

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461734
研究課題名(和文) PTSDによる異性間の絆形成障害の脳内機構の解明

研究課題名(英文) Impairments in social bonding by PTSD

研究代表者

三井 真一 (Mitsui, Shinichi)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20295661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心的外傷後ストレス障害(PTSD)患者においてパートナーとの人間関係の破綻をきたす症例が報告されているが、その神経機構を明らかにするために一夫一婦制を呈するプレーリーハタネズミを材料に、トラウマ処置後の社会行動と脳内変化を解析した。トラウマ処置によりオキシトシン免疫染色性の低下とプレーリーハタネズミの一夫一婦形成は阻害が生じ、これらはセロトニン再取り込み阻害剤の経口投与によって予防できることが明らかになった。

本研究成果は社会行動の観点からPTSDの脳内の変化一端を明らかにし、新規なPTSDの治療法開発の基盤をなすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：There are some reports indicating that post-traumatic stress disorder (PTSD) disrupt the social relationship between intimates. To understand the neuronal mechanisms of such phenomenon, we have investigated the effect of traumatic stress on social behaviors and neuronal responses in monogamous prairie voles. Traumatic stress decreased the oxytocin-immunoreactivity at the supraoptic nucleus of the hypothalamus and impaired the formation of pair bonding. The inhibitory effect by a traumatic stress was prevented by oral administration of a selective serotonin reuptake inhibitor.

Our results have revealed the impairment of social behaviors and neuronal circuits caused by PTSD and will give a basic knowledge to develop novel treatment of PTSD.

研究分野：神経科学

キーワード：プレーリーハタネズミ pair bonding オキシトシン セロトニン

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで脳内に発現するプロテアーゼの機能を遺伝子欠損マウスを用いて明らかにしてきた。例えば、**motopsin** と名付けた脳内プロテアーゼの欠損マウスでは他のマウスに対して行う社会行動が異常に亢進していた (Eur J Neurosci 30, 2368, 2009)。また、**tissue plasminogen activator** の欠損マウスは逆に社会不安が増大することを見出した。こうした齧歯類を用いた社会行動の解析を通じて、対人関係に障害を呈する精神疾患の分子機構に興味の焦点が移っていった。そうした中で着目した材料がプレリーハタネズミである。プレリーハタネズミはマウスと同じ程度の大きさの齧歯類だが、1) 一夫一婦制を形成 (**pair bonding**) し、2) オスも育児参加すること、3) 同腹仔間で交配しない、など高い社会性を持つ。プレリーハタネズミの一夫一婦形成に関わる神経回路としては、**腹側被蓋野**からの側坐核および**前頭前野**へのドパミンニューロンの投射、扁桃体内側核から腹側淡蒼球や外側中隔野へのバソプレッシン (AVP) ニューロンの投射、さらに**視床下部**から分泌されるオキシトシン (OXT) の**前頭前野・側坐核・扁桃体**への作用が重要とされている (Nat Neurosci 7, 1048, 2004)。こうした**社会活動に関わる脳領域はヒトにおいても共通性が見られ**、AVP や OXT の作用の重要性に加えて、**背側前帯状皮質・前頭前野・前頭前野腹内側部・扁桃体**で構成される社会性情動系ループの存在が指摘されている (図1、および Nat Rev Neurosci 12, 524, 2011)。

一方、対人関係に障害を呈する精神疾患として申請者は心的外傷性ストレス障害 (PTSD) に着目した。PTSD は心的外傷 (トラウマ) を経験した後、トラウマの再体験 (フラッシュバック)、トラウマに関連したきっかけの回避と麻痺、覚醒亢進と

いった中核症状が1ヶ月以上継続し、社会的機能低下を伴う精神障害である。こうした中核症状の他に親密だったパートナーと離別するといった対人機能の障害を伴うことがある。本邦では震災後に被災者の離婚が多く見られることを震災離婚と称するが、事実 PTSD 患者の離婚率が有意に高いことが多々報告されている (Am J Public Health 92, 59, 2002, J Trauma Stress 25, 657, 2012 など)。画像解析やマウス等のモデル動物を用いた解析から、**視床下部、前頭前野、背側前帯状皮質、扁桃体中心核、腹側被蓋野**といった脳領域が PTSD 発症に関わることが明らかにされてきた (Nat Rev Neurosci 13, 769, 2012)。これらの脳領域は一夫一婦形成に重要な脳領域 (下線) と重複する。また、一夫一婦形成に重要な **AVP** の尿中濃度と PTSD 症状の重症度との相関も報告されている (Biol Psychol 93, 296, 2013)。

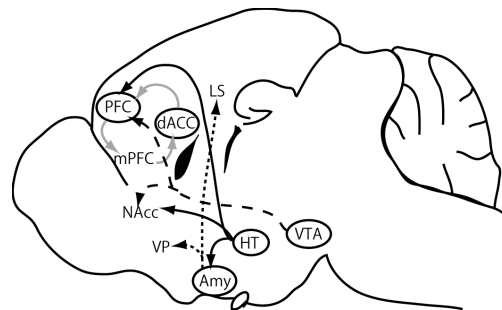


図1) 一夫一婦形成にかかわる神経回路
Pair bonding に重要な経路は1) 扁桃体 (Amy) 中心核から腹側淡蒼球 (VP) や外側中隔 (LS) へのAVP の作用 (点線)、2) 視床下部 (HT) から扁桃体 (Amy)、側坐核 (NAcc)、前頭前野 (PFC) へのOXT の作用 (実線)、3) 腹側被蓋野 (VTA) から側坐核 (NAcc)、前頭前野 (PFC) へのドパミンニューロン (波線) である。これらのうちでPTSD によって変化が生じる脳領域を丸で囲む。さらに前頭前野 (PFC) と背側前帯状回 (dACC) は腹側前頭前野 (mPFC) を介して社会性情動系ループを形成している (グレーの矢印)。

以上の背景を踏まえて、申請者は PTSD 発症により一夫一婦形成に関わる神経回路の機能不全によってパートナーとの対人関係に障害を生じるようになるとの仮説にいたった。そこで、プレリーハタネズミに齧歯類に PTSD 様症状を誘発するトラウマ；single prolonged stress (SPS) を適応して一夫一婦形成に及ぼす影響を検討したところ、SPS 処置後 2 週間以上にわたって一夫一婦の形成が阻害された。このことは SPS による短期的なストレス反応ではなく、SPS 処置によって一夫一婦形成にかかわる神経回路に恒常的な変化が生じていることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では 1) SPS 処置後の行動学的症状と共に一夫一婦形成にかかる神経回路の形態学的変化を明らかにし、2) 薬物投与によって SPS 処置による一夫一婦形成阻害が回復することを明らかにする、ことにより PTSD に起因するパートナーとの対人関係障害の病態治療研究の基盤をなすことを目的とする。

3. 研究の方法

SPS 処置；SPS 処置は、泳ぎが苦手なプレリーハタネズミ用に申請者らが至適化した条件で行う。すなわち、成熟したオスのプレリーハタネズミを 50 mL 遠沈管での 2 時間の拘束後、5 分間の強制水泳を行い、15 分間ホームケージで休息させる。最後に姿勢反射が無くなるまでエーテルを吸入させた後、ホームケージに戻して 1 週間飼育する。

行動学的試験；SPS 処置後 7 日後に open field test による情動試験を行い、翌日に sucrose preference test による無快感症の検証を行った。その後、メスプレリーハタネズミと 7 日間同居させて飼育した。SPS

処置 14 日後に、被験個体にパートナーと見知らぬメスプレリーハタネズミ (ストレンジヤー) を 3 時間提示して、それぞれのメス個体に対して示す親和行動の時間を計測した (パートナー嗜好性テスト)。パートナーに対する親和行動の時間が有意に長い場合に一夫一婦形成したと見なした。

選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) の効果を検証するために、SPS 処置後からパロキセチン (10 mg/kg) あるいは溶剤の経口投与を 1 日 2 回、10 日間行った。SPS 処置後 7 日目から 10 日目まで被験個体をメスと一緒に飼育し、10 日目にパートナー嗜好性テストを行った。パートナー嗜好性テストの 90 分後に灌流固定し、脳を摘出した。

SPS 処置が既に形成された絆や恐怖記憶に与える影響を明らかにするために、以下の実験を行った。メスと 3 日間同居させて絆形成を行わせた。対照群はオス同士 2 匹で 3 日間飼育した。SPS 処置を行い 7 日後にメスと同居させた群はパートナー嗜好性テストを行った。翌日、0.4mA、2 秒間の電気ショックを 2 回与えることで、文脈依存的恐怖条件付けを両群に対して行った。さらにその翌日、電気ショックを与えたチャンパーに被験個体を 5 分間放置してすみ反応の時間を計測した。

免疫組織化学；SPS 処置後 7 日目に 4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定後に脳を摘出した。パートナー嗜好性テスト後に摘出した脳とともに常法 (Behav Brain Res 281, 24, 2015) に従って、ベクター社 Elite ABC kit を用いた ABC 法による免疫染色を行った。一次抗体として以下のものを使用した。

- ・ウサギ抗 cFos 抗体 (SC-52、Santa Cruz 社)
- ・ウサギ抗 OXT 抗体 (#20068、Immunostar 社)

・ウサギ抗 AVP 抗体 (AB1565、Millipore 社)

4. 研究成果

①不安行動、アンヘドニアに及ぼす SPS 処置の影響

Open field test の中心部での滞在時間は、SPS 未処置群と SPS 処置群との間に有意な差は認められなかった。今回は SPS 処置により不安行動の増加は示唆されなかった。

Sucrose preference test では、被験個体にシヨ糖水と蒸留水を提示した際の飲水量を測定し、全飲水量に対するシヨ糖水摂取量をシヨ糖嗜好性とした。SPS 未処置群ではおよそ 80%のシヨ糖嗜好性を示した。SPS 処置群では、処置前で 80.2%、処置後に 85.9%を示した。二元配置分散分析では処置前後、および SPS 処置の有無に主効果は認められず、SPS 処置によるアンヘドニア誘導はみられなかった。

②SPS 処置による一夫一婦形成の阻害

SPS 処置後に被験個体とメスとを同一ケージで飼育した後にパートナー嗜好性テストを行った結果、SPS 未処置群はストレンジャーよりもパートナーに対して有意に長時間親和行動を示したが、SPS 処置群では両者に対する親和行動の時間に有意差は認められなかった。従って、SPS 処置によって一夫一婦の形成が阻害されることが示唆された。

一方、あらかじめメス個体とつがい形成を行ったオス個体に SPS 処置を行った後にパートナー嗜好性テストを行ったところ、パートナー嗜好性が認められなかった。しかし、別のコホートで再度実験を行った結果ではパートナー嗜好性を認めたため、今後更に検討を行っていくこととした。

③SSRI の経口投与の効果

SPS 処置後にパロキセチンを経口投与した群では、ストレンジャーよりパートナーに対して有意に長く親和行動を示した。一方、

SPS 処置後に蒸留水を経口投与した群ではパートナーとストレンジャーとに示した親和行動の時間に有意差はなく、パートナー嗜好性は認められなかった。

④一夫一婦形成による恐怖記憶の減弱

オスと同居させた群では、SPS 処置前と比べて処置後では恐怖記憶が増強していたが、メスと一夫一婦形成していた群では、SPS 前後ともに恐怖記憶が著しく減弱していた。一夫一婦形成による social buffering 効果が示唆された。

⑤免疫組織学的解析

室傍核では OXT、AVP とも免疫染色性に SPS 処置・無処置間で差は認められなかった。視索上核では SPS 処置群の OXT 染色性が無処置区群と比較して有意に低下していたが、AVP について差は認められなかった。

パートナー嗜好性テスト後の脳の免疫染色では、視索上核において OXT と cFos の二重陽性細胞数が SPS 未処置群と比較して SPS 処置後水投与群および SPS 処置後にパロキセチンを投与した群で有意に低下していた。SPS 処置後パロキセチン投与群と水投与群との間に有意さは認められず、SPS 処置によって視索上核の OXT ニューロンの応答性が障害される可能性が示唆された。

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 4 件)

- ① Arai, A., Hirota, Y., Miyase, N., Miyata, S., Young, L. J., Osako, Y., Yuri, K., *Mitsui, S., A single prolonged stress paradigm produces enduring impairments in social bonding in monogamous prairie voles. *Behavioural Brain Research* 315, 83–93, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.022> (査読有)

- ② Hidaka, C, *Mitsui, S.,
N-glycosylation modulates
filopodia-like protrusions induced by
sez-6 through regulating the
distribution of this protein on the cell
surface. *Biochemical and Biophysical
Research Communications* 462,
346–351, 2015. doi:
10.1016/j.bbrc.2015.04.139 (査読有)
- ③ Nakamura, K., Takabe, A., Shimizu,
F., Takahashi, M., Matsuo, O., *Mitsui,
S., Tissue plasminogen activator
modulates emotion in a social context.
Behavioural Brain Research 281,
24–31, 2015. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.022> (査読有)
- ④ *Mitsui, S., Osako, Y., Yuri, K., The
mental retardation-related protease,
motopsin (prss12), binds to the
BRICHOS domain of the integral
membrane protein 2a. *Cell Biology
International* 38, 117–123, 2014. doi:
10.1002/cbin.10164 (査読有)

[学会発表] (計 14件)

- ① 明石拓実、茂原美穂、三井真一、蒲生啓
司。発達障害モデルマウスを用いた社会
行動変化と生体内物質濃度変化との関
係に関する研究。2016年日本化学会中
国四国支部大会。平成28年11月5～6
日。香川大学幸町キャンパス(高松市)。
- ② 新井亜紀、三井真一。プレーリーハタネ
ズミのつがい形成に関する脳領域にお
ける外傷性ストレスの影響。第63回北
関東医学学会総会。平成28年9月29
日。群馬大学医学部刀城会館(前橋市)。
- ③ 廣田湧、三井真一。プレーリーハタネズ
ミの pair bonding は single prolonged
stress (SPS) によって、破綻する。第
63回北関東医学学会総会。平成28年9

月29日。群馬大学医学部刀城会館(前
橋市)。

- ④ 茂原美穂、三井真一。Motopsin/PRSS12
と Sez-6 遺伝子はそれぞれ PC12 細胞に
おける神経突起を促進させる。第63回
北関東医学学会総会。平成28年9月29
日。群馬大学医学部刀城会館(前橋市)。
- ⑤ 廣田湧、吉澤萌香、石澤美衣、佐藤葵、
民部由莉、由利和成、三井真一。プレー
リーハタネズミの雌雄の絆 (pair
bonding) は single prolonged stress
(SPS) によって破綻する。BMB2015。
平成27年12月3日。神戸ポートアイ
ランド(神戸市)。
- ⑥ 日高千晴、三井真一。細胞形態の調節に
おいての sez-6 の N 型糖鎖の役割。
BMB2015。平成27年12月1日。神戸
ポートアイランド(神戸市)。
- ⑦ Yu Hirota, Moeka Yoshizawa, Mii
Ishizawa, Aoi Sato, Yuri Minbu,
Kazunari Yuri, Shinichi Mitsui.
Disturbance of the maintenance of
pair bond by traumatic stresses in
monogamous prairie voles. 第39回日
本神経科学大会。平成28年7月21日。
パシフィコ横浜(横浜市)。
- ⑧ Aki Arai, Yu Hirota, Shinichi Mitsui.
Effects of traumatic stresses on brain
region for pair bonding in prairie
voles, a monogamous rodent. 第39回
日本神経科学大会。平成28年7月21
日。パシフィコ横浜(横浜市)。
- ⑨ Miho Mohara, Shinichi Mitsui.
Motopsin/PRSS12 and seizure related
gene (sez) -6 individually enhance
neurite development in PC12 cells. 第
39回日本神経科学大会。平成28年7
月21日。パシフィコ横浜(横浜市)。
- ⑩ Chiharu Hidaka, Shinichi Mitsui.
Role of N-glycans to a function of a

trans-membrane protein, seizure-related gene 6 (sez-6) . 第 58 回日本神経化学学会大会. 平成 27 年 9 月 13 日. 大宮ソニックシティ(さいたま市).

- ⑪ Aki Arai, Yu Hirota, Moeka Yoshizawa, Mii Ishizawa, Aoi Sato, Yuri Minbu, Larry J. Young, Yoji Osako, Kazunari Yuri, Shinichi Mitsui. Paroxetine administration restores pair bonding impaired by a single prolonged stress in monogamous prairie voles. 第 38 回日本神経科学大会. 平成 27 年 7 月 30 日. 神戸国際会議場 (神戸市).
- ⑫ Yoji Osako, Makoto Nishihara, Yuki Uchida, Kenjiro Tanaka, Takahiro Ushida, Shinichi Mitsui, Larry J. Young, Kazunari Yuri. **Psychosocial stress by partner-loss enhanced pain behaviors in monogamous animal, prairie voles.** 第 38 回日本神経科学大会. 平成 27 年 7 月 30 日. 神戸国際会議場 (神戸市).
- ⑬ Chiharu Hidaka, Shinichi Mitsui. Seizure-related gene 6 (SEZ-6) modulates formation of filopodia-like protrusions. 6th International Conference on Advanced Micro - Device Engineering. 平成 26 年 12 月 5 日. 桐生市民文化会館 (桐生市).
- ⑭ Aki Arai, Yu Hirota, Shiori Miyata, Naoki Miyase, Larry Young, Yoji Osako, Kazunari Yuri, Shinichi Mitsui. A single prolonged stress disturbs pair bonding in the monogamous, prairie vole. 第 37 回日本神経科学大会. 平成 26 年 9 月 13 日. パシフィコ横浜 (横浜市).

[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]

- ① *三井 真一. セリンプロテアーゼによる社会行動の制御. 脳21 19, 32 - 38, 2015. (査読無)
- ② *三井 真一. プレーリーハタネズミの社会的行動一絆一. ぐんま作業療法研究 18, 57 - 59, 2015 (査読無)
- ③ ホームページ等
<http://mitsuilab.health.gunma-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 真一 (MITSUI, Shinichi)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号 : 20295661

(2) 研究分担者

高橋(池澤) 麻衣子 (TAKAHASHI-IKEZAWA, Maiko)
群馬大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号 : 50701322

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()