

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19591335  
研究課題名（和文）脳機能発達の臨界期における神経可塑的变化を基盤としたストレス応答機構の解明  
研究課題名（英文）A study of neural circuits underlying stress regulation at the critical period during brain development

研究代表者 松本 真知子  
北海道医療大学 薬学部（准教授）  
研究者番号：70229574

## 研究成果の概要：

本研究は、幼児虐待を視野に入れ、脳内神経回路網が急速に発達する幼児期に過度のストレスを負荷すると、成長後ストレスに対する脆弱性が生じるとの仮説を動物実験により証明した。すなわちラット幼若期の一定期間にストレスを負荷により、成長後の情動行動ならびにシナプス応答に異常が生じることを明らかにし、またその背景にはセロトニン神経の機能変化による可能性を示唆した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：脳発達 ストレス 臨界期

## 1. 研究開始当初の背景

脳内神経回路網が急速に発達する幼児期の一定期間に過度のストレスを負荷すると、脳内神経回路の情報処理機構や機能的異常が生じ、成長後ストレスに対する脆弱性が生じ、うつ・不安障害などの精神疾患の背景になっている可能性が指摘されている。実際、筆者らは、ラット幼若期の一定期間に嫌悪刺激を負荷すると、成長後、不安・恐怖などの情動ストレスに対する感受性が低下し、行動異常を発現すること、またこの幼若期ストレス負荷ラットの海馬（CA1 領野）におけるセロトニン

(5-HT) 受容体 (5-HT<sub>1A</sub>) を介したシナプス応答性が著しく変化していることを見出した。この結果により、幼児期の一定期間のストレス曝露は、脳内神経回路の形成あるいは機能に影響を与え、結果として情動行動を変化させるのではないかと、それには 5-HT 神経による調節機構が関与しているのではないかと、との仮説を持つに至った。

## 2. 研究の目的

上記の仮説を基に、幼児期におけるストレスと 5-HT 神経によるストレス調節機構を含めた脳機能発達との関連性を、幼若期ストレス

モデル（ラット）を用いて追究することを目的とした。具体的には（1）情動ストレスに対する行動応答として、情動記憶の一環である獲得、再生ならびに消去過程の三つの側面から検討し、（2）神経回路として、精神疾患と密接な関連性が指摘されている皮質－海馬－扁桃体の情動神経回路、特にこれらの神経回路網の統合的役割を担っている皮質前頭前野のシナプス機能に焦点を当てた。さらに（3）これらの脳部位に投射しているセロトニン（5-HT）神経の起始核である縫線核を強制的に擾乱し、幼若期ストレス負荷による行動および電気生理学的特性との関連性を追究することを目的とした。

### 3. 研究の方法

（1）行動解析：ラット幼若期（生後2週齢または3週齢時）に嫌悪刺激（フットショック）を負荷した（幼若期ストレス負荷）。成長後（10から14週齢時）に不安水準の評価系として、条件恐怖試験をとして用いた。不安・恐怖記憶の再生、あるいは消去過程における齧歯類特有の「すくみ行動」を、不安関連行動の指標として定量した。具体的にはFS直後および24時間後に電撃箱に再び移した時（再曝露）に観察される「すくみ行動」を観察した（再生過程:retention）。また観察時間を5分間に設定し、24時間後に再曝露し、すくみ行動の変化を数日間記録した（消去過程:extinction）。生得的な不安（無条件恐怖）による行動応答性との違いを明らかにするために、高架式十字迷路によって惹起される不安関連行動を比較検討した。また新規環境ストレスであるopen field 試験により、行動量ならびに不安関連行動を多面的に解析した。

（2）電気生理学的実験：行動解析と同時に海馬－皮質神経回路網の誘発電位を同時に記録し、不安・恐怖記憶の再生、あるいは消去過程におけるシナプス応答性と行動との関連性を検討した。具体的には海馬Schaffer側枝に刺激電極を、海馬CA1に記録電極を挿入し、CA1領域の誘発集合電位（PSA）を、不安・恐怖記憶の再生過程ならびに新規環境に焦点を宛てた行動解析と同時に測定した。また海馬subicularCA1に刺激電極、皮質前頭前野（mPFC）に記録電極を挿入し、mPFCのPSAを不安・恐怖記憶の消去過程における不安関連行動と同時に測定した。

（3）神経科学的実験：皮質あるいは海馬細胞外液中セロトニン（5-HT）ならびにアミノ酸（グルタミン酸とGABA）濃度変化を脳内微小透析法により定量し、行動変容およびシナプス応答との関連性を追究した。

（4）免疫組織化学的実験：縫線核に神経毒を投与することにより5-HT神経を破壊し、不安関連行動ならびに電気生理学的検討を行った。また抗5-HT抗体を用い、幼若期ストレス負荷ラットの縫線核の5-HT陽性細胞数を定量・解析し、関連分子としての5-HTの役割を追究した。

### 4. 研究成果

（1）条件恐怖試験を用いた行動解析により幼若期（生後3週齢時）に嫌悪刺激（フットショック：FS）を負荷したラット（3W-FS）は、成長後、不安・恐怖記憶の消去過程が著しく低下していることが明らかになった。以下の図に示すように、対照群（幼若期にFSを負荷しなかった群）および生後2週齢時にFSを負荷した群（2W-FS）では、不安関連行動の指標であるすくみ行動「freezing」は、消去試行を反復することにより減少したが、3W-FS群では、消去が減弱していた（図1）。

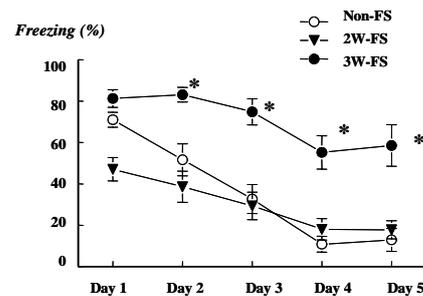


図1 消去過程におけるすくみ行動におよぼす幼若期ストレス負荷の影響

すなわち、生後3週齢時に嫌悪刺激を負荷すると、成長後、恐怖記憶の消去過程が障害される可能性が示唆された。言い換えれば、幼若期ストレスにより、ストレスに対する脆弱性が生じ、その行動変容には臨界期が存在することが示唆された。

（2）幼若期（生後3週齢時）ストレス負荷により生じる消去過程の障害と、情動神経回路である海馬－皮質前頭前野（mPFC）神経系のシナプス機能との関連性を、覚醒下で検討した。その結果、FSによりmPFCのシナプス伝達は抑制された。対照群（幼若期にFSを負荷しなかった群）および生後2週齢時にFSを負荷した群（2W-FS）では、FSによるシナプス伝達抑制は、消去試行に従い減弱し、基礎レベルまで回復したが、生後3週齢時にFSを負荷した群（3W-FS）では、シナプス伝達抑制は、元のレベルに戻らなかった（図2）。

以上の結果より、3W-FS でみられた消去過程の障害は、脳機能発達における海馬一皮質前頭前野(mPFC)神経系の機能破綻による可能性が示唆された。

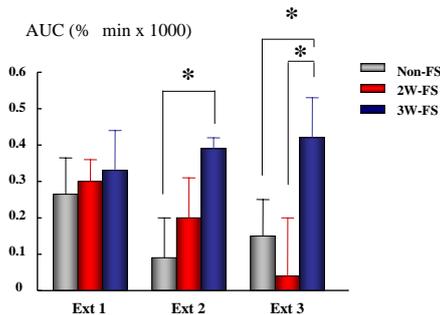


図2 消去試行による海馬一皮質前頭前野シナプス応答におよぼす幼若期ストレス負荷の影響

(3) 新奇環境ストレスである Open field 試験を用いた行動解析では、幼若期ストレス負荷による行動量の変化は見られず、海馬 CA1 領域のシナプス応答にも影響がみられなかった。一方、記憶に依存しない生得的な不安・恐怖の評価法である高架式十字迷路を用いた実験では、生後 3 週齢時に FS を負荷した群(3W-FS)で、不安水準の低下がみられた。さらに免疫組織科学的手法により、3W-FS 群の正中縫線核の 5-HT 陽性細胞数は対照群に比べ有意に減少していることが明らかになった。一方、正中縫線核の 5-HT を化学的に破壊したラットでは、高架式十字迷路法による不安水準の低下がみられた。以上の結果より、生後 3 週齢時に FS を負荷することにより、5-HT の起始核である正中縫線核の形態学的変化が生じ、成長後の行動変容と関連性があることが示唆された。

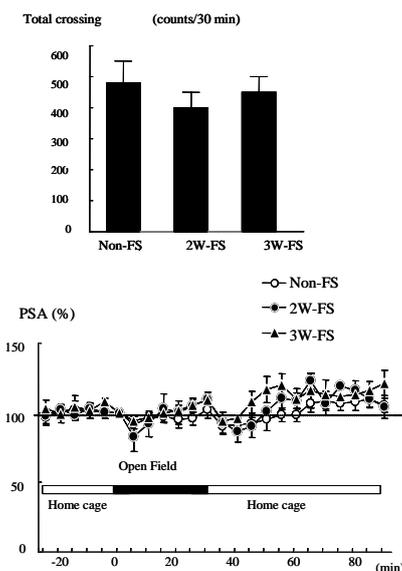


図3 新奇環境ストレスにおける行動量ならびに海馬 CA1 シナプス応答におよぼす幼若期ストレス負荷の影響

以上の研究結果は、国内外の学会に発表し、論文としてもまとめた。特に生後 3 週齢時の嫌悪刺激により、消去過程に障害がみられたこと、また行動解析と同時に電気生理学的手法を用いて、消去障害に関わる神経回路網を示唆した研究は、インパクトが強く、平成 21 年度、パリで開催される国際精神生物学会のシンポジウムで発表する機会を与えられた。これは、外傷後ストレス障害 (PTSD) の患者では恐怖記憶が消去されにくいことや、臨床で現在用いられている曝露療法と動物実験における消去試行との類似性により、基礎と臨床の掛け橋になる可能性が評価されたと考えている。

今後、幼若期ストレスモデルを用いて、PTSD を含む不安障害の易罹患性と後天的な要因との関連性を探り、またこれらの精神疾患の治療戦略を念頭に置いて研究を進めていくつもりである。

## 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 8 件)

- ① Koseki H., Matsumoto M., Togashi H., Miura Y., Fukushima K., Yoshioka M. Alteration of synaptic transmission in the hippocampal-mPFC pathway during extinction trials of context-dependent fear memory in juvenile rat stress models. *Synapse (in press)* 査読有
- ② Matsumoto M., Yoshioka M., Togashi H. Early Postnatal stress and neural circuits underlying emotional regulation. *International Review of Neurobiology (in press)* 査読有
- ③ Hirata R, Matsumoto M, Judo C, Yamaguchi T, Izumi T, Yoshioka M, Togashi H. Possible relationship between the stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Synapse* 63: 549-556 (2009) 査読有
- ④ Hirata, R, Togashi H, Matsumoto M, Yamaguchi T, Izumi T, Yoshioka M. Characterization of stress-induced suppression of long-term potentiation in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Brain Research.* 1226: 27-32 (2008) 査読有
- ⑤ Matsumoto M, Shikanai H, Togashi H, Izumi T, Kitta T, Hirata R, Yamaguchi T, Yoshioka M. Characterization of clozapine-induced changes in synaptic plasticity in the hippocampal-mPFC

pathway of anesthetized rats. *Brain Research* 1195: 50-55 (2008) 査読有

- ⑥ Matsumoto M, Togashi H, Konno K, Koseki H, Hirata R, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshioka M: Early postnatal stress alters the extinction of context-dependent conditioned fear in adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 89: 247-252 (2008) 査読有
- ⑦ Koseki H, Matsumoto M, Togashi H, Yamaguchi T, Izumi T, Yoshioka M: Effects of aversive stress during brain development on hippocampal synaptic and behavioral responses to emotional stress at postadolescence. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 27 :19-27 (2007) 査読有
- ⑧ Konno K, Matsumoto M, Togashi H, Yamaguchi T, Izumi T, Watanabe M, Iwanaga T, Yoshioka M: Early postnatal stress affects the serotonergic function in the median raphe nuclei of adult rats. *Brain Research*. 1172: 60-66 (2007) 査読有

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ①松本真知子他:「ラット海馬シナプスの可塑的变化と皮質前頭前野による調節」第128回日本薬学会年会(於・横浜 3. 26-3. 28, 2008)
- ②松本真知子他:「ラット幼若期のストレス負荷は成長後の情動ストレスに対する」第30回日本神経科学会(於・横浜 9. 10-9. 12, 2007)
- ③ 松本真知子他: Characterization of clozapine-induced synaptic changes in the hippocampo-mPFC pathway of anesthetized rats. Dopamine 50 year (於・Goeteborg, Sweden 5. 30-6. 2, 2007)
- ④ 松本真知子他: Stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. (於・Geneva, Switzerland 7.12-7.16, 2008)

〔図書〕 (計 件)  
〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 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◇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) 研究分担者

松本真知子 (MATSUMOTO MACHIKO)  
北海道医療大学・薬学部・薬理学講座・准教授  
研究者番号: 70229574

### (2) 研究分担者

吉岡充弘 (YOSHIOKA MITSUHIRO)  
北海道大学・医学部・神経薬理学講座・教授  
研究者番号: 40182729

### (3) 研究分担者

山口拓 (YAMAGUCHI TAKU)  
北海道大学・医学部・神経薬理学講座・助教  
研究者番号: 80325563

### (4) 研究分担者

泉剛 (IZUMI TAKESHI)  
北海道大学・医学部・神経薬理学講座・助教  
研究者番号: 60312360