

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590887

研究課題名(和文) 高齢期におけるストレス脆弱性の神経基盤とその性差の解明

研究課題名(英文) Neural mechanism underlying stress vulnerability in aged rats

研究代表者

由利 和也 (YURI, Kazunari)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：10220534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：高齢期にはストレスに対する脆弱性が高くなる。しかし高齢期のストレス応答の神経基盤については未だ不明な点が多い。本研究では、高齢期の脳内ストレス応答について明らかにするため、脳内ストレス関連因子発現に及ぼす加齢の影響について、若齢および老齢ラットを用いて検討した。その結果、若齢ラットと比較して、ストレス負荷によるセロトニン等のストレス関連因子の発現誘導が高齢ラットで変化すること、その変化にはエストロゲン受容体が関与することが示された。さらに、高齢期のストレス負荷後のセロトニンの発現には性差があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It has been known that stress responses in the brain change with age and aging increases the vulnerability to various stressors. The secretion/release of stress-related hormones and neurotransmitters in response to stressors in aged animals differ from those in young. However, little is known about the neural mechanisms underlying such age-related changes. Therefore, to elucidate effects of aging on stress response in the brain, we examined the expression levels of stress-related factors using young and old rats. Our results revealed that the stress-induced expression of stress-related factors such as serotonin was changed with age. Moreover, the present data demonstrated that there are sex differences in these stress responses in old rats.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ストレス エストロゲン セロトニン 加齢

1. 研究開始当初の背景

高齢期には、ストレスに対する脆弱性が高くなる (Karel, 1997; Swaab et al., 2005)。ストレス関連疾患の1つであるうつ病は、認知症とならび、老年期精神疾患の代表的なものとなっている (Beekman et al., 1999)。しかし、高齢期のストレスに関する研究の多くは社会・心理的もしくは臨床的な観点からのアプローチであり、その神経基盤については未だ不明な点が多い。

エストロゲンは、生殖機能だけでなく、不安情動性 (Lund et al., 2005) や認知機能 (Markowska and Savonenko, 2002)、ストレス応答の調節 (Lund et al., 2006) などにおいて重要な役割を果たす。エストロゲンは主に2種類のエストロゲン受容体、すなわちエストロゲン受容体 α とエストロゲン受容体 β を介してその作用を発揮する。これらの受容体それぞれの役割は大きく異なり、エストロゲン受容体 α が生殖機能や摂食、活動性などに関与するのに対して、エストロゲン受容体 β はそれらにはほとんど寄与しない (Weiser et al., 2008)。エストロゲン受容体 β の機能に関しては未だ不明な点が多いが、近年の研究から、不安情動性やストレス応答などへの関与が示唆されている (Lund et al., 2006; Weiser et al., 2008; Weiser et al., 2009)。

加齢によりエストロゲン分泌能は低下し、その作用も変化する (Chakraborty and Gore, 2004)。また、血中・組織中のエストロゲン濃度の低下は受容体発現量にも影響する。雌ラットにおいては、エストロゲン受容体 β は生殖機能に関与する脳部位で (Wise and Parsons, 1984) 一方エストロゲン受容体 α は海馬や大脳皮質などで (Yamaguchi and Yuri, 2007) 加齢により受容体発現が減少している。これらの結果は、それぞれの受容体サブタイプの機能とも関連していることから、高齢期のエストロゲン受容体発現量の減少がエストロゲン作用の加齢変化の一因であると考えられる (Chakraborty and Gore, 2004)。

高齢期エストロゲン作用に関する研究は、更年期障害との関連から、その多くが高齢女性や雌の加齢モデル動物をターゲットとしている。しかし、高齢雄ラットについて、エストロゲン作用の変化 (Lamberts et al., 1997) や血中エストロゲン濃度の低下 (Wu et al., 2009) が報告されていることから、雌のみならず雄においても、エストロゲンの作用が加齢に従い変化している可能性が示唆される。我々はこれまでに、雌ラットのエストロゲン受容体 β mRNAの全脳での発現解析を行い、加齢による発現変化について報告している (Yamaguchi and Yuri, 2007)。さらに最近、雄ラットにおける加齢の影響を検討した結果、老齢雄ラット脳では、雌と同様に海馬や大脳皮質においてエストロゲン受容体 β 発現量が減少したのに加えて、青斑核や黒質など、雌では加齢変化がみられなかった部位においても減少が認められた (Yamaguchi and Yuri, 2012)。

ストレス応答におけるエストロゲンの役割として、ストレスにより増加したエストロゲンが、コルチコトロピン放出因子やオキシトシン、ノルアドレナリンなどのストレス関連因子やセロトニンなどの不安関連因子の産生・分泌・遊離を調節していることが、成体期のストレスモデル動物を用いた研究から明らかにされつつある (Lunga and Herbert, 2004; Curtis et al., 2006; Hara et al., 2008)。高齢雄ラットにおいて、黒質緻密帯、縫線核や青斑核などの神経伝達物質産生部位でのエストロゲン受容体 β 発現低下を示した我々のデータ (Yamaguchi and Yuri, 2012) から、雄ではエストロゲン受容体 β を介したストレス応答の調節機構が加齢により変化していることが推測される。加えて、加齢によるエストロゲン受容体 β 発現への影響には性差がある (Yamaguchi and Yuri, 2007; Yamaguchi and Yuri, 2012) ことは、高齢期のストレス反応における性差の神経基盤の一端である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、加齢が脳内ストレス関連因子に及ぼす影響およびその性差について明らかにすることを目的とした。また、若齢期のストレス経験の有無が高齢期ストレス応答にどのような影響を及ぼすかについても、併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物

雌雄の Wistar/ST ラットを用いた。実験開始時の週齢は、若齢群で7週齢、老齢群で20か月齢であった。

老齢期ストレス応答におけるエストロゲン受容体 β の関与について検討するため、若齢および老齢の各1群のみ、ストレス負荷の1時間前にエストロゲン受容体 β 遮断薬 (PHTPP) を腹腔内投与した。

また、若齢期のストレス経験が高齢期のストレス応答に及ぼす影響を調べるため、若齢期に12日間の拘束ストレス負荷し、高齢期に再度拘束ストレスを負荷する群を設けた。

(2) 拘束ストレス

ストレス群 [RS(+)] のラットに対しては、市販のラット保定用チューブを用いて、拘束ストレスを負荷した。1日1時間の拘束ストレス負荷を5日間連続で行った。最終実験日は、1時間の拘束ストレス負荷の終了直後に、ペントバルビタール麻酔下で4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行い、脳を摘出した。

コントロール群 [RS(-)] のラットは、通常の飼育環境下で飼育された。最終実験日にラットをホームケージから出し、麻酔下で灌流固定を行い、脳を摘出した。

(3) 免疫組織化学染色

前頭断凍結切片を作製した後、セロトニンニューロンのマーカーとしてトリプトファン水酸化酵素 (TPH) に対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。背側縫線核の腹側部 (DRD)、腹側部 (DRV) および外側部 (DRL) の陽性細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) 拘束ストレスによる TPH 陽性細胞数の変化に及ぼす加齢の影響

拘束ストレスを負荷しないコントロール群では、計測を行った背側縫線核の全ての部位において、老齡雄群の TPH 陽性細胞数が、若齡雄群と比較して多かった。

ストレス負荷による TPH 陽性細胞数の変化をみると、若齡雄群では、背側縫線核の全ての部位において、ストレス負荷により TPH 陽性細胞数が著しく増加した。一方、老齡雄群では、腹側部でのみストレス負荷による TPH 陽性細胞数の増加がみられたものの、背側部および外側部では変化は認められなかった (Fig. 1)。

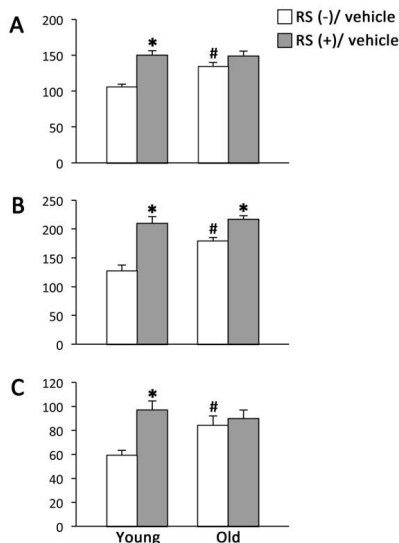


Fig. 1. 拘束ストレスによる TPH 陽性細胞数の変化に及ぼす加齢の影響 (A, DRD; B, DRV; C, DRL)

(2) ストレス負荷後の TPH 陽性細胞数に及ぼすエストロゲン受容体 遮断薬の影響

ストレスを負荷した若齡雄群および老齡雄群の背側縫線核の TPH 発現に対するエストロゲン受容体 の関与を調べた。

ストレス負荷後の TPH 陽性細胞数について、若齡雄群と老齡雄群の間で差は認められなかった。

ストレス負荷前にエストロゲン受容体 遮断薬を投与した結果、若齡雄群では、腹側部においてのみ TPH 陽性細胞数が減少し、背側部および外側部では変化しなかった。老齡雄群では、すべての部位において、エストロゲン受容体 遮断薬投与により TPH 陽性細胞数が減少した (Fig. 2)。

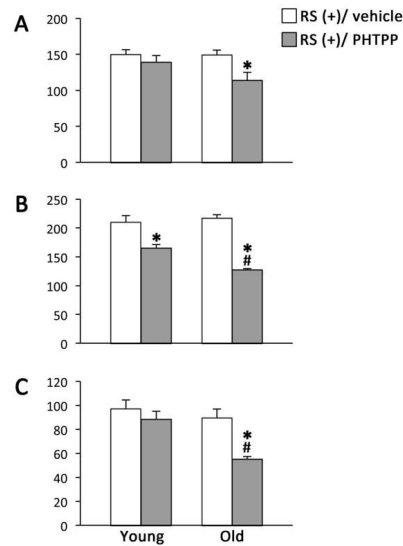


Fig. 2. ストレス負荷後の TPH 陽性細胞数に及ぼすエストロゲン受容体 遮断薬の影響 (A, DRD; B, DRV; C, DRL)

(3) 高齡期のストレスによる TPH 陽性細胞数の変化に対して若齡期ストレス経験が及ぼす影響

若齡期および老齡期ともに拘束ストレスを負荷しない群 [RS(-), RS(-)]、老齡期にのみストレスを負荷した群 [RS(-), RS(+)] および若齡期と老齡期の両方でストレスを負荷した群 [RS(+), RS(+)] について、雄の背側縫線核での TPH 陽性細胞数を比較した。その結果、背側部においてのみ、若齡期と老齡期の両方でストレスを負荷した群で、老齡期にのみストレスを負荷した群より、TPH 陽性細胞数の増加が認められた (Fig. 3)。

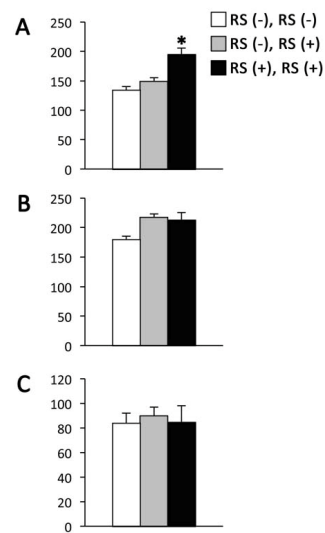


Fig. 3. 若齡期のストレス経験が高齡期のストレスによる TPH 陽性細胞数の変化に及ぼす影響 (A, DRD; B, DRV; C, DRL)

(4) 拘束ストレスによる TPH 陽性細胞数の変化における性差

高齢期の脳内ストレス応答における性差を明らかにするため、高齢期の雌雄のラットそれぞれについて、ストレス負荷による TPH 陽性細胞数の変化を調べた。

拘束ストレスを負荷しないコントロール群では、背側縫線核の全ての部位の TPH 陽性細胞数は、老齢雄群と老齢雌群の間に差は認められなかった。

ストレス負荷による TPH 陽性細胞数の変化をみると、老齢雄群では腹側部でのみ TPH 陽性細胞数が増加したのに対して、老齢雌群では、背側部および腹側部においてストレス負荷による TPH 陽性細胞数の減少が認められた (Fig. 4)。

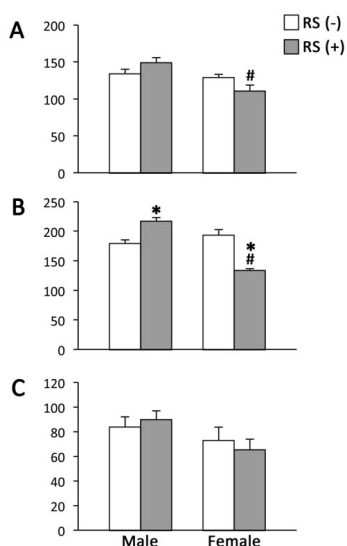


Fig. 4. 拘束ストレスによる TPH 陽性細胞数の変化における性差 (A, DRD; B, DRV; C, DRL)

(5) 結論

本研究では、加齢が脳内ストレス関連因子に及ぼす影響およびその性差を明らかにするために、高齢期のラットを用いて、拘束ストレス負荷による脳内ストレス関連因子の発現変化について検討した。

本研究の結果から、若齢雄ラットと比較して、ストレス負荷によるセロトニンの発現誘導が高齢ラットで変化すること、また、その変化にはエストロゲン受容体が関与することが示された。さらに、高齢期のストレス負荷によるセロトニンニューロンの発現変化には性差があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Naoko Yamaguchi, Kazunari Yuri. Estrogen-dependent changes in estrogen receptor- mRNA expression in middle-aged female rat brain. Brain

Research. 査読有 . 2014 . 1543 . 49-57 . DOI:10.1016/j.brainres.2013.11.010.

〔学会発表〕(計 2 件)

Naoko Yamaguchi, Shoshiro Okada, Kazunari Yuri. Effects of aging on stress-related changes in the expression of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe. 第 88 回日本薬理学会年会 . 2015 年 3 月 20 日 . 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

Yamaguchi N, Yuri K. Effect of aging on estrogen-dependent changes in estrogen receptor- mRNA expression in female rat brain. 第 37 回日本神経科学大会 . 2014 年 9 月 12 日 . パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_antm1/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由利 和也 (YURI, Kazunari)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号: 10220534

(2) 研究分担者

山口 奈緒子 (YAMAGUCHI, Naoko)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50380324