果を得ている(Kurumaji et al., 2008)。本研究では、特に海馬を中心に、ストレスに応答する遺伝子の分子生物学的機構について、その時間的变化、副腎皮質ホルモン量や行動量の変化(特にnovelty stress)との関連、さらに、生後発達の形成過程における検討を詳細に行い、より包括的な情報を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

マウスは、すべてC57/BL系の雄性を用いて行い、以下の動物実験は、東京医科歯科大学動物実験倫理委員会の承認を得ている。

1) ストレス応答機構に関する時間的に詳細な実験

生後8週のマウスに、novelty stressを負荷して、15、30、60、90および120分の時点で、海馬における遺伝子発現量の変化を既報(Kurumaji et al., 2008)に従って、RT-PCR法で調べる。また、同時に血清中のコルチコステロンを測定する。行動量は、Supermex Instrument (Muromachi-kikai Co. Ltd, Tokyo)を用いて測定する。このnovelty stressは、ホームケージで群居飼育したマウスを、単独で新しいケージに移動して行動させるストレスであり、拘束ストレスと比較すると身体的な影響が少なく、心理的なストレスが主体であり、新環境への適応や学習といった機能にも関連していると考えられている。

2) 両側副腎を摘出したマウスを用いたストレス実験

生後6週のマウスの両側の副腎を摘出し、8週目に、I-1と同様のストレス実験を行う。

3) DNAマイクロアレイを用いたストレス応答遺伝子の探索

60分間のnovelty stressを負荷したマウスの海馬から抽出したRNAを用いて、Agilent Expression Array: Whole Mouse Genome オリゴDNAマイクロアレイによる解析を行った。

4. 研究成果

1) ストレス応答機構に関する時間的に詳細な実験

マウスに novelty stress を 120 分間負荷したところ、急性にかつ一過性に、海馬の遺伝子発現量の増加と血液中のコルチコステロンの増加が起り、120 分後には、いずれもストレス負荷前のレベルに戻る事がわかった (図 1 と 2)。今回測定した 7 種類の遺伝子は、不安惹起物質 (FG7142) によって、その発現量が増加した遺伝子であり、この内の 5 種類の遺伝子 (Fos, Btg2, Cyr61, Nr4a1, Gem) が、novelty stress に応答した。

また、行動量は、120 分間のストレスの間に、漸減するパターンを示した (図 3)。

これら 3 種類のパラメーターの変化は、novelty stress に対する順応過程を表現していると考えられた。

図 1

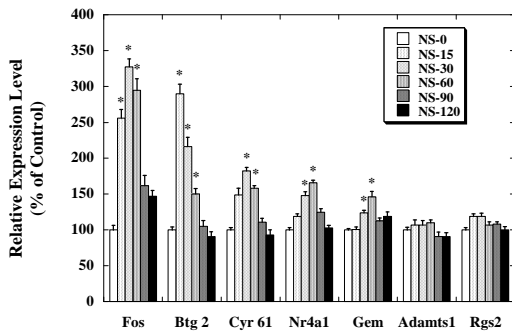


図 2

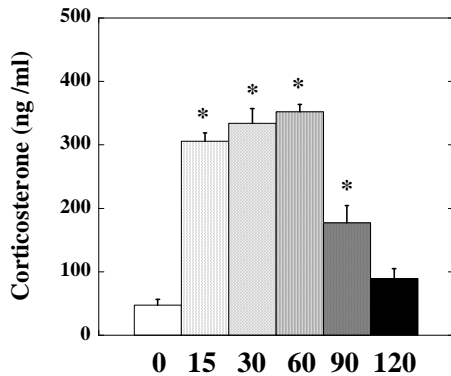
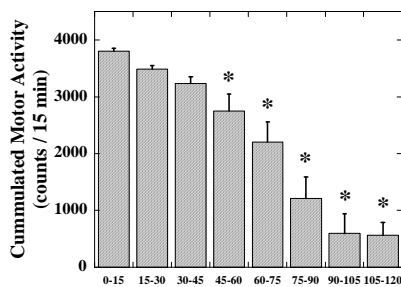


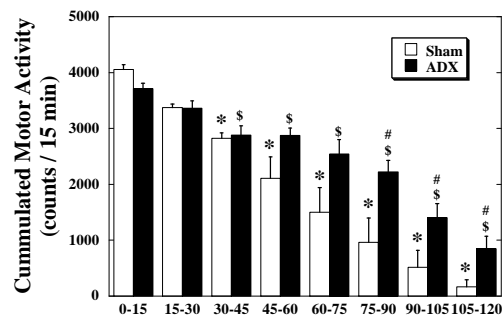
図 3



2) 両側副腎を摘出したマウスを用いたストレス実験

両側副腎を摘出したマウスを用いた novelty stress 負荷実験において、海馬における 5 種類の遺伝子発現量の変化に関しては、その影響はほとんど見られなかった。しかしながら、行動量の変化においては、ストレス負荷 45 分以降の行動量の減衰過程において、有意な遅延がみられた。従って、ストレス負荷によって増加するコルチコステロンは、こういった行動面での順応過程に関与している可能性があると考えられた (図 4)。

図 4



3) DNA マイクロアレイを用いたストレス応答遺伝子の探索

この解析によって、12 種類の新規のストレス応答遺伝子候補がみつき、RT-PCR 法によって、その変化を確認したところ、Egr2, Zic1, JunB, Sik1, Duspl, Arc, Dusp5 の 7 種類の遺伝子の発現量が、novelty stress に反応することが明らかになった。

1) および 2) の結果については、論文にまとめ、2011 年に発表した (A. Kurumaji et al, Neuroscience Research, 71: 161-167, 2011)。

マイクロアレイを用いた実験で、新たに分かったストレス応答遺伝子は、これまでの報告においてもそのストレス応答性を示唆するものと、これまで全くその報告がないものがあり、この後者に含まれる Zic1 や Sik1 などは、極めて興味深い研究対象になると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

①石川 洋世、熱田 英範、大島 一成、石川 徹、車地 暁生: Lithium の併用投与が ECT 治療後の寛解状態の維持に著効した高齢

発症の精神病症状を伴う重症うつ病の2症例、精神科 15: 381-386, 2009

② Akiko Shioiri, Akeo Kurumaji, Takashi Takeuchi, Hiroshi Matsuda, Hirokuni Arai, and Toru Nishikawa: White Matter Abnormalities as a Risk Factor for Postoperative Delirium Revealed by Diffusion Tensor Imaging, *Am J Geriatric Psychiatry*, 18:743-753, 2010.

③高木俊輔、正木秀和、大島一成、車地暁生、西川 徹、Rifampicin 投与によって haloperidol 血中濃度が著明に低下した統合失調症の1例、精神医学、52: 179-182、2010.

④藤田宗久、上里彰仁、川上礼子、竹内崇、西川徹、車地暁生、松果体・鞍上部 germinoma 治療経過中に緊張病、その後躁状態を繰り返した1症、精神科 17(6):643-647, 2010

⑤ Ohta Y, Nariyai T, Kurumaji A, Hirakawa K, Ohno K. Increased binding of inhibitory neuronal receptors in the hippocampus in kainite-treated rats with spontaneous limbic seizures. *J of Clinical Neuroscience*, 17: 612-616, 2010.

⑥ Kurumaji A, Umino M, Nishikawa T. Effects of novelty stress on hippocampal gene expression, corticosterone and motor activity in mice. *Neuroscience Research*. 2011;71:161-167.

⑦吉池卓也、竹内 崇、佐々木健至、石川洋世、藤田宗久、熱田英範、正木秀和、西多昌規、行実知昭、大島一成、柏 淳、山本直樹、車地暁生、西川 徹. Aripiprazole のせん妄に対する有用性. 精神医学. 2011;53: 543-549.

⑧武田充弘、川俣光太郎、石橋 哲、成島健二、西川 徹、車地暁生、パーキンソン病の幻覚妄想状態に aripiprazole が著効した1症例、精神科 20: 343-349、2012.

⑨ Uezato A, Yamamoto N, Kurumaji A, Toriihara A, Umezaki Y, Toyofuku A, Nishikawa T. Improvement of asymmetrical temporal blood flow in refractory oral somatic delusion after successful electroconvulsive therapy, *J ECT*. in press.

[学会発表] (計 11 件)

1)車地 暁生、西川 徹: マウス海馬における新環境ストレスに反応する分子機構の生後発達 第52回日本神経化学会、2009年6月

2)車地暁生、大島一成、行実知昭、古田 光、正木秀和、熱田英範、平沢俊行、新垣 浩、寺田 倫、川上礼子、吉池卓也、西多昌規、藤田宗久、上里彰仁、西川 徹: 気分障害入院患者の精神科診断学的研究、第29回日本

精神科診断学会 2009年10月

3)車地暁生、大島一成、行実知昭、古田 光、正木秀和、熱田英範、平沢俊行、新垣 浩、寺田 倫、川上礼子、吉池卓也、西川 徹: 気分障害入院患者の退院時における向精神薬治療に関する研究、第19回日本臨床精神薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会、2009年11月

4)小方茂弘、大島一成、田村赴紘、久光麻理子、高橋英至、横関博雄、車地暁生、西川 徹、向精神薬を投与中に膿疱型薬疹を呈した統合失調症の1例、第88回東京精神医学会学術集会、東京、H22.2.27

5)A. Kurumaji, M. Umino, T. Nishikawa. Adrenalectomy induces minimal changes in a molecular responsive system to novelty stress in the hippocampus of mice. *Neuro 2010 (The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, and The 20th Annual Meeting of Japanese Neural Network Society)*, 9.2.2010. Kobe.

6)田中 修、行実知昭、成島健二、山本直樹、車地暁生、西川 徹、統合失調症の前駆状態が疑われたアスペルガー障害と躁うつ病の合併した一症例、第90回東京精神医学会学術集会、東京、H22.11.13

7)西田秀子、熱田英範、大島一成、車地暁生、西川 徹、特発性全般てんかん、軽度知的障害および統合失調症を合併した一例、第26回「てんかんの精神症状と行動」研究会、東京、H22.5.29

8)車地暁生、大島一成、行実知昭、古田光、正木秀和、熱田英範、平沢俊行、新垣浩、寺田 倫、川上礼子、柏 淳、吉池卓也、西多昌規、藤田宗久、上里彰仁、成島健二、筒井啓太、西川 徹. 高齢者の気分障害入院患者に関する臨床的研究. 第107回日本精神神経学会学術総会、東京、2011年10月26日.

9)治徳大介、松本 薫、久保田真由、池井大輔、奥住祥子、高木俊輔、京野穂集、上里彰仁、武田充弘、西多昌規、竹内 崇、成島健二、山本直樹、車地暁生、西川 徹. 練炭自殺後に大脳白質病変を伴わずに間歇型一酸化炭素中毒様症状が出現した一例. 第24回日本総合病院精神医学会、福岡、2011年11月26日.

10)車地暁生、成島健二、京野穂集、奥住祥子、西多昌規、高木俊輔、上里彰仁、山本直樹、竹内 崇、西川 徹. 高齢うつ病患者に対する電気けいれん療法後の維持療法を目的としたリチウムの併用投与に関する臨床研究. 第21回日本臨床精神神経薬理学会、第41回日本神経精神薬理学会合同年会、東京、2011年10月29日.

1) 車地曉生, 成島健二, 行実知昭, 大島一成, 柏 淳, 熱田英範, 西多昌規, 正木秀和, 京野穂集, 上里彰仁, 武田 充弘, 西川徹. 双極性障害 2 型入院患者の診断および縦断的経過に関する臨床研究. 第 31 回日本精神科診断学会, 松本, 2011 年 11 月 19 日.

〔図書〕 (計 3 件)

1) 車地曉生, 大島一成, 行実知昭, 古田 光, 正木秀和, 熱田英範, 平沢俊行, 新垣 浩, 寺田 倫, 川上礼子, 吉池卓也, 西多昌規, 藤田宗久, 西川 徹: 双極性障害入院患者の発症および前駆症状に関する後方視的研究, Bipolar Disorder 8, Bipolar Disorder 研究会編, アルタ出版, 15-21, 2010.

2) 車地曉生, 塚本尚子, 神経症, 心因 (ストレス) 反応, 人体の構造と機能からみた病態生理ビジュアルマップ 4, 佐藤千史, 井上智子編, 東京, 医学書院, 2010:199-205.

3) 車地曉生. 不眠. 緊急度重症度からみた症状別看護過程 + 病態関連図. 井上智子, 佐藤千史 監修, 東京, 医学書院, 2011; 368-374.