

## 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 29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780260

研究課題名（和文） 多元的神経活動解析によるシクロオキシゲナーゼ-2 依存的ストレス  
応答経路の解明研究課題名（英文） Multi-factorial analysis of stress reaction in the brain depending  
on cyclooxygenase-2

研究代表者

松脇 貴志 (MATSUWAKI TAKASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：20447361

研究成果の概要（和文）：

脳内ストレス刺激仲介因子として働くシクロオキシゲナーゼ2の発現を制御する候補の1つとしてインターロイキン1 $\beta$ を同定した。また、感染・栄養・拘束という3種類のストレス条件のうち感染・拘束ストレス下において、神経内分泌系のストレス反応の中心を担うグルココルチコイドの分泌にシクロオキシゲナーゼ2が必須であることを明らかにした。さらに、幼児期のスクロース摂取による過栄養ストレス環境が成熟後の不安傾向を減弱させることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

We determined interleukin-1 $\beta$  as a regulator of cyclooxygenase-2 in the brain under stress conditions and found that stress response of neuroendocrine system is mediated by cyclooxygenase-2 in the brain under LPS and restraint stress conditions, but rather independent on it under hypoglycemic stress. In addition, we demonstrated that hypernutrition environment induced by sucrose consumption in the adolescence reduces the anxiety tendency after maturation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学、獣医学・基礎獣医学、基礎畜産学

キーワード：ストレス 生理学 神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

我々は過去の研究において、感染・飢餓・拘束の3種類のストレス刺激それぞれが哺乳類の生殖機能を抑制する際に脳内でストレス情報伝達に重要な役割を果たす仲介因子としてシクロオキシゲナーゼ (COX; プロスタグランジンの誘導型合成酵素) -2 を同定し

た。生体がストレスに曝されると、その情報が脳内で処理された結果神経内分泌系のストレス反応が引き起こされる。その中心的な役割を担うのは視床下部-下垂体-副腎 (Hypothalamus-pituitary-adrenal; HPA) 軸である。同軸の活性化は視床下部での副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) 産生

に始まり、最終生理活性物質として副腎から多量に分泌されるグルココルチコイドは生体内で様々な作用をもつ。我々は副腎からのグルココルチコイドが、COX-2の発現を抑制することでストレス条件下でも生殖機能を維持することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、新たなストレス伝達経路として期待されるCOX-2を介したストレス種非特異的な脳内情報ネットワークを明らかにすることを目的とし、1、急性ストレス時の視床下部におけるストレス関連遺伝子発現量の経時的測定/2、幼児期慢性ストレスが成熟後の脳機能に与える影響の解析を行った。

## 3. 研究の方法

全ての実験でWistar-imamichi系のラットを用いた。

- (1) 副腎を除去する事により内因性グルココルチコイドをもたないラットおよびこの副腎摘出ラットにストレスレベルのグルココルチコイドを補充する群を用い、無処置群との比較を行った。

感染（リポポリサッカライド=LPS投与）、飢餓（2デオキシグルコース=2DG; グルコース取り込み阻害剤投与）、拘束（四肢の緊縛）という3種類のストレス刺激をこれらのラットに負荷し、これらのラットから血液と脳を刺激30分後と120分後に採取した。

採取したサンプルを用い、血清中グルココルチコイド濃度の測定を行った、また、視床下部でのCRHおよびCOX-2、ミクロソームプロスタグランジンE合成酵素（mPGES）遺伝子および炎症性サイトカイン群の発現量をリアルタイムPCR法にて測定した。さらに、各ストレス条件下で非選択的COX阻害剤もしくはCOX-2選択的阻害剤を投与した際のグルココルチコイド濃度を測定した。

- (2) 離乳（3週齢）から性成熟（8週齢）までの間数種の実験的栄養環境下に置かれたラットを成熟後に行動実験に供した。

① 通常餌群・低栄養（通常餌群の75%給餌）群・高脂肪餌群・通常餌+スクロース水溶液群を用意し、成熟後に記憶脳および不安傾向を評価した。

② スクロース群の不安傾向に見られた変化がスクロースのもたらす味覚と栄養のどちらに起因するのかを明らかにするため、サッカリン水（栄養をもたない人工甘味料）摂取群と対照群との比較/胃ゾンデを用いた6時間毎のスクロース水投与群と生理食塩水投与群との比較を

行った。

## 4. 研究成果

- (1) COX-2発現制御因子としてのインターロイキン（IL）-1 $\beta$

感染・飢餓・拘束という3種類のストレス条件下においてCOX-2の発現を促す因子の候補としてIL-1 $\beta$ を同定した。またこれらの条件下におけるIL-1 $\beta$ の発現はストレス時に増加するグルココルチコイドによって抑制されることが明らかとなった。他の代表的なサイトカインであるTNF $\alpha$ およびIL-6では、このような傾向は見られなかった。

- (2) ストレス刺激後のグルココルチコイド濃度及びCOX-2発現量の変化

今回検討した3種類のストレス条件下全てにおいて、血清中グルココルチコイド濃度はストレス刺激後30分で増加した。このような増加は副腎摘出動物では見られず、グルココルチコイド補充群ではストレスレベルとほぼ同等のグルココルチコイド濃度を示した（図1）

一方、COX-2の発現量は副腎非摘出群において全てのストレス条件下で刺激30分後では増加しなかった。さらに、感染ストレスでは刺激120分後で有意な増加が見られたが、飢餓ストレスと拘束ストレス条件ではこのような増加は確認されなかった（図2）。mPGESの発現量はCOX-2と同様の推移を示した。

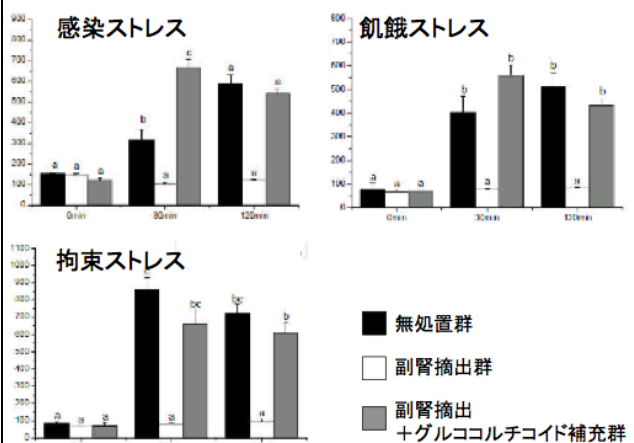


図1 各ストレス負荷0, 30, 120分後の血清中グルココルチコイド濃度 (ng/ml)

- (3) 副腎からのグルココルチコイドがCOX-2/mPGES発現量に与える影響

飢餓ストレスおよび拘束ストレスについては、刺激後120分でのCOX-2/mPGES発現量が副腎摘出群で非摘出群に比べて有為に多く、グルココルチコイド処置群では非摘出群と同程度だった。

一方で感染ストレス条件下では、3種類の処置群間で発現量の有為な差は見られなかった(図2)。このことから、少なくとも飢餓及び拘束ストレス群では血中で増加するグルコルチコイドがCOX-2増加を抑制する働きをもつことが、今回改めて定量的に確認された。

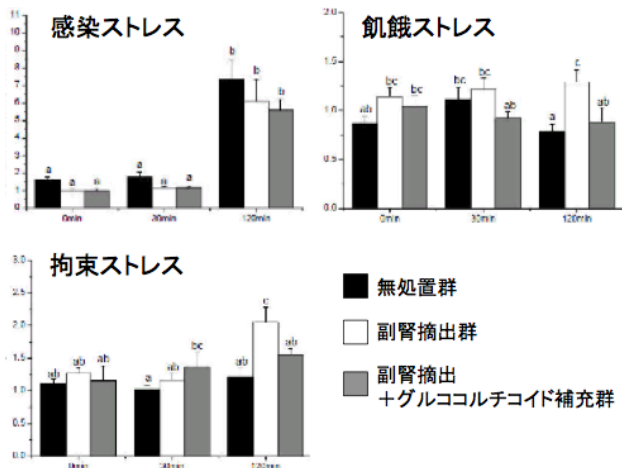


図2 各ストレス負荷 0, 30, 120 分後の COX-2 発現量 (/HPRT)

(4) COX 阻害剤がストレス誘導性グルコルチコイド増加に与える影響

非選択的 COX 阻害剤、COX-2 選択的阻害剤のいずれを用いた場合にも感染ストレスおよび拘束ストレス条件下における血中グルコルチコイドの増加が阻害された。一方、飢餓ストレスによるグルコルチコイド増加は阻害されなかった(図3)。これらの結果から、COX-2 は感染・拘束ストレス刺激を仲介して HPA 軸の活性化すなわち神経内分泌系のストレス反応を誘起する役割を持つことが明らかとなった。

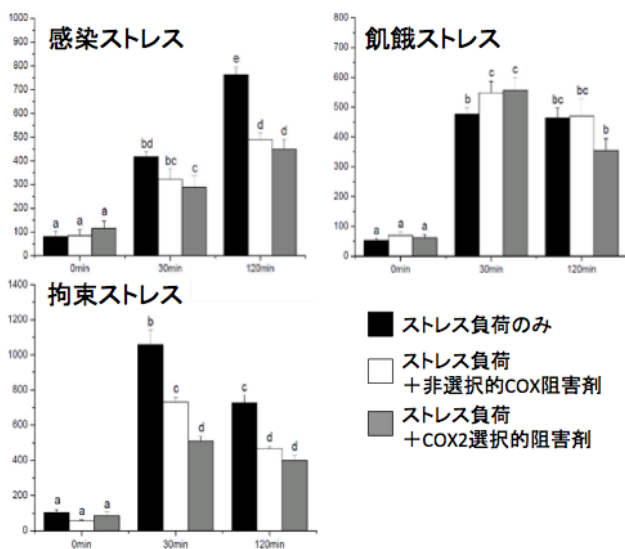


図3 各ストレス負荷 0, 30, 120 分後の血中グルコルチコイド濃度

(5) 幼若期栄養ストレスが不安傾向/記憶脳に与える影響

スクロース水を与えた群においてオープンフィールド試験での中心部滞在時間の延長、モリス水迷路試験でのプラットフォーム到達時間の延長が観察された。この結果から、若齢期のスクロース摂取には成熟後の不安傾向と記憶能を低下させる作用があることが示唆された。一方、低栄養群および高脂肪餌給餌群では通常餌群と比較して顕著な差は見られなかった(図4)。

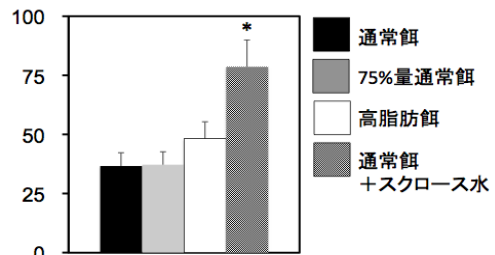


図4 Open-field test での中央部滞在時間(秒)

(6) スクロースの甘味/栄養それぞれが不安傾向に与える影響

スクロース水溶液の代わりに栄養分を含まないサッカリンの水溶液を摂取した群では、対照群との間に不安傾向の有為な差は見られなかった。一方で、結果(5)のスクロース水群が摂取したものと同量のスクロースをゾンデによって味覚を与えること無く胃内に直接投与した群では、生理食塩水投与群と比較してオープンフィールドテストでの中心部滞在時間、高架式十字迷路試験での open arm での滞在時間が有意に長く、進入回数が有意に多かった(図5)。この結果から、幼若期のスクロース摂取による成熟後の不安傾向減弱作用をもつのは、スクロースの甘味が引き起こす快情動ではなく栄養分であることが示唆された。現在は免疫組織学的手法を用いてこの1で観察されたCOX-2の発現部位および細胞種の同定することでストレス種ごとの情報伝達経路の解析を進めている。

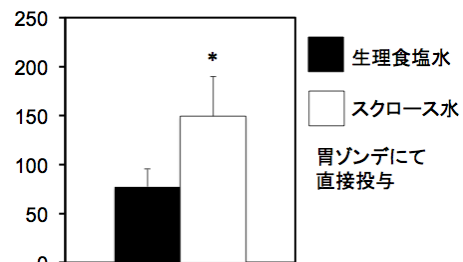


図3 Open-field test での中央部滞在時間(秒)②

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yanbo Ma, Takashi Matsuwaki, Keitaro Yamanouchi, Masugi Nishihara, Glucocorticoids differentially regulate cyclooxygenase-2-related signaling pathway in the hypothalamus under various stress conditions, Society of Neuroscience, October, 2012, New Orleans, USA
- ② Takashi Matsuwaki, Yuka Iwahashi, Keitaro Yamanouchi, Masugi Nishihara, Effects of sucrose consumption in adolescence on anxiety behavior in adulthood in rats, Society of Neuroscience, 13, November, 2011, Washington DC, USA
- ③ 岩橋佑佳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉、若齢期栄養状態が成熟後の不安傾向、記憶能およびストレス耐性に与える影響、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 16 日、北海道帯広市
- ④ 岩橋佑佳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉、若齢期栄養状態が成熟後の脳機能に与える影響、第 10 回行動神経内分泌研究会、2010 年 9 月 13 日、茨城県古河市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松脇 貴志 (MATSUWAKI TAKASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：20447361