

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390284

研究課題名(和文) 縫線核 5-HT/GABA 共存細胞の機能発達 幼若期ストレスとエピジェネティクス

研究課題名(英文) Functional development of 5-HT/GABA neurons in the raphe nuclei - postnatal stress and epigenetics

研究代表者

吉岡 充弘 (YOSHIOKA, Mitsuhiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40182729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000 円、(間接経費) 3,990,000 円

研究成果の概要(和文)：児童虐待が成人後のうつ病発症のリスク・ファクターになることが知られており、そのメカニズムの解明と治療法の開発が急務である。そのメカニズムを解明するために、生後3週齢のラットにストレスを負荷した。その結果、成熟後のラットにうつ様行動が観察され、セロトニン神経の起始核である背側縫線核においてセロトニン合成酵素TPH2のタンパク量増加が観察された。その影響は選択的セロトニン再取り込み阻害薬の繰り返し投与によって部分的に改善することが見出された。このように、選択的セロトニン再取り込み阻害薬の投薬によって虐待による悪影響が部分的に緩和できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It is known that child abuse is a risk factor for depression. To elucidate the mechanisms and to develop the treatments are required. Rats were subjected to aversive foot shock (FS) during the third week of the postnatal period (3wFS group). 3wFS group displayed depressive-like behavior in adulthood and showed the increased protein levels of tryptophan hydroxylase 2 in the dorsal raphe nucleus which is a origin of serotonergic neurons. These adverse effects were partly reversed by repeated administration of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI). Thus, it is possible that SSRI administration could partly attenuate the adverse effects of child abuse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学

1. 研究開始当初の背景

児童虐待が成人後の精神疾患発症のリスク・ファクターになることが知られており、そのメカニズムの解明と治療法の開発が急務である。これまで申請者のグループは生後3週齢の幼若期ラットにストレスを負荷すると中脳の縫線核 5-HT/GABA 共存細胞数が減少し、成熟期に異常行動が出現することを明らかにしてきた。また、最近、幼若期における母獣からの毛づくろいなどの養育行動が少ない群で、GABA 合成酵素である glutamic acid decarboxylase (GAD) の遺伝子プロモーター領域でのメチル化が生じ、海馬 GAD mRNA 発現量が減少することが報告された (Zhang et al. 2010)。このように、幼若期に受けたストレスが DNA メチル化を介して 5-HT/GABA 神経細胞の形態、機能に影響を与えている可能性が示唆されてきた。

2. 研究の目的

本研究は GAD1 プロモーター領域のメチル化に焦点を当て、幼若期ストレスが縫線核 5-HT/GABA 共存細胞数を減少させ、異常行動を出現させる原因を追究することが最終目的であった。しかし、我々のこれまでの知見を公表、論文投稿をした際に、1)我々が用いた細胞数をカウントする手法はやや定量性に乏しい、2)行動学的検討が不十分で行動異常に対する解釈が難解である、という批判を受けた。これらは我々の仮説の出発点となるものであるから、我々はまずこれらの批判に答え、研究の足場を固めることにした。

3. 研究の方法

(1)児童虐待がうつ病のリスク要因になるという知見に基づき、生後3週齢時に幼若期ストレスを負荷したラットのうつ様行動を強制水泳試験、スクロース嗜好性試験を用いて調べ、その後脳を摘出し、セロトニン神経の起始核である背側縫線核および正中縫線核の TPH2、GAD67 のタンパク量を定量性の高い方法であるウェスタンブロッティング法を用いて調べた。我々の仮説では TPH2、GAD 遺伝子プロモーターのメチル化を想定しているが、そもそもこれらの酵素のタンパク量が幼若期ストレスによって減少することを確認する必要があるため、5-HT、GABA そのものではなく、それらの合成酵素を対象とした実験を行った。

(2)さらに、上記の方法について観察された幼若期ストレスの効果が選択的セロトニン再取り込み阻害薬によって回復するかどうかを検討した。具体的には、幼若期ストレス負荷後に選択的セロトニン再取り込み阻害薬を二週間に渡り経口投与した。

4. 研究成果

(1)幼若期ストレスを付加されたラットは、強制水泳試験において有意に無動時間が長かった(図 1)。この無動時間は学習性無力の

指標とされ、うつ様行動を一部反映すると考えられている。

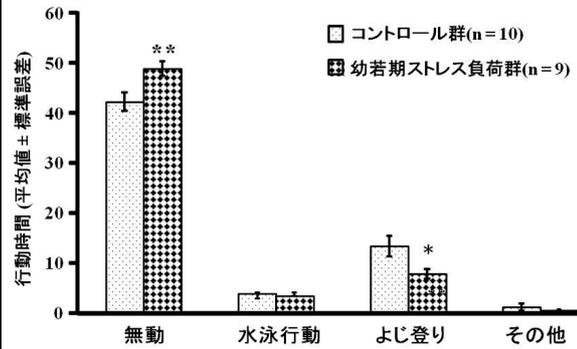


図 1: 生後 3 週齢時幼若期ストレス負荷が強制水泳試験時のうつ様行動 (学習性無力) に与える影響

この無動時間増加は、単純な運動量の変化を反映しているわけではない。ラットを新奇環境に置いて運動量を測定しても、幼若期ストレス負荷群とコントロール群との間には差は見られなかった(図 2)。

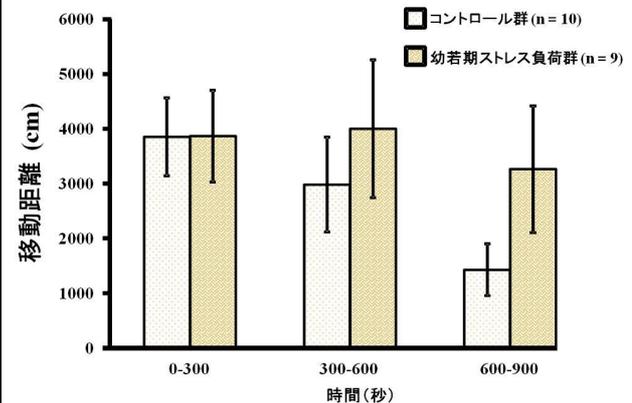


図 2: 生後 3 週齢時幼若期ストレス負荷が新奇環境下での運動量に与える影響

しかしその一方で、スクロース嗜好性には幼若期ストレス負荷の影響は無かった(図 3)。

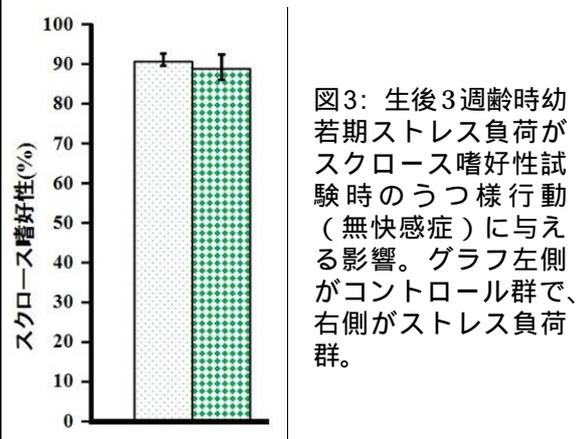


図 3: 生後 3 週齢時幼若期ストレス負荷がスクロース嗜好性試験時のうつ様行動 (無快感症) に与える影響。グラフ左側がコントロール群で、右側がストレス負荷群。

スクロース嗜好性の低下はうつ病患者によく見られる無快感症の指標となると考えられているが、今回の研究ではそのような傾

向は見られなかった。今回用いた幼若期ストレス負荷モデルでは、学習性無力感にのみ影響が見られた。

3 週齢時に幼若期ストレスを負荷したラットの脳を摘出し、背側縫線核および正中縫線核の TPH2 タンパク量を定量性の高い方法であるウェスタンブロッティング法を用いて調べたが、背側縫線核 TPH2 タンパク量にはむしろ増加傾向が観察された(図 4)。このように、予測通りの結果を得ることができなかった。

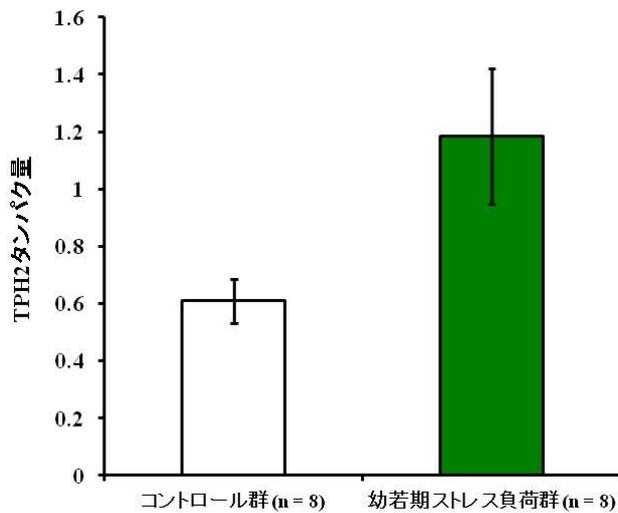


図 4: 生後 3 週齢時幼若期ストレス負荷が背側縫線核 TPH2 タンパク量に与える影響

さらに、正中縫線 TPH2 タンパク量においても幼若期ストレス負荷の影響は観察されなかった(図 5)。

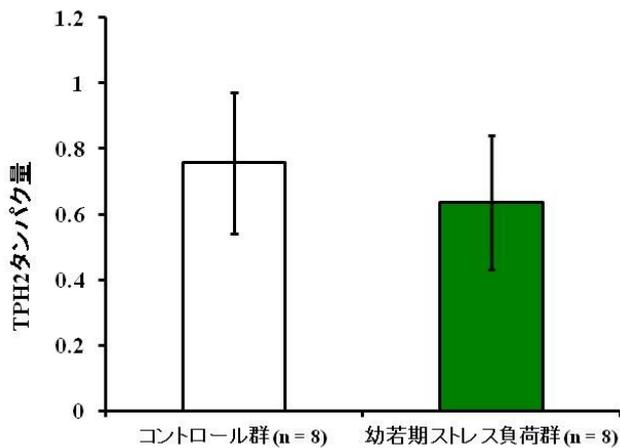
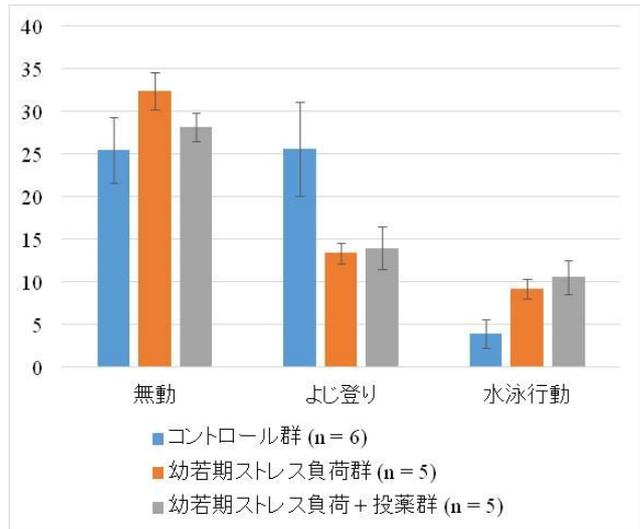


図 5: 生後 3 週齢時幼若期ストレス負荷が正中縫線核 TPH2 タンパク量に与える影響

このように当初の仮説に反する結果を得たため、当初予定していた DNA メチル化解析を中止した。今回定量性の高い結果を用いた結果としてこれまでの結果を再現できなかった理由を今後追究していく必要がある。

1 つ考えられるのは、測定しているものの違いである。これまでは 5-HT そのものを測定してきたが、今回はその合成酵素を測定した。あまり無いことではあるが、合成酵素の機能に変化がなく 5-HT 量そのものが低下することも可能性としてはありえる。



(2)さらに、上記の方法について観察された幼若期ストレスの効果(うつ様行動の増加)が選択的セロトニン再取り込み阻害薬によって回復するかどうかを検討した。具体的には、幼若期ストレス負荷後に選択的セロトニン再取り込み阻害薬(flvoxamine 10 mg/kg)を二週間に渡り、一日一回経口投与した。その結果、成熟後に強制水泳試験を行った時の無動時間増加が若干改善した(図 6)。

図 6: 生後 3 週齢時幼若期ストレス負荷後のセロトニン再取り込み阻害薬連続投与が成熟後の強制水泳試験時のうつ様行動(学習性無力)に与える影響

このように、選択的セロトニン再取り込み阻害薬を投薬することで虐待による悪影響を緩和できる可能性が示された。しかし、青少年への選択的セロトニン再取り込み阻害薬投薬治療には危険性が指摘されており、実際の治療にあたってはリスクとのバランスの中で考えていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Ohmura Y, Kumamoto H, Tsutsui-Kimura I, Minami M, Izumi T, Yoshida T, Yoshioka M.: Tandospirone suppresses impulsive action by possible blockade of 5-HT1A receptor. J Pharmacol Sci. 2013;122:84-92. 査読有,

<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.12264FP>

Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Kumamoto H, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M: Milnacipran enhances the control of impulsive action by activating D(1)-like receptors in the infralimbic cortex.

Psychopharmacology (Berl). 2013; 225:495-504. 査読有,
DOI:10.1007/s00213-012-2835-5

吉岡充弘

リチウムの作用機序

臨床精神医学 Japanese Journal of Clinical Psychiatry Vol.42 No.11 November 2013 1405-1413 (第42巻 第11号 2013年11月28日発行)

Izumi T, Ohmura Y, Futami Y, Matsuzaki H, Kubo Y, Yoshida T, Yoshioka M: Effects of serotonergic terminal lesion in the amygdala on conditioned fear and innate fear in rats. Eur J Pharmacol. 2012; 696:89-95. 査読有,
DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.09.028.
Shikanai H, Yoshida T, Konno K, Yamasaki M, Izumi T, Ohmura Y, Watanabe M, Yoshioka M: Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. J Neurosci. 2012; 32:14415-14426. 査読有,
DOI:10.1523/JNEUROSCI.5929-11.2012.

Yamaguchi T, Tsujimatsu A, Kumamoto H, Izumi T, Ohmura Y, Yoshida T, Yoshioka M: Anxiolytic effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, via serotonin 5-HT(1A) receptors on anxiety-related behaviors in rats experienced aversive stress. J Ethnopharmacol. 2012; 43:533-539. 査読有,
DOI: 10.1016/j.jep.2012.07.007.

吉岡 充弘

分子精神医学 縫線核(群)
株式会社 先端医学社 Vol.12 No.4 291-294 2012

[学会発表](計13件)

木村 生、大村 優、吉田隆行、泉 剛、吉岡充弘

Repeated milnacipran ameliorates rats with elevated impulsivity
ミルナシブラン反復投与は衝動性亢進ラットを改善する
第87回日本薬理学会年会

(2014.3.19-21) 仙台市 仙台国際センタ -

大村 優、田中健二、山中章弘、吉岡充弘

(2013.10.24-26)

正中縫線核から腹側海馬へのセロトニン神経投射は5-HT_{2C}受容体を介して不安様行動を調節する - オプトジェネティクス(光遺伝学)による解明

The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the ventral hippocampus Modulates anxiety-like behavior via stimulating 5-HT_{2C} receptors

第23回日本臨床精神神経薬理学会 第43回日本神経精神薬理学会合同年会
沖縄コンベンションセンタ -

Robel Ghebream, Takeshi Izumi, Takayuki Yoshida, Yu Ohmura, Mitsuhiro Yoshioka

Effects of repeated restraint stress on depression and anxiety like behaviors, and on glucocorticoid receptor function in the rat brain

第129回日本薬理学会関東部会 順天堂大学 本郷キャンパス (2013.10.19)

M. Yoshioka, S. Inubushi, T. Ochiai, M. Miyamoto, Y. Ohira, H. Ohta

Effects of hypergravity on serotonin-related gene expression in the mouse brain

スペイン バルセロナ Palau de

Congressos de Catalunya

(2013.10.5-9)ポスター発表

Robel Ghebream, Takeshi Izumi, Takayuki Yoshida, Yu Ohmura, Mitsuhiro Yoshioka

The effects of repeated restraint stress on expression of glucocorticoid receptor and FKBP5 in the brain

第64回日本薬理学会北部会 旭川市大雪クリスタルホール (2013.9.13)

吉田隆行、今野幸太郎、内ヶ島基政、大村 優、泉 剛、渡辺雅彦、吉岡充弘
扁桃体におけるセロトニンおよびカンナビノイドシグナル伝達系の相互調節機構

第36回日本神経科学大会 第56回日本神経化学学会大会

第23回日本神経回路学会大会 国立京都国際会館 (2013.6.20-23)ポスター発表

大村 優、田中謙二、山中章弘、吉岡充弘

光遺伝学によるセロトニン神経活動の操作と不安関連行動

第86回日本薬理学会年会 福岡国際会議場 (2013.3.21-23)

Yu Ohmura, Kenji Tanaka, Akihiro Yamanaka, Mitsuhiro Yoshioka

Optogenetic Control of Serotonergic Neurons and Anxiety-like Behavior
ACNP 51st Annual Meeting 米国
Westin Dipromat in Hollyseed
(2012.12.2-6)

Mitsuhiro Yoshioka, Taku Yamaguchi, Hisashi Ohta, Junichiro Gyotoku, Mutsumi Miyamoto and Toshimasa Ochiai
Effects of Parabolic Flight on Serotonin-Related Gene Expression in the Mouse Brain

The 21st KOREA-JAPAN JOINT SEMINAR ON PHARMACOLOGY
韓国 濟州島 Shine Ville Luxury Resort Jeju (2012.11.1-2)

Takeshi Izumi, Takayuki Yoshida, Hirokazu Matsuzaki, Kotaro Konno, Kenji F. Tanaka, Hiroki Shikanai, Yu Ohmura, Masahiko Watanabe,

Mitsuhiro Yoshioka
SSRI exerts anxiolytic effect via 5-HT_{1A} receptors in the basolateral nucleus of amygdala

Neuroscience 2012 米国 ニュ - オ - リンズ (2012.10.13-17) Ernest N. Morial Convention Center

大村 優、吉田 隆行、泉 剛、吉岡 充弘
腹側海馬におけるセロトニン-7 受容体は恐怖記憶の想起に関与している
Serotonin-7(5-HT₇) receptor in the ventral hippocampus is involved in the Retrieval of fear memory
第 35 回日本神経科学大会
Neuroscience 2012 名古屋国際会議場
(2012.9.18-21)

Yu Ohmura, Mitsuhiro Yoshioka
Acute administration of lithium, but not valproic acid or carbamazepine, suppresses impulsive action in rats
第 2 回東アジア双極性研究会 The 2ND MEETING OF EAST ASIAN BIPOLAR FORUM 九州大学
(2012.9.7-8)

Mitsuhiro Yoshioka Hiroki Shikanai, Takayuki Yoshida, Kohtarou Konno,
Functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus
Serotonin CLUB MEETING フランス モンペリエ 2012.7/10 ~ 12

emotional regulation and disorders.
In: Insights into the Amygdala, chapter 2, 25-62, 2012, Nova Science Publishers, Inc.

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
なし
取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://hokudaineuropharmacol.com>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
吉岡 充弘 (YOSHIOKA, Mitsuhiro)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40182729

(2) 研究分担者
泉 剛 (IZUMI, Takeshi)
北海道大学・医学研究科・講師
研究者番号: 60312360

吉田 隆行 (YOSHIDA, takayuki)
北海道大学・医学研究科・助教
研究者番号: 60374229

大村 優 (OHMURA, Yu)
北海道大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80597659

川戸 佳 (KAWATO, Suguru)
東京大学大学院・総合文化研究科・教授
研究者番号: 50169736

(3) 連携研究者
なし

〔図書〕 (計 2 件)

山口 拓、富樫廣子、吉岡充弘: 不安恐怖、『心理学研究法 3』学習・動機・情動 pp.185-203: 誠信堂 2011
Izumi T. Yoshida T. Watanabe M. Yoshioka M.: Role of the amygdalar serotonergic system in