

平成30年6月27日現在

機関番号：72101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01838

研究課題名(和文) 幼若期のストレス脆弱性に対する快情動による制御機構の解明

研究課題名(英文) Biological mechanisms underlying positive emotion on stress vulnerability in adolescent rat

研究代表者

堀 美代 (HORI, MIYO)

公益財団法人国際科学振興財団・バイオ研究所・専任研究員

研究者番号：90399329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：行動解析手法や生物学的手法を用いて、離乳後のラットにおける快情動の神経メカニズムを検証した。仔ラットどうしの遊び(rough and tumble play)をモデルにしたtickling刺激は、足への電撃刺激による幼若期急性ストレスや、社会隔離飼育による慢性ストレスを原因とするいくつかの行動変容を改善させた。一方、扁桃体では社会隔離飼育によって、多くの遺伝子やmiRNAが変動した。これらのストレスによる遺伝子発現変化はtickling刺激によって適正化されることが示唆された。結論として、幼若期において他個体との相互作用を伴う遊び行動が扁桃体を含む神経回路に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neural mechanisms underlying positive emotion were investigated using behavioral analysis such as open field, elevated plus maze, forced swimming and fear conditioning, and biochemical indices in post-weaning rats. Tickling stimulation, resembles the rough-and-tumble play behavior in rats, were recovered several behavior changes that were caused by electric foot-shock and/or social isolation in the open field, in the elevated plus maze, in the forced swimming and in the fear conditioning. On the other hand, social isolation altered amygdala in the adolescent rat, and many genes and microRNA were up- and down-regulated. We found that tickling stimulation could restore these stress-induced genes and microRNA expression changes in amygdala. In conclusion, positive emotion may alter directly and/or indirectly neuronal circuitry including amygdala through the play in adolescence.

研究分野：分子生物学

キーワード：Tickling 幼若期ストレス 社会隔離飼育 快情動 扁桃体 恐怖条件づけ 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

幼少期の虐待や他者との相互作用の欠如が、集団逸脱行動・非行・犯罪などの社会的問題行動の要因であると認知されている。そのため、母子間の絆形成の役割・重要性が脳科学的側面から解明されつつある。一方、仲間との遊びを通して、社会性の形成が培われることは推察できるが、何故それが良いのか、それがどのように脳や心に作用するのか、という根拠が明らかにされていない。動物における研究で、授乳期の母子隔離などの他個体との相互作用の減少は、脳内システムの発達形成・認知行動・社会性の発達に悪影響を及ぼすことが報告されている。また、Yule Wらは、ヒトにおいてもこのような幼少期の環境要因がストレス脆弱性の形成に関与し、成長後の心身の脆弱さや心的外傷後ストレス障害(PTSD)の基盤となることを指摘している。

一方、最近の研究で海馬依存的な記憶の形成には、海馬でのDNAメチル化変化が関与し、扁桃体依存的な恐怖記憶には、扁桃体でのエピジェネティクス変化の関与が示唆されている。これらのことから、申請者らは海馬や扁桃体を介する恐怖記憶やストレス応答性の構築には、幼少期の環境の影響を受け、正常な機能構築には仲間との遊びで起こる快情動の喚起に関わる報酬系の役割も重要なひとつであると考えた。

仔ラットどうしの「遊び rough and tumble play」は快情動(50kHz 超音波)を喚起させる。Gordon N. Sらの研究によって、遊びにより前頭前野および扁桃体の神経栄養因子の増強が引き起こされ、仲間との相互作用が神経新生促進に関わることが実証された。近年、他個体との絆形成におけるオキシトシン神経の関与の発見など、個体間の相互作用がもたらす共感性の神経基盤が明らかになりつつあるが、幼若期における快情動の喚起に着目した研究は少なく、その神経基盤やその作用は未だ解明されていない。

申請者らはこれまで幼少期環境の研究モデルとして、遊び(tickling)がもたらす快情動の機能に注目し、幼若期の快情動の喚起が直接脳内システム形成に良い影響を与える可能性を見出している。tickling刺激による50kHz音声の誘発と共に側坐核のドーパミンの分泌が促され、脳報酬系を介していることを実証した。また、幼若期に受ける持続的な快情動の喚起は、学習・記憶の中枢である海馬の神経新生を増加させ、視床下部のストレスや摂食調節に関わる各種ペプチド前駆体のmRNAを増加させることを見出した。さらに、拘束ストレスや恐怖条件づけに関わる自律神経系のストレス応答を軽減させ、隔離飼育が原因でおこった恐怖記憶の消去の障害を改善させること、空間学習の遅延を改善させることを見出した。また、この時期の快情動の喚起が特に扁桃体のストレス応答に関わる遺伝子群やmicroRNAの発動に寄与する可能性を捉えた。

2. 研究の目的

申請者らは、これらの結果を踏まえて、幼若期のストレスによって引き起こされる脆弱性は、快情動の喚起によって扁桃体のエピジェネティクス変化を経て修復されるという仮説を立てており、幼少期の社会環境による情動とストレス応答の発達に関する神経科学的基盤に注目し、発達に重要な快情動因子の同定とメカニズムを明らかにすることを目的とした。その為、本研究では、離乳後の幼若期急性ストレスや社会隔離飼育による慢性ストレスを受けた成熟ラットが示す行動学的特性を検証し、それらの行動変容が幼若期の快情動の喚起によって適正化されるのかを、扁桃体に着目して検証した。

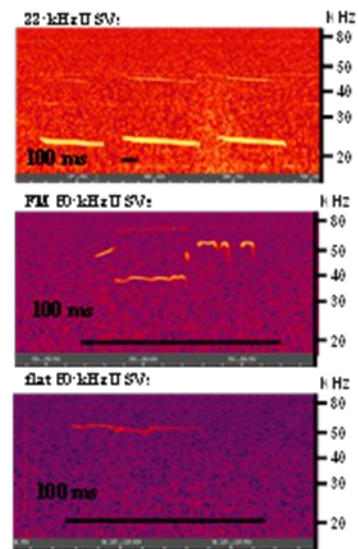
3. 研究の方法

(1) 倫理規定の遵守

本研究における全ての動物実験は、筑波大学における動物実験倫理規定を遵守し、当施設の実験動物委員会の承認を受けて実施された。

(2) tickling 刺激法

快刺激負荷は、上述の tickling 刺激(5分間/日)を施行した。仔ラットは tickling 刺激に対して快情動の指標である50kHzの音声表出を示した。ラットの音声解析は、広帯域マイクロフォンを用いて周波数成分の解析により22kHz, flat 50kHz, frequency-modulated (FM) 50kHz 音声を検出して行った(図1)。また、刺激の報酬特性は、tickling 刺激後での接近潜時(最大30秒)を測定して評価した。図1.ラット高周波音声



(3) 初期生育環境が成長後の社会行動や情動の発達に及ぼす影響

ラットにおいて幼若期の社会隔離飼育による慢性ストレスの持続中に、フットショックによる急性ストレス負荷が、成体期での行動変容にどのような影響を及ぼすのか、すなわち幼若期の慢性ストレスと急性ストレスの相乗効果について検証した。さらに隔離飼育中に tickling 刺激を施すことによって、幼若期の遊びから誘発される快情動のストレス緩和効果を検証した。

被験体および飼育条件

Fisher344/Nslc 系雄ラット(21 日齢)を用いた。集団飼育群は 3 匹ずつに 1 つのケージ内で飼育した。集団飼育ストレス負荷群 (GS 群), 隔離飼育ストレス負荷群 (IS 群), 隔離飼育ストレス負荷群 + tickling 群 (IST 群) とそれぞれの群に, 離乳後に急性ストレスを受けない統制群を設けた (GC 群, IC 群, IT 群)。

幼若期仔ラットの遊び刺激として, IST 群のラットに対して幼若期フットショック直後とその後成体になるまでの 24-56 日齢にわたって tickling 刺激を行った。統制群の IT 群にも同様に tickling 刺激を行った。成体期の各実験は 4 週間の tickling 刺激終了後, さらに 4 週間の通常飼育を行い 78 日齢以降に開始した。

幼若期急性ストレス負荷

実験 1, 2, 3 において, 幼若期急性ストレスとして足への電撃ショックの強度を変えて負荷した。

実験 1 では, ラットを装置に入れた後, 10 秒の間隔をおき, 2 回のフットショック (0.5mA, 1 秒) を与え, 2 回目のフットショックから 5 秒後にラットを装置から取り出し tickling 刺激箱に入れた。

実験 2 では, さらに強いストレスを与えるために, フットショック (0.5mA, 2 秒) を 30 秒ごとに 5 回与えた。5 回目のフットショックから 30 秒後にラットを装置から取り出し tickling 刺激箱に入れた。

実験 3 では, ラットを装置に 5 分入れた後, フットショック (0.5mA, 2 秒) を 30 秒ごとに 5 回与えた。5 回目のフットショックから 30 秒後にラットを装置から取り出し tickling 刺激箱に入れた。この電撃負荷を 3 日間繰り返した。

それぞれの統制群のラットは, 恐怖条件づけ装置に他の群と同じ時間入れた。

オープンフィールド課題

成熟期(78 日齢)のラットを, 1 匹ずつ 5 分/日, 3 日間, Tickling 刺激箱に放置し個別環境に馴化した後, オープンフィールドでの自発活動を解析し, 新奇場面における情動反応性, 探索傾向, さらに新奇場面への慣れ (馴化) を検証した。装置に 5 分間放置し, 総移動距離, 中央(3×3 区画)滞在時間, grooming 回数, rearing 回数を解析した。

高架式十字迷路課題

の実験の翌日(79 日齢)に実施した。ラットを壁のある走行路と壁のない走行路が交差する十字型のプラットホーム(床から高い位置に設置)の中央に置き, 壁のない走行路 (オープンアーム) に出てきた侵入回数と滞在時間を測定することにより不安の程度を解析する

強制水泳課題

84 日齢で実施した。ラットを脱出不可能な

円筒状のプール内(直径 30×高さ 50cm)に深さ 40cm まで水を満たし強制的に 15 分間泳がせた(強制水泳ストレス負荷)。翌日に再びラットを 5 分間強制的に泳がせた(テスト)。テスト時のプール入水後から無動になるまでの時間(回避潜時)と総無動時間を測定し解析した。この回避潜時や水泳(活動)時間の減少を指標として, 動物の「鬱状態」や「絶望状態」を測定する。

恐怖条件づけ

95 日齢で実施した。音刺激を CS (10-kHz, 65dB), foot-shock を US とした恐怖条件づけを行い, 翌日より消去装置において, 音提示 (CS) に対するフリージング反応を指標に, 消去を検証した。実験 1 では US (0.5mA, 1 秒), 実験 2 では US (0.5mA, 2 秒), 実験 3 では US (0.5mA, 2 秒, 5 回) を条件とした。消去は, ラットを装置に入れてから 120 秒ごとに 30 秒の音提示 (10kHz, 65dB) を 2 回行い, 2 回目の音提示から 120 秒後にラットを装置から取り出し飼育箱に戻した(計 7 分間)。

(4) 初期生育環境が扁桃体の遺伝子発現に及ぼす影響

集団飼育群, 隔離飼育群, Tickling 群の離乳後条件の異なる飼育下のラットの脳組織を摘出し, 網羅的解析より抽出した候補遺伝子や microRNA を PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(2) 幼若期急性ストレス負荷が幼若期の快情動表出に及ぼす影響

tickling 刺激箱に放置しただけの IC 群, IS 群では快情動の音声表出が見られなかった。一方, IT 群と IST 群では, すべてのラットにおいて, フットショック直後の tickling 刺激中からすべての施行中に 50kHz の音声表出が観察された。両群間における快情動の表出に違いは見られなかった。

(3) 初期生育環境が成長後の社会行動や情動の発達に及ぼす影響

オープンフィールド課題に及ぼす効果

・総移動距離: 幼若期急性ストレスによる有意差が見られ, GS 群, IS 群, IST 群は統制群と比較すると, 総移動距離が有意に減少した。一方, 社会隔離飼育による慢性ストレスによっては有意傾向がみられたものの, GS 群, IS 群, IST 群間, や統制群間 (GC 群, IC 群, IT 群) では有意差が見られなかった。

・中央滞在時間: 幼若期急性ストレスを負荷した群は統制群と比較して中央滞在時間が少ない傾向が見られた。一方, 社会隔離飼育による慢性ストレスによっては有意差が見られた。隔離飼育群は中央滞在時間が短かく, tickling 刺激により隔離飼育による阻害を改善する可能性が示された。

・rearing 回数: 幼若期急性ストレスによる

有意差が見られ、GS 群、IS 群、IST 群は統制群と比較すると、rearing 回数が有意に減少した。しかし、社会隔離飼育による慢性ストレスや Tickling 刺激の有無による差は見られなかった。

・grooming 回数：幼若期急性ストレスや社会隔離飼育の慢性ストレスによる差は見られなかった。

高架式十字迷路課題に及ぼす効果

・オープンアームへの侵入回数は、幼若期急性ストレスや社会隔離飼育の慢性ストレスによって有意差が見られ、GS 群、IS 群と IST 群は統制群に比べて侵入回数が少なかった。

・オープンアームへの滞在時間も、幼若期急性ストレスや社会隔離飼育の慢性ストレスによる有意差が見られた。また、最も滞在時間が短い IS 群に比べて IST 群は、有意に長く、不安行動への tickling 刺激による改善効果が示唆された。

強制水泳課題に及ぼす効果

・プールへの入水から無動になるまでの回避潜時は、幼若期急性ストレスや社会隔離飼育の慢性ストレスによる有意差が見られた。特に、隔離飼育群（IC 群、IS 群）は、集団飼育群（GC 群、GS 群）や Tickling 群（IT 群、IST 群）に比べて回避潜時間が短かった。さらに、IT 群は IC 群より、IST 群は IS 群より潜時間が長く、tickling 刺激による改善効果が示唆された。

・総無動時間についても、同様に、幼若期急性ストレスや社会隔離飼育の慢性ストレスによる有意差が見られた。隔離飼育群は集団飼育群や Tickling 群に比べて有意に総無動時間が長かった。また、IS 群に比べて IST 群は、総無動時間が短かく、tickling 刺激による改善効果が示唆された。

この2つの指標から、幼若期急性ストレスや社会隔離飼育による成体期の不安様行動への悪影響が示唆された。同時に、幼若期急性ストレスや社会隔離飼育による慢性ストレスによってもたらされた不安様行動への悪影響が tickling 刺激により改善される可能性が示唆された。

恐怖条件づけによる消去反応に及ぼす効果

・音提示前のフリージング率は、幼若期急性ストレス負荷の強度や恐怖条件づけ時の電撃の強度を変えた実験1, 2, 3のいずれにおいても、幼若期急性ストレスや隔離飼育の慢性ストレスによる有意差が見られた。集団飼育群と隔離飼育群は、幼若期急性ストレスにより有意に低下し、集団飼育の統制群である GC 群が最も高いフリージング率を示した。IT 群と IST 群は初日より低いフリージング率を示し、試行をとおして両群間で有意差はなかった。

・音提示中のフリージング率は、幼若期急性ストレス負荷の強度や恐怖条件づけ時の電

撃の強度を変えた実験1, 2, 3において応答が異なったが、強度が最も強かった実験3においては、幼若期急性ストレスや隔離飼育の慢性ストレスによる有意差が見られ、試行をとおして、集団飼育群が隔離飼育群、Tickling 刺激群より高いフリージング率を示した。また、統制群の GC 群、IC 群と IT 群では各群間でフリージング率に有意差が見られたが、幼若期急性ストレスを与えた場合、GS 群が3群間で最も高いフリージング率を示し、GS 群と IS 群間および GS 群と IST 群間では有意差が見られたが、IS 群と IST 群間では有意差が見られなかった。

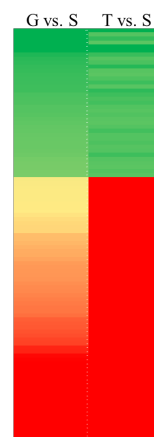
集団飼育群と隔離飼育群は、幼若期急性ストレスによりフリージング率が有意に低下し、集団飼育の統制群である GC 群が最も高いフリージング率を示した。IT 群と IST 群は初日より低いフリージング率を示し、試行をとおして両群間で有意差はなかった。

・音提示後のフリージング率は、音提示中のフリージング率と同様に、幼若期急性ストレス負荷の強度や恐怖条件づけ時の電撃の強度を変えた実験1, 2, 3において応答が異なったが、強度が最も強かった実験3においては、幼若期急性ストレスや隔離飼育の慢性ストレスによる有意差が見られ、GS 群、IS 群と IST 群はそれぞれ統制群より低いフリージング率を示し、試行をとおして、集団飼育群が隔離飼育群、Tickling 群より高いフリージング率を示した。

本実験の結果は、幼若期ストレスや、社会隔離飼育による慢性ストレスが成体後の恐怖条件づけによるフリージング反応を増加させることを示した他の研究結果と異なった。その為、さらなる検証が必要である。

(4) 初期生育環境が扁桃体の遺伝子発現に及ぼす影響

扁桃体の遺伝子発現解析により、集団飼育群（G）対隔離飼育群（S）と Tickling 刺激群（T）対隔離飼育群で発現変動した遺伝子や microRNA の中には、共通で発現変動する遺伝子が多く示された。このことは、隔離飼育により変動する遺伝子が tickling 刺激により適正化される可能性を示唆する。これらの遺伝子をクラスタリング解析した結果を右図に示した。緑色の程度は発現減少を、赤色の程度は増加の程度を示す。



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 6件)

堀美代, 村上和雄. 病気を笑いで癒やす. 体育の科学, 67, 551-554, 2017. 査読無

Ohnishi J, Ayuzawa S, Nakamura S, Sakamoto S, Hori M, Sasaoka T, Takimoto-Ohnishi E, Tanatsugu M, Murakami K. Distinct transcriptional and metabolic profiles associated with empathy in buddhist priests: A pilot study. Human Genomics, 22; 3-6, 2017. 査読有

DOI: 10.1186/s40246-017-0117-3.

Hori M, Yamada K, Ohnishi J, Sakamoto S, Ichitani Y, Murakami K. Gene expression profiling: effects of tickling on restraint stress in the adolescent rats. 動物心理学研究: 67 巻 2 号 210, 2017 年 査読無

DOI: <https://doi.org/10.2502/janip.67.2.5>

Hori M, Shimoju R, Ohnishi J, Murakami K, Kurosawa M. Dopamine receptor antagonism effect on tickling induced 50-kHz USVs in the adolescent rats in adolescent rats. 動物心理学研究: 66 巻 2 号 205, 2016 年, 査読無

DOI: <https://doi.org/10.2502/janip.66.2.9>

Hori M, Yamada K, Ohnishi J, Furuie H, Murakami K, Ichitani Y. Effects Tickling during adolescence overcomes stress vulnerability induced by isolated rearing. 動物心理学研究: 62 巻 2 号 149-2, 2015 年, 査読無

DOI: <https://doi.org/10.2502/janip.65.2.4>

村上和雄, 堀美代. 笑いや感動が遺伝子を ON にする. 癒しの環境. 20:1. 23-28, 2015. 査読無

[学会発表](計 4 件)

Hori M, Shimoju R, Ohnishi J, Murakami K, Kurosawa M. Dopamine D1 and D2/3 receptor antagonism effect on tickling induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in the adolescent rats. Society for Neuroscience 2017. 2017 年 11 月 11-15 日, Walter E. Washington Convention Center, 米国

Hori M, Ohnishi J, Yamada K, Sakamoto S, Ichitani Y, Murakami K. Gene expression profiling: effects of tickling on restraint stress in the adolescent rats. 行動 2017, 2017 年 8 月 30-9 月 1 日, 東京大学, 東京.

Hori M, Shimoju R, Ohnishi J, Murakami K, Kurosawa M. Dopamine

receptor antagonism effect on tickling induced 50-kHz USVs in the adolescent rats in adolescent rats. 日本動物心理学会第 76 回大会, 2016 年 11 月 23-25 日, 北海道大学, 札幌

Hori M, Yamada K, Ohnishi J, Furuie H, Murakami K, Ichitani Y. Effects Tickling during adolescence overcomes stress vulnerability induced by isolated rearing. 日本動物心理学会第 75 回大会, 2015 年 9 月 10-12 日, 日本女子大学 目白キャンパス, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://mind-gene.com/>

<https://www.facebook.com/mindgene.murakami>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 美代 (HORI MIYO)

(公財)国際科学振興財団・バイオ研究所・専任研究員

研究者番号: 90399329

(2) 研究分担者

村上和雄 (MURAKAMI KAZUO)

(公財)国際科学振興財団・バイオ研究所・所長

研究者番号: 70110517

大西 淳之 (OHNISHI JUNJI)

東京家政大学・家政学部・教授

研究者番号: 40261276

一谷 幸男 (ICHTANI YUKIO)

筑波大学・人間系・教授

研究者番号: 80176289

山田 一夫 (YAMADA KAZUO)

筑波大学・人間系・准教授

研究者番号: 30282312

(3) 連携研究者

坂本 成子 (SAKAMOTO SHIGEKO)

(公財)国際科学振興財団・バイオ研究所・専任研究員

研究者番号: 60419869

仙波 恵美子 (SENBA EMIKO)

大阪行岡医療大学・医療学部・教授

研究者番号: 00135691