

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460901

研究課題名(和文) ストレス脆弱性の発生機構の解明 思春期のストレス経験が及ぼす影響

研究課題名(英文) Neural mechanism underlying stress vulnerability: the long-lasting effects of pubertal stress experiences on stress responses in adulthood

研究代表者

山口 奈緒子 (YAMAGUCHI, Naoko)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：50380324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 発達期のストレス経験は、ストレス直後のみならず成長後まで長期にわたって影響を及ぼし、青年期・成人期以降の様々な疾患の発症契機の一因となりうる。しかし、その生物学的・神経学的基盤の詳細はほとんど分かっていない。

本研究では、思春期ストレス経験が成体期の脳内ストレス応答に及ぼす影響について明らかにするため、思春期に該当する6週齢の雄ラットに拘束ストレスを負荷し、成体期ストレス負荷後の脳内ストレス関連因子の発現を解析した。その結果、思春期でのストレス経験は、成体期のストレス負荷後のチロシン水酸化酵素の発現を変化させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： The HPA axis in neonatal animals shows lower reactivity, and then matures during puberty. It has been known that adverse experiences in early life including puberty cause long-lasting behavioral and psychological effects, resulting in changes in emotional function and the stress response in adulthood. However, little is known about the neural mechanisms underlying such long-lasting effects.

In this study, to elucidate the effects of repeated restraint stress during puberty on stress responses in the brain of adult rats, we examined the expression levels of several stress-related factors such as tryptophan hydroxylase (TPH; a marker of serotonergic neurons), oxytocin and corticotropin-releasing factors using pubertal male rats. Our results showed that pubertal stress experience affects stress-induced expression of TPH in the dorsal raphe nucleus in adulthood. These suggest that changes in serotonergic system caused by pubertal stress experience may be related to long-lasting effects.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ストレス コルチコステロン セロトニン 思春期

## 1. 研究開始当初の背景

幼少期のネガティブな経験が成長後の情動性や神経精神病理に大きな影響を及ぼすことは、現象的に広く知られている。たとえば幼少期に受けた過剰なストレスは、青年期・成人期以降のうつ病や統合失調症、不安障害などの様々な疾患の発症契機の一因と考えられている。適度なストレスであればストレス適応性の発達に寄与するものの、過剰なストレス経験は青年期以降のストレス不適応やさらにはストレス脆弱性をもたらさう。近年、動物モデルを用いた発達期ストレス経験に関する研究が増えており、成体期への長期的影響についても注目されている。たとえば、母仔分離ストレスや離乳後のストレス負荷による、青年期や成体期での不安情動性の亢進や社会行動の変化が報告されている。これらの結果は、ヒトと同様にマウスやラットにおいても、幼若期のストレス経験が成長後の情動性・社会性に影響を及ぼすことを示している。このように、発達期のストレス経験と成長後のストレス脆弱性の間に強い相関が示されているにもかかわらず、その生物学的・神経学的基盤の詳細はほとんど分かっていない。

発達期のなかでも特に思春期は、性腺ホルモンの著しい増加をはじめとする神経内分泌系の多様な変化によって特徴づけられる。思春期は、ストレス応答の要である視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA 系) が機能発達・成熟する時期でもあり、思春期を境にストレス反応性が大きく変化する。思春期前には既に、正常状態のストレスホルモン(副腎皮質刺激ホルモン[ACTH]やコルチコステロン)の血中レベルは成体と同程度であるものの、ストレス下では、その反応性や抑制システムが成体と異なることが報告されている。思春期後の青年期にはストレス応答が成体と同様に働くことから、思春期は成体期レベルのストレス応答システムが構築される時期であると考えられる。

我々はこれまで、ストレス応答における脳内ストレス関連因子の調節メカニズムについて一連の研究を進めてきた。その中で、加齢によりセロトニンやオキシトシンなどのストレス応答が変化すること、また、これらの変化にエストロゲン受容体が関与することを明らかにしてきた。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セロトニンやオキシトシン、コルチコトリピン放出因子など種々のストレス関連因子の産生・分泌・遊離を調節することが、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。以上のことから、これらの脳内ストレス関連因子が思春期のストレス応答にも関与することが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、HPA 系が機能成熟する思春期におけるストレス経験が成体期の脳内ストレス応答に及ぼす影響について明らかにすることを目的とし、ラットを用いて脳内ストレス関連因子の発現を解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

Wistar/ST 雄ラットを用いた。

思春期のストレス経験が成体期のストレス応答に及ぼす影響を調べるため、思春期に該当する6週齢に達した時点でストレス負荷実験を開始した。対照として思春期にストレスを負荷しない群[RS(-)]と、ストレス群として思春期にストレスを負荷する群[RS(+)]を設定した。さらに、思春期ストレス応答におけるエストロゲン受容体の関与について検討するため、思春期でのストレス負荷実験において、ストレス負荷の1時間前にエストロゲン受容体遮断薬(PHTPP)を腹腔内投与する1群を設けた。PHTPP 投与群以外には、対照として vehicle を腹腔内投与した。

思春期でのストレス負荷実験終了後は通常飼育に戻し、成体期(10週齢)で再度ストレス負荷実験を行った。

### (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。思春期および成体期ともに、1日1時間の拘束ストレス負荷を5日間連続で行った。成体期のストレス負荷最終日、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) ELISA

ストレス負荷後に採取した血液サンプルから、市販のキットを用いて、ELISA 法によりコルチコステロンおよびエストロゲンの血中濃度を測定した。

### (4) 免疫組織化学染色

前頭凍結切片(30 μm)を作製した後、としてトリプトファン水酸化酵素(TPH: セロトニンニューロンのマーカー)、オキシトシン、およびコルチコトリピン放出因子のそれぞれに対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。視床下部室傍核や背側縫線核の背側部(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血中コルチコステロン濃度変動における思春期ストレス経験の影響

思春期にストレス経験のない群 [P-RS(-)] において、成体期のストレス負荷により、血中コルチコステロン濃度は上昇した (Fig. 1)。

また、成体期に拘束ストレスを負荷した群 [A-RS(+)] において、思春期に拘束ストレスを負荷した群 [P-RS(+)] では負荷しない群 [P-RS(-)] と比較して、血中コルチコステロン濃度はより低値であった。

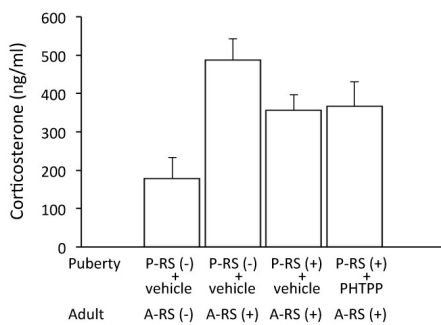


Fig. 1. 血中コルチコステロン濃度

##### (2) 成体期での拘束ストレス負荷による TPH 陽性細胞数の変化

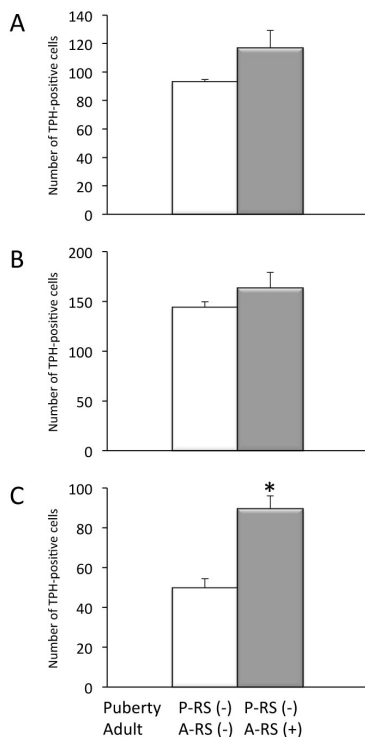


Fig. 2. 成体期での拘束ストレス負荷による TPH 陽性細胞数の変化 (A, DRD; B, DRV; C, DRL)

思春期にストレス経験のない群 [P-RS(-)] において、成体期のストレス負荷により、背側縫線核外側部 (DRL) の TPH 陽性細胞数が有意に増加した (Fig. 2)。背側縫線核背側部 (DRD) および腹側部 (DRV) では、変化は見られなかった。

##### (3) 成体期での拘束ストレス負荷後の TPH 陽性細胞数に及ぼす思春期ストレス経験の影響

成体期に拘束ストレスを負荷した群 [A-RS(+)] において、思春期のストレス経験の影響を検討した。

思春期に拘束ストレスを負荷した群 [P-RS(+)/A-RS(+)] は思春期にストレス経験のない群 [P-RS(-)/A-RS(+)] と比較して、背側縫線核外側部 (DRL) の TPH 陽性細胞数が有意に減少した (Fig. 3)。背側縫線核背側部 (DRD) および腹側部 (DRV) では、変化は見られなかった。

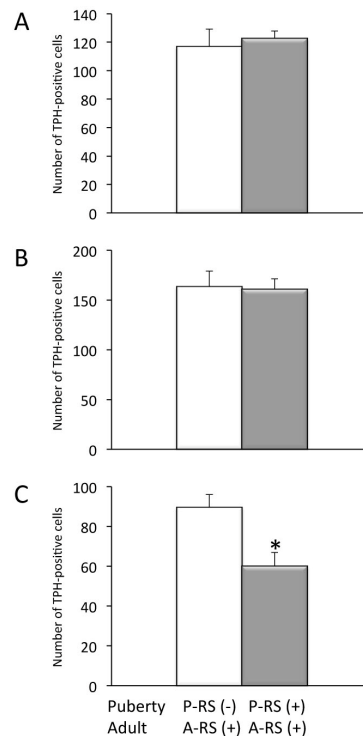


Fig. 3. 成体期での拘束ストレス負荷後の TPH 陽性細胞数に及ぼす思春期ストレス経験の影響

(A, DRD; B, DRV; C, DRL)

##### (4) 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

思春期および成体期の両方でストレスを負荷したラットを用いて、背側縫線核の TPH 発現に対するエストロゲン受容体 の影響を調べた。

計測を行った背側縫線核の全ての部位において、PHTPP 前投与による変化は認め

られなかった (Fig. 4)

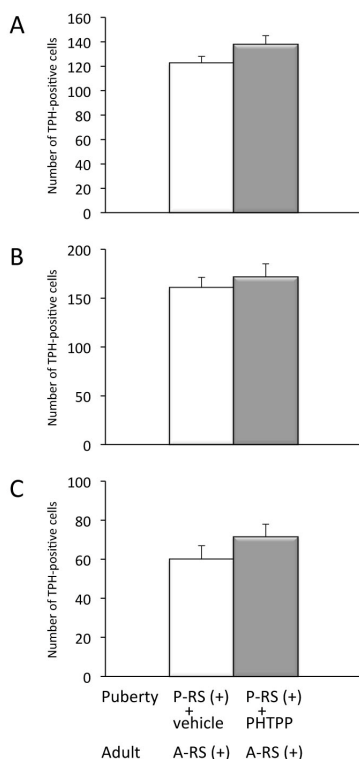


Fig. 4. ストレス負荷後の TPH 陽性細胞数に及ぼすエストロゲン受容体 遮断薬影響 (A, DRD; B, DRV; C, DRL)

#### (5) 結論

本研究では、思春期におけるストレス経験が成体期の脳内ストレス応答に及ぼす影響について明らかにするため、思春期に該当する6週齢のラットを用いて、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。

本研究において、思春期でのストレス経験は、成体期のストレス負荷後の縫線核セロトニンニューロンの発現を変化させることが明らかとなった。これらの結果は、思春期ストレス経験により引き起こされるセロトニン神経系の変化が成体期まで長期にわたって持続する可能性を示唆する。

#### 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 3 件)

Yamaguchi N, Nakajima N, Okada S, Yuri K. Effects of aging on stress-related responses of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of male rats. *Neurobiology of Stress*. 査読有 .2016 . 3 . 43-51 .

DOI:10.1016/j.ynstr.2016.01.002.  
Ando K, Kondo F, Yamaguchi N, Tachi M, Fukayama M, Yoshikawa K, Goshio M, Fujiwara Y, Okada. Centrally administered isoproterenol induces sympathetic outflow via brain prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated mechanisms in rats. *Autonomic Neuroscience*. 査読有 .2015 .1-7. DOI:10.1016/j.autneu.2014.12.002.  
Yamaguchi N, Yuri, K. 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 3 件)

山口奈緒子, 岡田尚志郎. ストレスによる視床下部室傍核オキトシンニューロンの発現変化に及ぼす加齢の影響と性差. 第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会. 2015年9月18-19日. 仙台市戦災復興記念館(宮城県・仙台市)

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.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/04.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 奈緒子 (YAMAGUCHI, Naoko)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50380324