

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11803

研究課題名(和文) 幼若期ストレスが脳発達期に及ぼす影響へのドパミン神経系の係わり

研究課題名(英文) Relation of the dopamine nervous system to the influence that early life stress gives for the development period of the brain

研究代表者

光畑 智恵子 (Misuhara, Chieko)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・准教授

研究者番号：10335664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期のストレス応答において、行動変容とdopamine神経系の係わりを明らかにするためdopamine receptor発現への変化について検討した。マウスを用いて幼若期ストレスとして出生早期に母子分離を行い、母子分離群をストレス群、非母子分離群を対照群として5週齢時ならびに12カ月齢時マウスでの比較を行った。D1R、D2RのmRNA発現量は両時期でストレス群で線条体において発現量の減少傾向が認められた。行動量に関しては5週齢時にはストレス群で対照群より増加するマウスと逆に低下するマウスもいたが、12カ月時にはストレス群での多少の減少が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児歯科では近年低年齢の重症齲蝕に遭遇する機会が増えており、治療時の協力が得られず、協力が得られるまで加療を待つことが難しい場合には体動コントロールのもと、加療する場合があります。児によってはストレスから歯科恐怖症となり、将来のQOL低下をもたらす可能性がある。小児期のストレスは脳の発達過程に影響を及ぼし、発達障害や思春期以後に発症する精神疾患と関連することが言われている。幼少期のストレスについて検討を行うことは学術的にも社会的にも意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：In a stress reply of early life, It was examined a change to dopamine receptor expression to clarify action transformation and a relation of the dopamine nervous system. It was performed mother and child separation as early life stress using a mouse in a birth early stage; mother and child separation group stress group, non-mother and child separation group as a control group for at 5 weeks of age and 12 months at an age with the mouse compared. As for the mRNA expression of D1R and D2R, a tendency to decrease of the expression was accepted in striatum in stress group at both time. In 5 weeks of age, many mice of stress group was more active than a control group and the some mouse decreased adversely about the quantity of action, but the stress group was recognized decreased action at 12 months.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

発達障害児は増加傾向にあり、当科外来受診発達障害児数も 2004 年度から 2009 年度で 1.5 倍に増加、延来院患者数比率も 5% の増加を示し、発達障害児診療の機会が増えている。一方、小児の齲蝕は減少傾向と言われる中、当科では初診患児における低年齢重症齲蝕患児で非協力を理由に紹介来院する児を含む齲蝕処置主訴来院が約 3 割 (2014 年度) を占めている。どちらの場合も発達・成長等の状況によるが歯科治療に対する理解は難しく、加療が大きなストレスとなる場合があることが予想される。特に幼少期に受けたストレスは将来の歯科受診行動に影響し、口腔からの QOL の低下に繋がることが予想される。さらに、ストレス脆弱性をもたらす精神疾患を含む全身疾患の発症に関わる可能性に含んでいる。

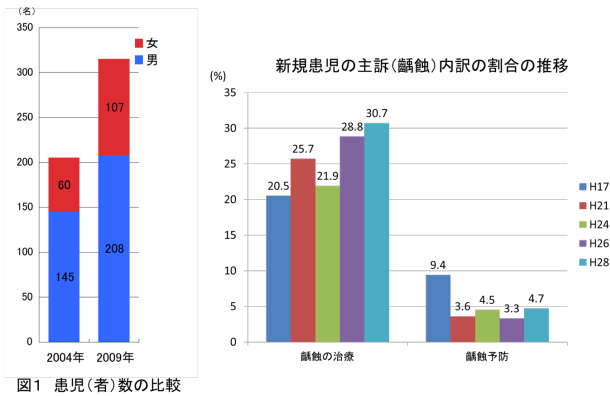


図1 患児(者)数の比較

思春期以降に高発する統合失調症や気分障害のような精神疾患に対して幼少期のストレスを成因とする神経発達障害説がある。幼若期ストレス (early-life stress, ELS) 暴露マウスにおいてストレス応答としてバゾプレッシン mRNA の発現が増加し、これは enhancer 領域の CpG アイランドで DNA メチル化の減少に伴う Methyl CpG-binding protein 2(MeCP2) の transcriptional depression が起こらなかったことによる現象で、この DNA メチル化の減少状態は増齢しても続き、ELS マウスの成長後の行動特性として記憶障害や抑うつ状態等が報告された。ストレスによる機能的な変化が長期に影響することが示されたが、DNA メチル化の減少機序ならびにその継続については十分に解明されていない。我々は、マウスを用いて ELS の影響について、多動性や不安に焦点をあて黒質線条体領域を中心に DNA メチル化に関して網羅的探索を行ったが、遺伝子レベルでのターゲットを絞ることはできなかった。しかし、Dopamine receptor の発現について real time PCR により、ELS - 正常マウス間で差があることが明らかとなった。

Dopamine 作動性神経は黒質・腹側被蓋野からそれぞれ線条体・側坐核を經由して前頭前野に投射し運動や不安に関与している。線条体では Dopamine, GABA, Glutamine 作動性神経が相互に作用する。脳の神経細胞には 1 つの細胞に多くのシナプスが存在し、他の神経細胞と神経ネットワークを形成している。noncoding RNA(ncRNA) の転写調節の関与が報告された serotonin5-HT<sub>2C</sub> receptor は dopamine 系細胞体とシナプス形成する GABA 系ニューロンに限定して発現する。正常な神経発達のためには神経のネットワーク形成も重要な要因となる。Neuron-glia related cell adhesion molecule(NrCAM) がシナプス形成に関する神経樹状突起棘濃度調整に関わり、脳神経回路の興奮 抑制性均等維持に寄与していること、Neural-neural、Neural-glia ネットワークにおいての exosome 等の細胞外 vesicle の関与、マウスの実験より神経細胞剪定異常が mTOR 阻害剤で正常化したこと等が示されている。

## 2. 研究の目的

小児歯科では近年低年齢の重症齲蝕に遭遇する機会が増えており、治療時の協力が得られず、得られるまで加療を待つことが難しい場合には体動コントロールのもと、加療する場合があります。児によってはストレスから歯科恐怖症となり、将来の QOL 低下をもたらす可能性がある。小児期のストレスは脳の発達過程に影響を及ぼし、発達障害や思春期以後に発症する精神疾患と関連することが言われている。幼若期のストレスとして出生早期に母子分離を行い、その後の行動様式から dopamine 神経系に関して検討したところ、receptor の発現に差があった。本研究ではこのストレスが MeCP2 や ncRNA などの新規の転写・翻訳制御機構に影響して receptor の

発現状態を変化させ脳の発達過程で正常な神経細胞の分化や移動を妨害し、正常な脳内ネットワークの構築を阻害し、その結果として発達遅延・異常やストレス脆弱性をもたらし将来の精神疾患発症に繋がる可能性についてマウスを用いて検討する。

### 3. 研究の方法

脳の発育過程は時間軸にそってタンパクの発現、分解に基づいた細胞の分化、誘導、移動などにより形成され、その後シナプス間にネットワークが形成されることで脳組織の構築が行われていく。幼若期のストレスによる脳発達への影響について分子生物学的および行動薬理的解析より正常発達との相違点を探索するため以下について行う。

妊娠マウスを購入後、出生翌日より母子分離を開始する。分離は午後3時間とし、短期8日間、長期20日間行った。コントロール群も含め21日目に親から分離し、飼育を継続した。5週齢目に血中のグルココルチコールの測定、並びに行動量の測定を行ったのちに断首し、脳組織を採取し、線条体は左右それぞれからRNA抽出とタンパクサンプルの調整を行った。RT-PCRを用いてターゲット遺伝子のmRNA量の定量を行い、タンパクの発現についてはwesternを用いて解析した。

また、加齢に伴う変化をあきらかにするため、12カ月目マウスについても行動量の測定を行ったのちに断首し、脳組織を採取し、線条体は左右それぞれからRNA抽出とタンパクサンプルの調整を行なった。RT-PCRを用いてターゲット遺伝子のmRNA量の定量を行い、タンパクの発現についてはwesternを用いて解析した。

### 4. 研究成果

幼若期のストレス応答において、行動変容とdopamine神経系の係わりを明らかにするためdopamine receptor発現への変化について検討を行った。

マウスを用いて幼若期ストレスとして出生早期に母子分離を行い、母子分離群をストレス群、非母子分離群を対照群とした。ddyを用いて研究を行っていたが、ストレス暴露による変化がほとんど認められなかった。ストレス研究に対してBalbが妥当とのアドバイスによりBalbを用いて実験を行うこととした。5週齢時に両群マウスより線条体・中脳を摘出し、dopamine receptor D1R, D2RのmRNA発現量についてRT-PCRにて解析し、ストレス群で線条体においてストレス群に発現量の減少傾向が認められた。サンプル摘出前に血液の採取を行い、血中コルチコステロン測定を行い、ストレス群で性状時でも高い傾向が認められた、行動量に関してはストレス群では対照群より増加するマウスと逆に低下するマウスもいたことから例数を増やして個々での検討の必要性が明らかとなった。またD2Rについてはshortとlongの2種類の発現があることからそれぞれでの発現について検討を行った。ストレス群でD2のshortの発現量が多少増加している傾向が認められた。

行動量に加えて、抑うつ状態への差があるかどうかを確認するために強制水泳(FST)等他のテストを行うこととした。加齢により症状が出る可能性を考慮し、12カ月齢時マウスを用い

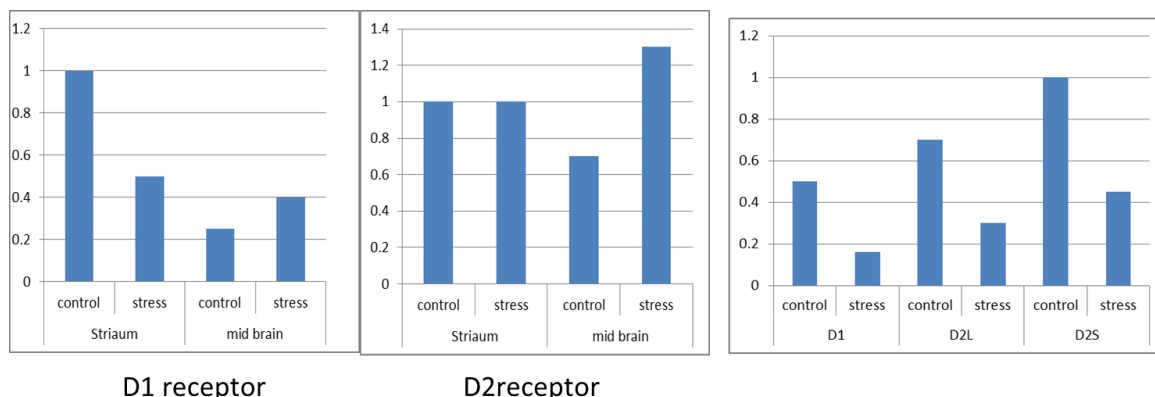


図2 5週齢時のD1, D2のmRNAの発現比 ならびに 12カ月時の線条体のmRNAの発現比

た。ストレス群において行動量は多少減少しており、FST では、不動時間が長い傾向が窺えた。D1R、D2R の mRNA 発現量変化については、5 週齢時と同様の傾向を示した。また、対照群において FST により発現の減少が認められた (図 2)。D1R、D2R の発現調整に関し、海馬では DARPP-32 の増減との関連性が報告されていることから 12 カ月齢時マウスで線条体での関連性について検討したところ、ストレス群で減少している可能性が窺えたが、例数を増やしての確認が必要であると思われた。5 カ月齢時やもっと早期のストレス時での変化についても今後検討する予定としている。

研究はまだ十分進んでなく、検討すべき項目が残されたままであり、今後、出生後に分化が進むグリア細胞への早期ストレスの影響を含め、線条体・孤束核での神経ネットワークによる相互作用について明らかにし、神経細胞ネットワーク構築へ及ぼす影響について検討を行っていく予定である。早期に暴露されるストレスは脳の発育・発達期に多大な影響を及ぼし、脳の脆弱性に関連して障害をもたらすことが報告されている。歯科治療は様々な要因から患児にストレスとなることがあり、将来の歯科恐怖症に繋がることも報告されている。最近、小児の口腔内の状態は DMF 等より多くの児において良好とされているが、一方で低年齢時より重症齲蝕となり、ストレス下での加療が必要となる児が存在している。早期ストレスの影響についての研究に対し、多少なりとも貢献していきたいと考える。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 0 件)準備中

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大原 紫

ローマ字氏名：Yukari Ohara

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院医歯薬保健学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 80634469

研究分担者氏名：岩本 優子

ローマ字氏名：Yuko Iwamoto

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院医歯薬保健学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 00748923

研究分担者氏名：香西 克之

ローマ字氏名：Katsuyuki Kozai

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院医歯薬保健学研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 10178212