

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460240

研究課題名(和文) 神経発達過程におけるストレス負荷後の情動障害の発症脆弱に関わる機序解明と治療戦略

研究課題名(英文) Investigation in mechanism and therapeutic strategy into vulnerability to mood disorder after exposure to stress in the stage of neuro-development of mice

研究代表者

鍋島 俊隆 (Nabeshima, Toshitaka)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・客員教授

研究者番号：70076751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、幼児・学童期において問題視されている心理社会的ストレスを想定し、幼若期マウスに社会的敗北ストレスを負荷し、社会性行動について評価した。幼若期マウスは心理社会的ストレスに対して、成体期マウスに比べて脆弱であり、成体期まで持続する社会的行動障害を示した。社会的行動障害モデル動物としての評価系を確立できた。この動物の社会性行動障害には、グルココルチコイド受容体の活性化、モノアミン作動性神経系およびグルタミン酸作動性神経系の遺伝子発現変化に伴って、これら神経系の機能異常が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The social behavioral impairment induced by social defeat stress exposure during juveniles was persistent to adult. The development of social impairment may be due to the suppression of neurogenesis via activation of glucocorticoid receptors (GR) induced by stress. The social defeat stress induced dysfunction of serotonergic and dopaminergic neuronal systems in the prefrontal cortex. The combined treatment of a dopamine receptor partial agonist with a selective serotonin reuptake inhibitor or a non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist attenuated the social impairment. DNA microarray analysis revealed that the social defeat stress induced the changes of gene expression in the monoaminergic, glutamatergic neuronal systems, and epigenetic regulation. Juvenile mice are vulnerable to social defeat stress, and activation of GR, monoaminergic and/or glutamatergic neuronal dysfunctions due to changes in related-gene expressions were involved in the social impairment.

研究分野：神経精神薬理学

 キーワード：幼若期 社会的敗北ストレス 遺伝子発現解析 モノアミン作動性神経系 グルタミン酸作動性神経系 上
シニティック制御機構

1. 研究開始当初の背景

身体とともに神経・精神が発達する幼児期・学童期は、社会的・心理的ストレスに対して脆弱であり、その後に発症する発達障害や気分障害などの精神障害は、成人後まで遷延化したり、再発したりするが多い。一方、臨床研究を集約したメタ解析において、学童期・青年期におけるうつ病に対する薬物治療は十分な効果は得られていない。そのため、幼児期・学童期における社会的・心理的ストレスによって発症するうつ病などの精神障害に対する新規治療法の開発は急務である。

2. 研究の目的

本研究では幼若期の実験動物に社会的敗北ストレスを負荷し、幼若期に受けた社会的・心理的ストレスが成体期以降の神経および精神機能に与える影響について検討する。本研究の成果から、社会的・心理的ストレスが与える影響の深刻さを社会に啓蒙するとともに、その発症機序に基づいた診断、治療・予防薬の開発の一助にすることを目的とする。すなわち、①幼児期・学童期における社会的・心理的ストレスを想定し、幼若期の被験マウスに社会的敗北ストレス（攻撃性の高いマウスに曝露する）を曝露することでモデル動物を作製する。②作製したモデル動物を用いて、幼若期における社会的・心理的ストレスによる発達障害や気分障害などの精神障害が成体後まで遷延する機序や発症する機序を明らかにする。③その機序を基盤とした新規治療薬の探索・開発やトランスレショナルリサーチを目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

C57BL/6J 系マウスを使用した。本研究は、名城大学薬学部および名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、各機関の動物実験指針および The Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, revised 1996) に準じて行った。

(2) 社会的敗北ストレス

C57BL/6J 系雄性マウスを攻撃性の高い ICR 系雄性マウスと 1 日 10 分間、10 日間連続して物理的に接触させることで、社会的敗北ストレスを負荷した。ICR 系雄性マウスと接触させなかった群を比較対象群とした。

(3) 行動薬理学的解析

社会性行動試験：オープンフィールド（42 × 42 × 30cm）の端にボックスを設置し、ボックスの周りを交流区域とした装置を使用した。第 1 セッションにおいて、ボックス内に ICR マウスがいない装置にマウスを 30 分間入れ、最後の 5 分間の交流区域での滞在時間を測定した。その一分後、第 2 セッションで

はボックス内に ICR マウスを入れた装置にマウスを再び 5 分間入れ、交流区域での滞在時間を測定した。

(4) 生化学的解析

①ウエスタンブロッティング：氷冷下で全脳を摘出した後、直ちに凍結させた。その後、粗蛋白質量を定量し、サンプルバッファーを加え調製した。電気泳動は 10 % ポリアクリルアミドゲルで行い、PVDF 膜へ蛋白を転写した後、ブロッキングし、一次抗体と反応させた。二次抗体と反応させた後、PVDF 膜と化学発光液に反応させ、高感度冷却 CCD カメラを用いて検出した。

②モノアミン測定：氷冷下で前頭前皮質を摘出した後、直ちに凍結させた。内部標準物質（イソプロテレノール）を加え、0.2M 過塩素酸の存在下で超音波によりホモジナイズし、除タンパクした。遠心分離により上清採取し、酢酸ナトリウムで pH 調整した後、フィルターろ過した。ろ過液中のモノアミン含量は電気化学検出器により検出する高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

4. 研究成果

(1) 社会的敗北ストレス負荷による情動性および社会性に関連する行動への影響

幼若期（約 3 週齢）のマウスに社会的敗北ストレスを 1 日あるいは 10 日間負荷し、1 日、15 日、および 29 日後に社会性行動試験を行ったところ、持続する社会性行動障害が認められた。一方、新奇環境下における自発運動量、高架式十字迷路試験、およびビー玉覆い隠し試験における不安様行動には変化は認められなかった。成体期（10 週齢）のマウスに社会的敗北ストレスを 10 日間負荷した場合に持続する社会性行動障害が認められたが、1 日負荷した場合ではそのような障害は認められなかった。幼若期マウスは心理社会的ストレスに対して成体期マウスに比べて脆弱であることが示唆され、不安様行動を伴わない、若年期や成体期まで持続する社会性行動障害を発現するモデル動物の構築と行動評価を確立することができた。

(2) 幼若期社会的敗北ストレス負荷による視床下部一下垂体-副腎系（HPA 系）および神経新生への影響

幼若期社会的敗北ストレスを 1 日あるいは 10 日間負荷すると、いずれにおいても血中グルココルチコイド量が増加していた。一方、幼若期社会的敗北ストレス負荷 1 日後のマウスにおいて、海馬歯状回における神経新生マーカーの Ki67 タンパク質陽性細胞数と DNA 複製時に取り込まれる BrdU 陽性細胞数が減少していた。グルココルチコイド受容体拮抗薬を幼若期社会的敗北ストレス負荷前に 10 日間併用投与したところ、幼若期社会的敗北ストレス負荷 1 日後に認められる海馬歯状回

における Ki67 タンパク質陽性細胞数と BrdU 陽性細胞数の減少、および 29 日後に認められる成体期の社会性行動障害は緩解された。幼若期社会的敗北ストレス負荷による成体期まで持続する社会性行動障害の発現は、社会的敗北ストレス負荷により増加した血中グルココルチコイドが神経新生を低下させることによるものと示唆された。

(3) 幼若期社会的敗北ストレス負荷によるモノアミン作動性神経系への影響

幼若期社会的敗北ストレスを 10 日間負荷すると、1 日後において、前頭前皮質と側坐核でのセロトニン代謝回転（代謝物/未変化体比）および側坐核でのドパミン代謝回転が低下していたが、ノルアドレナリン代謝回転に変化は認められなかった。三環系抗うつ薬、選択的セロトニン再取り込み阻害薬およびドパミン D₂ 受容体部分作動薬を単回急性投与および 15 日間連続投与しても、社会性行動障害は緩解されなかった。しかし、選択的セロトニン再取り込み阻害薬とドパミン D₂ 受容体部分作動薬を併用連続投与すると、社会性行動障害は緩解された。一方、幼若期社会的敗北ストレスを 1 日負荷した場合は、前頭前皮質のセロトニントランスポーター (SERT) の総タンパク質の発現量は増加しており、その代謝体である SERT のユビキチン化タンパク質の発現量およびセロトニン含量は減少していた。幼若期社会的敗北ストレス負荷により認められる脳内セロトニン作動性神経系およびドパミン作動性神経系の機能低下を改善させる薬物の併用投与（増強療法）は、若年期の社会性行動障害に有効であることが示唆された。さらに、幼若期社会的敗北ストレス負荷により前頭前皮質における SERT の総タンパク質の発現量の増加はセロトニン含量を減少させ、セロトニン作動性神経系の機能を低下させるものと示唆された。

(4) 幼若期社会的敗北ストレス負荷によるグルタミン酸作動性神経系への影響

幼若期社会的敗北ストレスを 1 日負荷すると、1 日後において、前頭前皮質の NR2A リン酸化タンパク質および NMDA 受容体の下流シグナルである細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) リン酸化タンパク質の発現量が増加していた。非競合的 NMDA 受容体拮抗薬を単回急性投与および 7 日間連続投与すると、社会性行動障害は緩解され、単回急性投与では NR2A リン酸化タンパク質および ERK リン酸化タンパク質の発現増加も緩解された。幼若期の NR2A 遺伝子欠損マウスに社会的敗北ストレスを 1 日負荷すると、社会性行動は障害されなかった。非競合的 NMDA 受容体拮抗薬は若年期の社会性行動障害に対して有用であること、幼若期マウスの心理社会的ストレスに対する脆弱性に前頭前皮質の NMDA 受容体の機能亢進が関与してい

ることが示唆された。

(5) 幼若期社会的敗北ストレス負荷による脳および血液における遺伝子発現への影響

幼若期社会的敗北ストレスを 10 日間負荷した若年期マウスの前頭前皮質および血液の網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、幼若期社会的敗北ストレス負荷 2 時間後と 1 日後の前頭前皮質や血液において、モノアミンやグルタミン酸などの神経伝達系などに関わる複数の遺伝子の発現が変化していた。幼若期社会的敗北ストレス負荷 2 時間後において、前頭前皮質では 1,270 遺伝子（パーキンソン病、酸化的リン酸化、嗅覚伝達、ハンチントン病、および神経活性リガンド受容体相互作用などの関連遺伝子）の発現が有意に変化していた。血液では 103 遺伝子（レニン分泌、システイン・メチオニン代謝、グルタチオン代謝、がんにおける転写調節不全、およびプリン代謝などの関連遺伝子）の発現が有意に変化していた。両サンプルに共通して 6 遺伝子（免疫機能や嗅覚伝達の関連遺伝子）が有意に変化していた（3 遺伝子増加；2 遺伝子減少；1 遺伝子は前頭前皮質で増加、血液で減少）。一方、幼若期社会的敗北ストレス負荷 1 日後において、前頭前皮質では有意な遺伝子の発現変化は認められなかったが、血液では 3,121 遺伝子（パーキンソン病、酸化的リン酸化、ハンチントン病、およびユビキチン介在性タンパク質分解などの関連遺伝子）の発現が有意に変化していた。幼若期社会的敗北ストレス負荷 2 時間後と 1 日後において、発現変化する遺伝子プロファイルが異なっており、血液では 48 遺伝子（システイン・メチオニン代謝やグルタチオン代謝などの DNA メチル基転移反応によるエピジェネティック制御機構などの関連遺伝子）の発現が持続的に変化していた。心理社会的ストレスによる社会性行動障害の発現には、中枢神経機能障害、モノアミンやグルタミン酸作動性神経系、およびエピジェネティック制御機構に関わる遺伝子の発現変化が関与していることが示唆された。前頭前皮質および血液において共通して発現変化していた遺伝子は、血液サンプルを用いた社会性障害に関するバイオマーカーになりうる可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）総件数 14 件

- ① Tashiro T, Murakami Y, Mouri A, Imamura Y, Nabeshima T, Yamamoto Y, Saito K: Kynurenine 3-monooxygenase is implicated in antidepressants-responsive depressive-like behaviors and monoaminergic dysfunctions. *Behav Brain Res*, 317, 279-285 (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbr.2016.09.050

- ② Aoyama Y, Toriumi T, Mouri A, Hattori T, Ueda E, Shimato A, Sakakibara N, Soh Y, Mamiya T, Nagai T, Hyoung-Chun Kim HC, Hiramatsu M, Nabeshima T, Yamada K: Prenatal nicotine exposure impairs the proliferation of neuronal progenitors, leading to fewer glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41, 578-589 (2016) 査読有
DOI: 10.1038/npp.2015.186
- ③ Mouri A, Ikeda M, Koseki T, Iwata N, Nabeshima T: The ubiquitination of serotonin transporter in lymphoblasts derived from fluvoxamine-resistant depression patients. *Neurosci Lett*, 617, 22-26 (2016) 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.064
- ④ Toriumi K, Oki M, Muto E, Tanaka J, Mouri A, Mamiya T, Kim HC, Nabeshima T: Prenatal phencyclidine treatment induces behavioral deficits through impairment of GABAergic interneurons in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, 233, 2373-2378 (2016) 査読有
DOI: 10.1007/s00213-016-4288-8
- ⑤ Toriumi T, Mamiya T, Ziyu Song Z, Honjo T, Watanabe H, Tanaka J, Kondo M, Mouri A, Kim HC, Nitta A, Fukushima T, Nabeshima T: Deletion of SHATI/NAT8L decreases the N-acetylaspartate content in the brain and induces behavioral deficits, which can be ameliorated by administering N-acetylaspartate. *Eur Neuropsychopharmacol*, 25, 2108-2117 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.euroneuro.2015.08.003
- ⑥ Mouri A, Hoshino Y, Narusawa S, Ikegami K, Mizoguchi H, Murata Y, Yoshimura T, Nabeshima T: Thyrotropin receptor knockout changes monoaminergic neuronal system and produces methylphenidate-sensitive emotional and cognitive dysfunction. *Psychoneuroendocrinology*, 48, 147-161 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.psyneuen.2014.05.021
- ⑦ Hida H, Mouri A, Mori K, Matsumoto Y, Seki T, Taniguchi M, Yamada K, Iwamoto K, Ozaki N, Nabeshima T, Noda Y: Blonanserin ameliorates phencyclidine-induced visual recognition memory deficits: The complex mechanism of blonanserin action involving D₃-5-HT_{2A} and D₁-NMDA receptors in the mPFC. *Neuropsychopharmacology*, 40, 601-613 (2015) 査読有
DOI: 10.1038/npp.2014.207
- ⑧ 鍋島俊隆, 丹羽美苗: 思春期のストレスはエビジェネティックに神経機能を抑制し, うつ病の一因となる. 医学のあゆみ, 249, 179-181 (2014) 査読有
- [学会発表] (計 13 件) 総件数 52 件
- ① Noda Y, Yoshimi A, Hasegawa S, Nabeshima T, Ozaki N: Persistent impairment of social behaviors and neurogenesis in mice exposed to social defeat stress as juveniles. The 7th Nagoya/Nanjing/Shenyang Symposium of Pharmaceutical Sciences (名城大学薬学部・愛知県名古屋市: 2016年9月24日)
- ② Hasegawa S, Miyake Y, Yoshimi A, Hida H, Mouri A, Yamada K, Ozaki N, Nabeshima T, Noda Y: A strategy for treating in deficits of social behaviors induced by exposure to social defeat stress as juveniles. 30th CINP (ソウル・大韓民国: 2016年7月4日)
- ③ Noda Y, Mouri A, Yoshimi A, Hasegawa S, Ito T, Hida H, Yamada K, Nabeshima T, Ozaki N: Social defeat stress as juveniles impairs persistent social behaviors and neurogenesis. 30th CINP (ソウル・大韓民国: 2016年7月4日)
- ④ 鍋島俊隆: うつ病発症における遺伝的要因と環境的要因の関わり. JST 人材 (女性研究者) 育成費補助事業・講演会 (岐阜大学・岐阜県岐阜市: 2016年3月2日)
- ⑤ 長谷川章, 谷口将之, 肥田裕丈, 毛利彰宏, 三宅裕里子, 尾崎紀夫, 三品昌美, 鍋島俊隆, 野田幸裕: 幼若期社会的敗北ストレス負荷による社会性行動障害における NMDA 受容体の関与. 第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会 (タワーホール船橋・東京都: 2015年9月24日)
- ⑥ 毛利彰宏, 横山美里, 肥田裕丈, 長谷川章, 木村真理, 森 大輔, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆, 野田幸裕: 幼若期社会的敗北ストレス負荷によるセロトニントランスポーターの代謝機構への影響. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム (東京大学薬学部・東京都: 2015年8月29日)
- ⑦ 三宅裕里子, 長谷川章, 毛利彰宏, 谷口将之, 肥田裕丈, 吉見 陽, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆, 野田幸裕: 幼若期社会的敗北ストレス負荷による社会性行動障害におけるモノアミン作動性神経の関与と抗うつ薬の応答性. 第 61 回日本薬理学会東海支部大会・総会 (名古屋市立大学薬学部・愛知県名古屋市: 2015年7月4日)

- ⑧ 毛利彰宏, 横山美里, 石原歩実, 肥田裕丈, 國本正子, 渡辺 研, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆, 野田幸裕: 幼若期社会的敗北ストレスによるセロトニントランスポーターのユビキチン化の低下とうつ様行動. 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会 (名古屋国際会議場・愛知県名古屋市: 2014 年 11 月 21 日)
- ⑨ 毛利彰宏, 野田幸裕, 渡辺 研, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆: 教育セミナー5 妥当性に基づく精神疾患モデルの開発とその臨床応用: うつ病モデル動物としての MAGE-D1 遺伝子欠損マウスの妥当性と診断薬開発の試み. 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会 (名古屋国際会議場・愛知県名古屋市: 2014 年 11 月 21 日)
- ⑩ 三宅裕里子, 長谷川章, 毛利彰宏, 谷口将之, 肥田裕丈, 吉見 陽, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆, 野田幸裕: 幼若期慢性社会的敗北ストレス負荷が社会性行動とモノアミン作動性神経に与える影響. 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会 (名古屋国際会議場・愛知県名古屋市: 2014 年 11 月 21 日)
- ⑪ 野田幸裕, 谷口将之, 鶴飼麻由, 毛利彰宏, 肥田裕丈, 長谷川章, 森健太郎, 山田清文, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆: 幼若期社会的敗北ストレス負荷マウスにおける社会性行動と神経発達への影響: グルココルチコイドの関与. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会合同年会 (奈良県文化会館・奈良県奈良市: 2014 年 9 月 29 日)
- ⑫ 毛利彰宏, 野田幸裕, 横山美里, 渡辺 研, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆: シンポジウム 6 若手創薬シンポジウム: セロトニントランスポーターの代謝機構に注目したうつ様行動の解明. 生体機能と創薬シンポジウム 2014 (近畿大学薬学部・大阪府東大阪市: 2014 年 8 月 29 日)
- ⑬ Nabeshima T, Mouri A, Yokoyama M, Kawano N, Yoshimi A, Ikeda M, Mamiya T, Yamada K, Iwata N, Ozaki N, Noda Y: Serotonin transporter ubiquitynation is a potential biomarker for major depressive disorder. 29th CINP (バンクーバー・カナダ, 2014 年 6 月 24 日)

[図書] (計 1 件) 総件数 2 件

1. 鍋島俊隆: I 章 総論 薬物治療学概論, III 章 疾患と薬物治療 71 アルツハイマ

ー病, 72 血管性認知症, 73 レビー小体型認知症. 薬物治療学 第 6 版 (吉尾 隆, 鍋島俊隆, 野田幸裕ら編), 南山堂, 2-12, 521-543 (2017)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: うつ病マーカー, アッセイ方法, うつ病決定方法, うつ病薬のスクリーニング方法及びキット.
発明者: 鍋島俊隆, 毛利彰宏, 野田幸裕.
権利者: 学校法人名城大学.
出願番号: PCT/JP2014/050746.
広告番号: WO2014112571
出願日 2014 年 1 月 17 日(国内)
出願日 2014 年 7 月 24 日(米国)
国内外の別: 国内・国外
2. 名称: うつ病決定方法及び血中セロトニントランスポーター分析キット.
発明者: 鍋島俊隆, 毛利彰宏.
権利者: 学校法人名城大学.
出願番号: PCT/JP2012/068348
公告番号: WO2013012038
出願日: 2012 年 7 月 19 日
公開日: 2013 年 1 月 24 日
優先日: 2011 年 7 月 21 日
国内外の別: 国内・国外

[その他]

<http://www.adsrl-fhu.com/>

6. 研究組織
- (1)研究代表者
鍋島 俊隆 (NABESHIMA, Toshitaka)
藤田保健衛生大学・大学院保健学研究科・客員教授
研究者番号: 70076751
- (2)研究分担者
野田 幸裕 (NODA, Yukihiro)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号: 90397494
- (3)連携研究者
平松 正行 (HIRAMATSU, Masayuki)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号: 101898630
- (4)研究協力者
毛利 彰宏 (MOURI, Akihiro)
藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授
研究者番号: 20597851
- (5)研究協力者
吉見 陽 (YOSHIMI, Akira)
名城大学・薬学部・助教
研究者番号: 00637671

(6)研究協力者

肥田 裕丈 (HIDA, Hirotake)
名城大学大学院・薬学研究科・研究員
研究者番号：なし

(7)研究協力者

長谷川 章 (HASEGAWA, Sho)
名城大学大学院・薬学研究科・大学院生
研究者番号：なし

(8)研究協力者

間宮 隆吉 (MAMIYA, Takayoshi)
名城大学・薬学部・准教授
研究者番号：70340297

(9)研究協力者

尾崎 紀夫 (OZAKI, Norio)
名古屋大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：40281480

(10)研究協力者

山田 清文 (YAMADA, Kiyofumi)
名古屋大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：30303639

(11)研究協力者

北垣 伸治 (KITAGAKI, Shinji)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：20281818