

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：42674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700714

研究課題名(和文) 成長期の運動はエピジェネティックな遺伝子制御で成熟期のうつ様行動を予防するか否か

研究課題名(英文) Whether or not exercise in the juvenile period prevents depression-like behaviour in the maturation period via epigenetic gene regulation

研究代表者

中島 早苗 (NAKAJIMA, SANAE)

共立女子短期大学・文科・講師

研究者番号：60535459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：成長期に定期的な運動を行ったマウスと全く運動を行わなかったマウスに対して、成熟期に心理的ストレスを負荷して、成長期の定期的な運動がもたらす抗うつ効果の有無について調べた。その結果、うつ様行動を判定するための行動試験および嗜好性試験において成長期のうつ様行動を緩和させる可能性が示唆された。しかし海馬の神経新生は各群において有意な変化はみられず、エピジェネティックな変化の有無については、方法論の確立に時間を有し、比較検討するまでの段階に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The antidepressant effect of regular exercise in the juvenile period were examined with the mice had not done any exercises during the growing season and the mice had done regular exercise in the juvenile period, by giving them a psychological stress during the period of maturity. From the result of behavioral experiments, which was to determine the behavioral changes during depression and acceptability experiments, the possibility of regular exercise in the juvenile period that can ease behavioral changes during depression was indicated. However, no significant change in neurogenesis of the hippocampal was observed from each group. It requires more time to establish the methodology, the research was not at the stage of comparative investigation whether there was any epigenetic mutation or not.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康スポーツ科学

キーワード：運動 ストレス 成長期

1. 研究開始当初の背景

現代社会はストレス社会と言われ、ストレスが大きな原因となるうつ病を含む精神疾患患者の増加が問題となっている。そして、ストレス社会の影響は大人だけでなく、成長期の子ども達にも影響し、気分障害の子どもが増えている。一方、現代の子ども達は屋外で遊ぶ機会が減り、遊びを通じた身体活動の減少は、本来ストレスを解消する有効な手段であった身体活動そのものが減少している様子がうかがえる。

うつ病患者の増加は深刻な社会問題となっているが、うつ病の生物学的な発症原因は未だ解明されない。うつ病の発症に大きな影響を与える要因として成長期の生活環境がある。先行研究には、生後間もなく仔ラットを毎日数時間、一定期間、母ラットから隔離すると成長後の海馬のシナプス数が減少し (Anderson et al, 2004) 成長後にストレス負荷をした際のうつ様行動の発症頻度が増加する (Revine et al, 2011) という報告がある。そして、DNA 解析によりうつ病発症の原因遺伝子が見つかっていないことと合わせて、うつ病の発症には後天的な環境因子の影響が大きいと考えられている。後天的な環境要因の影響とうつ病発症の関係を調べるのに有効な手法としてエピジェネティック研究がある。

エピジェネティック研究は、癌、代謝疾患、精神疾患など様々な疾患の発症原因の解明や治療法の開発で数多く行われている。一般的に DNA やヒストンのメチル化は遺伝子発現を抑制し、ヒストンのアセチル化は遺伝子発現を促進させる。また DNA のメチル化は安定した修飾であるため種々の疾患の発症と深く関係すると考えられている。特に成長期のストレスと DNA のメチル化に関しては、幼児期に虐待されたマウスでは神経細胞の生存やシナプスの発達を促進する脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が増加して、成長後の BDNF 遺伝子の発現が低下する (Roth et al, 2009) 等の報告がされている。

発達早期のストレスは、エピジェネティックな変化をもたらす、その影響が成長後も持続して成長後のストレス脆弱性をもたらす、ストレス由来のうつ病を発症させる原因となることが考えられる。

2. 研究の目的

背景に述べた予測をもとに、本研究では成長期の習慣的な運動が成熟期に曝されるストレスに対してうつ様行動を予防できるか否かについて検討した。

実験 1 では、成長期 (1.5~2.5 ヶ月齢) に定期的に運動を行ったマウスと全く運動を行わなかったマウスの成熟期 (6 ヶ月齢) に心理的なストレスを負荷し、それによって生ずるうつ様行動を調べるために行動試験を

実施することで、幼若期の運動習慣の有無が抗うつ効果をもたらすか否かについて検討した。また併せて、脳の海馬領域での神経新生の差異を調べた。

実験 2 では、成長期のマウスに実験 1 と同様に習慣的な運動トレーニングを負荷し、運動トレーニング前、運動トレーニング終了直後、運動トレーニング終了 2 ヶ月後にストレス負荷後の海馬を採取して、習慣的な運動とトレーニングにより海馬のエピジェネティックな変化が起こっているか、またそれが成長期の運動後およびストレス負荷後に維持されているか否かについて調べた。

3. 研究の方法

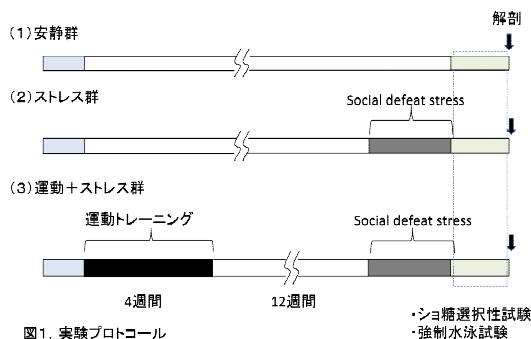
実験 1

離乳後の 5 週齢の雄 C57/BL/6 マウスを無作為に (1) 安静群、(2) ストレス群、(3) 運動 + ストレス群の 3 群に分けた (図 1)。実験開始前に全てのマウスに小動物用トレッドミルを用いた走行運動 (トレッドミル速度 10m/分、10 分/日) を 5 日間行わせてトレッドミル走に慣らした。その後、運動 + ストレス群のみにトレッドミル速度 15m/分で 60 分間のトレッドミル走を週 3 回のペースで、4 週間継続して運動トレーニングを行わせた。継続的な運動トレーニング終了後、およそ 3 ヶ月間は通常飼育をして、成長期 ~ 成熟期にあたる時期 (24~26 週齢) に social defeat stress (社会的挫折ストレス) を 14 日間負荷した。

今回の実験で用いた social defeat stress は Berton ら (2006) により人間社会の対人的ストレスを模倣する目的で考案されたストレス負荷方法で、実験動物にうつ様行動を引き起こさせるために用いられている。即ち、小さな穴の空いた仕切りで 2 分割されたケージの一方に被検マウスである C57/BL/6 マウスを、もう一方に攻撃性の強い ICR マウスを入れて飼育し、C57/BL/6 マウスは 1 日に 10 分間だけ ICR マウスの居住区に入れられて身体的な攻撃を受ける。その後、C57/BL/6 マウスは自分の居住区に戻されるが、穴の空いた仕切り越しに攻撃的なマウスの存在を視覚的および嗅覚的に感じながら生活することにより堪え間なくストレスを受けることになる。このようなストレスを 14 日間継続的に負荷した。

なお、ストレス開始前に神経新生の差異を調べるために 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与した。また social defeat stress を 14 日間負荷した後、うつ様行動を判定するための強制水泳試験とショ糖選択性試験、不安様行動を調べるためのオープンフィールド試験を全ての群のマウスに対して行った。これらの試験を終了した翌日に、麻酔下で心臓から生理食塩水を灌流して脱血し、解剖して脳を採取した。右脳はパラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて固定した後、マイクロスライサーにより脳の切片を作成して、

抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織染色を行い、海馬での神経新生の測定に用いた。左脳は液体窒素で凍結して-80 で保存した。



実験 2

5 週齢の雄 C57/BL/6 マウスを無作為に (1) 安静群、(2) 運動トレーニング終了 + 飼育なし群、(3) 運動トレーニング + 3 ヶ月飼育群 (4) 運動トレーニング + ストレス負荷群 (5) ストレス群の 5 群に分けた。実験開始前に全てのマウスを実験 1 と同じ方法にてトレッドミル走に慣らさせた。その後、(2) 運動トレーニング終了 + 飼育なし群、(3) 運動トレーニング + 3 ヶ月飼育群、(4) 運動トレーニング + ストレス負荷群のそれぞれの群のマウスには、トレッドミル速度 15m/分で 60 分間のトレッドミル走による運動トレーニングを週 3 回のペースで 4 週間行わせた。(2) 運動トレーニング終了 + 飼育なし群のマウスは運動トレーニング終了時点、(3) 運動トレーニング + 3 ヶ月飼育群は運動後およそ 3 ヶ月後に、(4) 運動トレーニング + ストレス負荷群はストレス負荷の終了後に脳を採取した。(1) 安静群は運動負荷を行わずに脳を採取した。

脳のサンプルは、実験 1 と同様の方法で採取し、-80 で凍結保存した。その後、採取したサンプルから BDNF mRNA を定量した。

さらに採取した脳サンプルの一部から核を抽出し、電気泳動とウェスタンブロットにかけた後、アセチル化ヒストン抗体を用いてアセチル化ヒストン量を定量する。さらに DNA を抽出してクロマチン免疫沈降法によりアセチル化ヒストンに結合した BDNF プロモーター量を定量した。また、抽出した DNA を methylation-specific PCR (MSP) 法により BDNF のプロモーター領域の DNA のメチル化を測定した。

4. 研究成果

実験 1

脳の海馬領域での神経新生を調べるために抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織染色を行ったが、すべての群において BrdU 陽性細胞の有意な差異はみられなかった。

14 日間の social defeat stress 負荷後に実施した強制水泳試験は、安静群と比較してストレス群においてうつ様行動を示す無動

作時間が増幅し、有意に高値を示した(図 2)。また運動 + ストレス群では安静群と比較して有意な変化はみられなかった。

うつ様行動を判定するためのショ糖選択性試験は、1 日目から 3 日目までは、全ての群においても有意な変化はみられなかった。しかし 4 日目では、安静群と比較してストレス群において、ショ糖水摂取率が有意に低値を示し、無感性状態が観察された。また安静群と比較して運動 + ストレス群においては、有意差がみられなかった。

不安様行動を調べるためのオープンフィールド試験は、全ての群において有意な差はみられなかった。

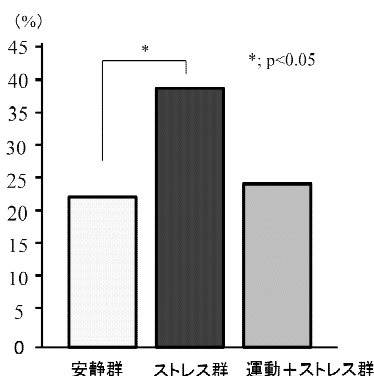


図 2. 強制水泳試験による無動作時間

実験 2

脳の海馬の BDNF mRNA の発現量は、安静群と比較して、ストレス群では有意に低値を示したが、ストレス + 運動群では有意な変化はみられなかった。他の群間では、有意な変化はみられなかった。

またヒストンアセチル化の定量については、ストレス負荷後にタイムコースで解剖したマウスの脳サンプルを用いて、ヒストンアセチル化の定量値を調べたところ、ストレス直後の解剖から 1 時間後で最も高い数値が観察された。その後、短時間のうちに安静群と同レベルの数値を示した。よって、ストレス負荷から 24 時間後に解剖している本研究の実験プロトコルでは、現時点ではヒストンアセチル化を定量することは難しいことが予測された。

これらの結果より、成長期の習慣的な運動は、成熟期に曝される精神的なストレスにより惹起しうるうつ様行動を緩和させる可能性を示唆した。しかし、エピジェネティックな変化の有無については、方法論の確立に時間を有し、比較検討するまでに至らなかった。今後さらに研究の継続が必要であろう。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 早苗 (NAKAJIMA SANAE)

共立女子短期大学・文科・講師

研究者番号：60535459