

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871162

研究課題名（和文）社会的ストレスの環境要因がうつ病態の形成に与える影響についての基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research on the effects of environmental factors in social stress on the progression of depression

研究代表者

松田 芳樹（MATSUDA, Yoshiki）

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主任研究員

研究者番号：00409781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：社会的ストレスの環境要因がうつ病態の形成に与える影響を調べるため、社会的敗北ストレスを改変した新しいモデルを確立した。小型のSDラットと大型のBNラットを用いた社会的ストレスは、SDラットに接触回避行動とヒトのうつ病に類似した睡眠異常を引き起こした。イミプラミンは睡眠異常を有意に改善したが、回避行動に対しては一定数に無効であったため、このモデルは難治性うつ病を反映していると考えられた。ストレスに用いる系統の組み合わせを変えると被検ラットの接触行動は亢進したことから、同じストレスの負荷方法を用いても被検ラットがストレスを嫌忌情報と認識するか否かで、得られる行動学的表現型は異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したストレスモデルは、従来のモデルに比べて、うつ病様行動の指標とされる社会的回避行動を高率で誘発させることが可能であり、モデル研究においてこれまで報告されたことのない、長期持続型の睡眠異常を呈する。うつ病に伴う睡眠障害の病態は未だ不明な点が多く、さらに睡眠障害はうつ病のリスクファクターになり得るため、このモデルはこれらの諸問題を解決するための重要なツールになると考えられる。また、モデルへの試験薬剤の投与開始時期をストレス前やストレス期間中または終了後などに設定することで、予防薬や治療薬の選定試験を容易に行うことができるため、新しい薬剤のスクリーニングにおける有用性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated the effects of environmental factors in social stress on the progression of depression using a modified paradigm of repeated social defeat stress (RSDS) in rats. A novel RSDS using a combination of test SD and stressor BN rats caused social avoidance behavior and sleep abnormalities similar to sleep disturbances associated with human depression. Chronic imipramine treatment significantly improved sleep abnormalities, but partially ameliorated avoidance behaviors, with a certain number of non-responders. These findings suggest that this model may reflect one aspect of treatment-resistant depression. Interestingly, the test rats displayed enhanced contact behavior by changing the combination of strains used for RSDS. Therefore, the behavioral phenotype induced by RSDS can be determined depending on whether the test rat recognizes the stressor as an aversive partner.

研究分野：神経生理学

キーワード：社会的ストレス うつ病 ラット 社会的回避行動 睡眠障害 脳波 イミプラミン

1. 研究開始当初の背景

(1) 昨今、教育現場や職場における「いじめ」が社会問題化している。ある研究では、「いじめ」について、「1人または複数の人に対して、長期間にわたり継続的かつ反復的に、傷つけたり、虐げたりすること、あるいは、仲間外れにすることや孤立させることを目的とした敵対的行為」と定義している (Niedhammer et al., 2009)。「いじめ」を含め、社会的関係性によって生じる身体的・心理的ストレスは、うつ病を発症させる要因と考えられているが、社会的ストレスがうつ病の発症にどのように関与するのかについては未だ明らかになっていない。

(2) 大うつ病 (以下、うつ病) では、主症状として、抑うつ気分や興味・喜びの喪失、副症状として、摂食障害や睡眠障害などが認められる。ほぼ毎日にわたって「いじめ」に遭っている場合、睡眠障害の発症確率は顕著に上昇し、過去に敵対的行為を受けたことがある場合には、その経験のない場合に比べ高確率で睡眠障害を発症するとの報告もある (Niedhammer et al., 2009)。

(3) うつ病に伴う睡眠障害は、睡眠潜時 (寝付くまでの時間) が延長する入眠障害や、睡眠時間の短縮、早朝覚醒、中途覚醒、再入眠困難、浅眠・多夢傾向などの症状を特徴とする。これらの症状は、睡眠深度の異なるノンレム睡眠、レム睡眠の異常に伴って出現する。通常の睡眠過程では、始めにノンレム睡眠が出現し、一定時間が経過した後にレム睡眠が出現するが、うつ病では、ノンレム睡眠の出現後にレム睡眠が早期に出現するという、レム睡眠潜時の短縮が認められる。

(4) うつ病で併発する睡眠障害は、うつ病の身体的・行動学的側面からの障害とも考えられ、動物モデルを対象として解析することが可能である。社会的ストレスを用いたうつ病に関する研究はこれまで主にマウスを用いた研究が主流であった。特に近年では、うつ病の病態解明をターゲットとして、社会的敗北ストレスという、他個体との接触によるストレスを用いたマウスの研究が精力的に行われてきた。このストレスを受けたマウスは、他のマウスとの接触を避けるようになり、この回避行動は抗うつ薬で奏功することから、うつ病の行動学的評価に用いられてきた。一方、ラットを用いた社会的敗北ストレスに関する研究はマウスでの研究に比べて報告数が少ない。しかしながら、ラットは罫に捕らわれた他のラットを助けるなどの、比較的高度な向社会性行動をとることが報告されており (Ben-Ami Bartal et al., 2011)、マウスに比べて社会的ストレスに対する感受性が大きく、より繊細である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの「いじめ」を背景とした、他者との継続的な接触による社会心理的ストレスの環境的側面を想定し、できるだけ類似したストレス環境をラットに適用することで生じる行動学的、生理学的な変化を詳細に解析し、うつ病態の形成に対する社会心理的ストレスの影響について調査した。

3. 研究の方法

隔離環境下のラットに対して、体の大きなラットと継続・反復して身体的な接触を受け、その後、直接的な接触はできないが、同じ空間のなかで同居を経験させる、という一連の社会的ストレスを負荷した場合、(1)被検ラットやストレスラットとして用いる系統の組み合わせの違いがストレスで生じる行動学的表現型にどのような違いを生じさせるのか、またどの組み合わせがうつ様行動の指標とされる社会的回避行動を誘発するのか、(2)ヒトのうつ病で認められる体重減少や摂食障害、アンヘドニア (無快楽症) などに対応する、ラットの行動学的異常は見られるのか、(3)(1)で検討したストレスを受け、社会的回避行動を呈したラットにはうつ病に伴う睡眠障害に類似した異常が見られるのか、という点について検証を行った。

(1) ラットの社会的ストレスの方法論的検討

実験に使用するラットは個飼いで飼育とした。実験対象となる小型の被検ラットを、より身体が大きく活動性の高い大型のラットと10分間、身体的に接触させた (直接的接触)。その後、このペアを、所々に孔の空いた透明なしきり板で隔てられた飼育ケージ内にそれぞれ置いて、お互いの感覚情報が遮断されない環境下に24時間滞在させた (間接的接触)。この組み合わせを5日間継続して行った後、間接的接触のみを2日間設けた。この一連の工程を2クール実施することで、ストレス負荷期間を合計14日間とした。

ストレス負荷期間の終了後、社会的ストレスに対する行動学的評価を行った。オープンフィールド内にはストレスラットが入る箱を設置した。最初、被検ラットをオープンフィールド内で自由に行動させ、その軌跡や移動距離を記録した。次いで、設置された箱にストレスラット、または被検ラットと同系統のラット (ターゲットラット) を入れた条件にて、被検ラットを自由に行動させ、同様の計測を行った。その際、箱周辺領域内への侵入時間を計測し、ターゲットラットが存在するときの接触率を算出した。

(2) 異なる系統の組み合わせによる社会的ストレスの行動学的評価

(1)のストレス負荷方法を基準として、被検ラット、およびストレスラットとして使用するラットの週齢、系統がそれぞれ異なる組み

合わせの条件にて社会的ストレスの負荷を行い、社会的回避行動を誘発する適切な系統の組み合わせを選定した。

系統の組み合わせの選定後、ストレスの負荷期間を、単回あるいは14日間継続する条件で変動させ、社会的回避行動の有無について行動学的評価を行った。あわせて、経時的に体重、摂食行動、1%ショ糖摂取量などの各種計測を実施した。また、ストレス期間終了後より4週間にわたって抗うつ薬イミプラミン(20mg/kg/day)の慢性投与を行い、社会的回避行動に対する効果について検証した。

(3) 社会的ストレスによる睡眠覚醒リズムへの影響の検証

ノンレム睡眠やレム睡眠などの異なる睡眠深度における種々の睡眠パラメーターに対する社会的ストレスの影響について検証した。

被検ラットに対し、麻酔下にて皮質上にネジ電極を留置し、頸部に筋電図電極を埋め込む手術を実施した。

選定された系統の組み合わせによるストレス負荷の終了後、24時間の睡眠覚醒脳波を記録した。神経活動解析プログラム Spike2を用いて脳波のオフライン解析を実施し、睡眠ステージ判定を行った。睡眠ステージは、ノンレム睡眠、レム睡眠、覚醒の3段階とし、各睡眠ステージの出現時間や頻度、出現潜時について解析した。さらに、ストレス負荷終了後よりイミプラミンの慢性投与を行い、ストレス負荷後の各睡眠ステージのパラメーターに対する効果について検討した。

4. 研究成果

(1) 社会的ストレスの負荷に用いる、被検ラットおよびストレッサーラットの系統の組み合わせとして、被検ラットに6週齢のWistar(WI)ラット、ストレッサーに8週齢のWIラット、被検ラットに5週齢のSprague Dawley(SD)ラット、ストレッサーに8週齢のWIラット、被検ラットに8週齢のSDラット、ストレッサーに7ヶ月齢のBrown Norway(BN)ラット、の3つのペアで検討を行った。

組み合わせ₁では、ストレス負荷後の接触行動試験において、接触率は $149 \pm 13.6\%$ となり、オープンフィールドに設置された箱内のターゲットラット(ストレッサーと同系統のラット)に対する接触行動の亢進が認められた。組み合わせ₂の場合では、接触率は $137.9 \pm 8.5\%$ となり、組み合わせ₁の結果と同様に接触行動は促進した。組み合わせ₃では接触率が $6.2 \pm 5.1\%$ となり、ターゲットラットに対して、有意な接触回避行動が誘発された。これらの結果を総合的に判断し、本研究においては、組み合わせ₃を適切なペアとして選定した。以上の結果は、同じストレス負荷の工程を用いたとしても、ストレス負荷

に用いる系統の組み合わせなどの条件が異なれば、結果として生じる社会的行動のパターンは異なることが明らかとなり、それに付随する生体変化にも違いが生じる可能性が示唆された。直接的接触の際などにラット間で比較的頻繁に社会的接触がなされ、視覚的にストレスが負荷されていると認識されるケースにおいても、被検ラットがそれを嫌忌情報と捉えているか否かにより、ストレスに対する社会的行動のパターンは異なる可能性がある。

(2) ストレス負荷の回数を変動させた場合の社会的回避行動に対する影響を確認した。ストレス負荷が単回(直接的接触(10分間)+間接的接触(24時間)の組み合わせを1回負荷)の場合、ストレス負荷後の接触行動試験におけるターゲットラットへの接触率は平均 $12.7 \pm 4.5\%$ となり、単回のみでのストレス負荷でも回避行動をとる個体が出現した。一方、ストレスを14日間継続して負荷した場合には、ストレス直後は $6.2 \pm 2.5\%$ 、ストレス後1週間では $7.9 \pm 3.4\%$ 、ストレス後1ヶ月では $5.2 \pm 2.9\%$ となり、持続的な社会的回避行動が誘発された。単回のストレス負荷に比べ、継続的なストレスの負荷は、より強い接触回避行動を示すことが分かった。接触回避行動はストレッサーラットに対してのみでなく、被検ラットと同系統のラットに対しても認められ、行動の汎化が生じていた。

また、継続的にストレスを負荷した場合、ストレス負荷の初回より体重は有意な減少を示し、その影響はストレス負荷後から約20日間持続した。摂食行動は体重と同様にストレス負荷初回より顕著に減少し、ストレス負荷期間中は対照群に比して有意に低下していた。また、ショ糖の摂取量はストレス負荷期間中には個体ごとに個々の変動を示すが、ストレス終了後1ヶ月では有意な低下を示した。

さらに、接触回避行動に対する抗うつ薬の効果を検証した。ストレス負荷終了後より4週間にわたり、イミプラミンの腹腔内投与を行うと、ストレス負荷後1ヶ月における社会的回避行動は総じて有意な改善を示したものの、投与された個体の約30~40%は改善を示さなかった。したがって、この動物モデルはヒトの難治性うつ病の一側面を反映したモデルとなり得る可能性が示唆された。

(3) ストレス負荷後に睡眠覚醒脳波の24時間記録を実施し、各睡眠ステージにおける種々の睡眠パラメーターの変動について解析した。その結果、ノンレム睡眠の総出現時間は対照群に比べて有意に減少し、その出現潜時は延長する傾向を示した。一方、レム睡眠の総出現時間は対照群に比して有意に増加し、ノンレム睡眠の開始からレム睡眠が最初に出現するまでの潜時は有意に短縮した。また、各睡眠ステージとも出現と消失とを頻

回に繰り返す断片化が顕著であった。さらに、イミプラミンは各睡眠ステージの総出現時間の異常を有意に改善し、レム睡眠潜時の延長を有意に改善した。これらの結果から、本研究における社会的ストレスの負荷方法は、ヒトのうつ病に伴う睡眠障害に非常に類似した病態を誘発することが明らかとなった。これらの睡眠異常は、ストレス負荷の終了後、約1ヶ月の時点においても認められた。従来のストレスモデル研究において、このような長期持続型の睡眠異常を呈するモデルはこれまで報告されていない。

本研究により、うつ病様行動の指標とされる社会的回避行動と長期持続型の睡眠異常を呈するうつ病の社会的ストレスモデルを確立した。社会的ストレスが一過性ではなく、持続・反復するという環境要因が、うつ病態の形成に与える影響が大きいと考えられた。しかしながら、反復してストレスを暴露したとしても、組み合わせとのように、接触行動の亢進という、うつ病を反映しない表現型が確認されたことから、ストレスの反復自体が被験ラットにとって嫌忌情報として認識されることが重要であると考えられた。同じ社会的ストレスの負荷方法を用いても、系統の組み合わせなどの条件が異なれば、受けるストレスの意味合いが大きく異なり、得られる行動学的表現型も異なることから、ストレスによる影響を正確に判定するためには行動学的評価試験の実施が重要である。

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2件)

Y. Matsuda, N. Ozawa, T. Shinozaki, K. Wakabayashi, K. Suzuki, Y. Kawano, I. Ohtsu, Y. Tatebayashi. Ergothioneine, a metabolite of the gut bacterium *Lactobacillus reuteri*, protects against stress-induced sleep disturbances. *Translational Psychiatry*. 10(1):170, 2020, doi: 10.1038/s41398-020-0855-1
Y. Matsuda, N. Ozawa, T. Shinozaki, K. Aoki, N. Nihonmatsu-Kikuchi, T. Shinba, Y. Tatebayashi. Chronic antidepressant treatments rescue reduced REM sleep theta power in a rat social defeat stress model of depression. *bioRxiv*. 2020, doi: 10.1101/2020.03.21.001164

[学会発表](計5件)

松田芳樹, 小澤信幸, 篠崎たき子, 二本松(菊池)尚美, 青木和久, 渡邊萌, 楯林義孝. 社会的回避行動やレム睡眠異常を呈するうつ病の新しい社会心理的ストレスモデルの開発. 第41回日本生物学的精神医学会. 2019年6月23日, 新潟.
松田芳樹, 楯林義孝. 新しいラットうつ病

モデルの解析. 第6回サイコグリア研究会. 2019年5月25日, 岩手.

松田芳樹, 小澤信幸, 篠崎たき子, 二本松(菊池)尚美, 青木和久, 渡邊萌, 楯林義孝. 社会的回避行動や睡眠異常を呈するうつ病動物モデルの構築とその応用. TOBIRA第8回研究交流フォーラム. 2019年5月10日, 東京.

松田芳樹. 社会的ストレスにより接触回避行動や睡眠異常を呈するうつ病動物モデルの構築とその解析. 第4回TMEDフォーラム. 2019年3月13日, 東京.

松田芳樹. 社会心理的ストレスを用いた新しいうつ病モデル動物の開発とその応用-「治療」と「予防」の可能性を探る-. 株式会社サントリー・社内セミナー. 2016年4月14日, サントリーグローバルイノベーションセンター, 京都.

[産業財産権]

特許出願状況(計2件)

[特許査定]

名称:睡眠異常をきたすうつ病のモデル動物

発明者:松田芳樹, 篠崎たき子, 小澤信幸, 楯林義孝

権利者:公益財団法人東京都医学総合研究所

番号:特願 2015-010395・特開 2016-131556

出願年月日:平成27年1月22日

国内外の別: 国内

[特許公開]

名称:うつ病や急性ストレス性障害の診断バイオマーカー及び治療又は予防用組成物

発明者:楯林義孝, 篠崎たき子, 小澤信幸, 渡邊萌, 松田芳樹

権利者:公益財団法人東京都医学総合研究所

番号:特願 2015-248410・特開 2017-114855

出願年月日:平成27年12月21日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/affective.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 芳樹 (MATSUDA, Yoshiki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主任研究員

研究者番号: 00409781

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし