

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893207

研究課題名(和文)形態解析に基づく、PTSDモデル動物における不安増強機構の解明

研究課題名(英文)Action of CRH and pathological relevance in the brain of rat model of PTSD

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：60712891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：心的外傷後ストレス障害(PTSD)は不安の増大を伴って長期に症状が続くが、その分子基盤は明らかでない。本研究ではモデルラットを用いて、ストレスや情動に關与の深い脳内領域について、ホルモンCRHの発現動態を免疫組織化学や分子生物学的手法によりPTSDとの關与を検討した。その結果、扁桃体におけるCRHニューロン内での同ホルモンの増加や投射先のひとつである分界状床核での受容体遺伝子の発現上昇を受けて、CRHを介したホルモン受容の変化がモデル動物に見られる不安行動の増大の原因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a stress-related anxiety syndrome that develops after exposure to traumatic experience, but biological basis of the symptom is not known. Single prolonged stress (SPS) is an established animal model proposed for PTSD and mimics the pathophysiological and behavioral characteristics of PTSD. Using this model rats, we observed the expression change of corticotropin-releasing hormone (CRH) which is neurotransmitter involved in stress response and behavior. Immunohistochemical and molecular analyses revealed significant increases in expression of CRH in the central nucleus of the amygdala and its receptor in the bed nucleus of the stria terminalis of SPS rats. These results suggest that SPS paradigm alters stress-related factors in mammalian brains, and may provide the physiological and behavioral basis of PTSD.

研究分野：神経科学・神経解剖学

キーワード：PTSD コルチコトロピン放出ホルモン 扁桃体 エピジェネティクス 不安

1. 研究開始当初の背景

PTSD は、日常では経験し得ないような心的外傷体験 (トラウマ) に後発する精神疾患で、フラッシュバック等の症状が不安の増大を伴い長期に持続する。しかし分子から組織レベルに渡ってメカニズムは未だ不明な部分が多い。PTSD では副腎皮質からグルココルチコイド基礎分泌量が減少しネガティブフィードバックが亢進しているなど、内分泌環境の変化を起こしていることが示唆されている。この事実より研究代表者は、重度のストレス負荷後に脳内ホルモン分泌の変化が起こり、脳機能障害が引き起こされ情動異常につながると仮説を立てた。

2. 研究の目的

PTSD モデルラットを使用した先行研究から、不安反応の情動中枢である扁桃体にてコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) の発現増加を観察した。この結果に基づき本研究計画では、

- (1) 扁桃体中心核 (CeA) の CRH 発現変化は、いかなる細胞内現象によって引き起こされるか
- (2) CRH の発現を上昇させたニューロンはどの脳組織領域に投射し、どのような分泌変化を起こすか
- (3) CRH の発現上昇や分泌異常は、個体レベルで不安行動の増強に結びついているかについて調査し、ホルモン受容に根ざした PTSD 病症発現の分子機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデルラットの作出

SPS ラットは、薬理・行動学的な検証 (SSRI 投与による症状緩和や、十字高架迷路試験における不安行動の増加等) に加えて、唯一 PTSD のネガティブフィードバック亢進病態を内分泌学的に模した学際的にも認められたモデル動物である [Psychoendocrinol 22:443-53 (1997)]。8 週齢オスの SD ラットを用い、2 時間拘束ストレス・20 分強制水泳・15 分休息・ジエチルエーテル深麻酔の連続暴露 (SPS 負荷) 後、7 日の無接触期

においてこれを作製し、各種アッセイを行った。対照 (Cont) 群には SPS 負荷操作を省いたものを用いた。

(2) 各種アッセイ

CRH の発現レベルを変化させた細胞現象について、エピジェネティックな変化や遺伝子上流域で発現制御を行う DNA エLEMENT の機能に着目し、分子生物学的手法を主体に解析を行うことを予定した。発現変化を起こした扁桃体 CRH ニューロンの投射先をトレーサー法により追跡、同定する。さらに生化学的に分泌変化を観察し、組織細胞化学的に軸索末端の構造変化を解析する。観察対象となる領域に対しての阻害剤投与と不安行動試験を組み合わせることで解析を行い、細胞 - 組織個体レベルの網羅解析を通して PTSD 病態に対するホルモン CRH の相関を検討することとした。

4. 研究成果

安定したモデルラットの作出環境を得るための準備期間に時間を要したため、当初の計画に変更を加えて実験を行った。

(1) 関心領域として設定していた CeA、BNST 両領域に対しパンチアウト法を用いて組織採取と total RNA の抽出を行い、プローブとして SurePrint G3 Rat GE 8x60 Microarray (Agilent technology) を用いて二色法に基づいて DNA マイクロアレイを実施し、SPS および Cont 群間について遺伝子発現の比較解析を行った。その結果、CeA における CRH の遺伝子発現は有意な増加を示し (TABLE 参照) グルココルチコイド受容体の発現変動が見られなかったことと合わせて免疫組織学で観察された結果との一致を確認することが出来た。また、BNST におけるマイクロアレイ解析も同様に、先行研究結果を支持する結果を得る事が出来た。これに加え、両領域からの CRH 受容体の発現上昇も同時に観測しており、リガンド受容を介した CRH 系の情動異常への大きな関与が新たに示唆された。

発現変化の分子機構については、同解析からヒストン各種およびヒストンアセチル化酵素 HDAC や DNA メチル化酵素 DNMT の

発現変動は認めておらず、当初予測していたエピジェネティック変化との相関については現段階では不明である。対して、CREB5の発現上昇を CeA において認めたことから、DNA エlementを介した転写制御機構に異常がある可能性が示された。

TABLE. Microarray-based gene profiling between Control and SPS rats

Gene symbol	EnterzGene	raw value BNST			raw value CeA		
		Cont	SPS	fold (SPS/Cont)	Cont	SPS	fold (SPS/Cont)
Crh	81648	59.9	62.2	1.04	71.3	177	2.48
Crhr1	58959	5.1	12.6	2.35	13.8	32.1	2.33
Chrr2	64680	54.6	37.7	0.69	18.7	12.5	0.67
Chrbp	29625	550	543	0.99	547	570	1.04

(2) CeA における CRH 陽性細胞の投射先として不安反応に関連する BNST および LC を解析対象として計画していた。上記の結果を受けて、受容体の発現増加を示した BNST の重要性が高いと考えられる。精度の高いトレーサー実験を行うため電気泳動装置を使用したプロトコルに改良し、免疫組織化学法と合わせた形態解析が現在進行中である。

(3) 先述の実験結果に従い、異常行動の分子基盤をエピジェネティック変化に基づいて検討するより、DNA エlementを介した転写発現異常と不安行動との相関調査を優先し、今後も研究を展開していく。

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)

[学会発表](計 10 件)

谷田任司、松田賢一、橋本隆、山田俊児、河田光博,エストロゲン受容体 ER とエストロゲン関連受容体 ERR によるエストロゲンシグナルの共調節,日本行動神経内分泌研究会 第22回学術集会,2015.3.24, 神戸大学統合研究拠点コンベンションホール(兵庫県・神戸市)

堀井謹子、笹川誉世、橋本隆、西真弓,視床下部に新たに同定されたペリニューロナルネットワーク陽性細胞を含む領域について, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会第92回日本生理学会大会 合同大会, 2015.03.23. 神

戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

橋本隆、松田賢一、飯野哲、河田光博,PTSDモデルラットの脳内におけるストレス関連因子の発現変化, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会第92回日本生理学会大会 合同大会, 2015.03.22, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

谷田任司、松田賢一、橋本隆、山田俊児、河田光博,エストロゲン関連受容体 ERR によるエストロゲンシグナル調節機構, 第22回日本ステロイドホルモン学会,2014.11.3, 都道府県会館(東京都・千代田)

笹川誉世、林謹子、橋本隆、西真弓,Effect of early life stress on feeding behavior, 第37回日本神経科学大会,2014.9.13,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

橋本隆、林謹子、笹川誉世、西真弓,The effect of maternal separation in the nucleus accumbens and the bed nucleus of stria terminalis of the adult mouse: gene profiles after early life stress. 第37回日本神経科学大会,2014.9.13,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

谷田任司、松田賢一、橋本隆、山田俊児、河田光博,Estrogen-related receptor reduces subnuclear mobility of estrogen receptor and suppresses estrogen-dependent cellular function, 国際内分泌学会,2014.8.18,シカゴ(アメリカ)

橋本隆、堀井謹子、笹川誉世、西真弓,早期母子分離と成体マウスの側坐核および分界状床核における遺伝子発現変化,第119回日本解剖学会窓外・全国学術集会,2014.3.27,自治医科大学(栃木県・下野市)

橋本隆、松田賢一、西真弓、河田光博,転写共役因子 SAFB の脳内局在とエストロゲン受容体との共存,第54回日本組織細胞化学会学術集会,2013.9.28,航空会館,(東京・港区),

橋本隆、松田賢一、西真弓、河田光博,転写

共役因子 SAFB の脳内局在とエストロゲン
受容体 との共存,第 118 回日本解剖学会総
会・全国学術集会,2013,3.30,サンポートホー
ル高松(香川県・高松市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kaibou1.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 隆 (HASHIMOTO, TAKASHI)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号 : 60712891