

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13111

研究課題名(和文) 幼少期ストレスによる衝動的攻撃性の増大と前頭前野神経回路変化

研究課題名(英文) Effect of early life stress on impulsive aggression and neural circuit in the prefrontal cortex

研究代表者

畠 義郎 (Hata, Yoshio)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40212146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：衝動的攻撃性の制御機構とその発達過程を調べるため、まずラットにおいて前頭葉の眼窩前頭皮質を薬理的に抑制した時の行動変化を調べた。その結果、ラットにおいてもヒトと同様に眼窩前頭皮質が衝動的攻撃性の抑制に関わることを明らかにした。また幼少期ストレスの影響を調べるため、電気ショックによる身体的ストレスと社会的隔離を組み合わせた新たな動物モデルを開発した。その過程で、オープンフィールド試験での壁の高い位置へのよりかかり行動が、不安様行動の新たな指標となることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The present study explores the postnatal development of neural mechanism of impulsive aggression in rats. I examined behavioral effects of pharmacological inhibition of neural activity in the orbitofrontal cortex. The inhibition of orbitofrontal cortex increased impulsive aggression, showing that the orbitofrontal cortex suppresses impulsive aggression as reported in human. Also, I developed a novel animal model to study the effect of early life stress which combines physical stress by electric shock with social isolation. In addition, I found a novel anxiety-like behavior in the open field test, which is the leaning behavior against the wall at high position.

研究分野：発達神経科学

キーワード：前頭前野 扁桃体 神経回路 ストレス

1. 研究開始当初の背景

過剰な心理的不安、肉体的緊張に見舞われる不安障害や、衝動的攻撃性を症状に持つ境界性パーソナリティ障害などの疾患は、社会性を低下させ、患者の QOL を損なう。また、児童虐待などの不遇な体験は不安障害やパーソナリティ障害の発症リスクを増加させることが分かっている (Maniglio, *Clin Psychol Rev* 2009)。さらに、児童虐待による衝動性の増加が、虐待の連鎖につながると考えられ (Möhler et al., *Child Abuse Negl* 2009)、その解決は社会的な課題でもある。衝動的攻撃行動の発現には扁桃体が関与する (Eichelman and Burr, *J Comp Phys Psych* 1971)。また近年の脳機能画像研究により、大脳皮質前頭前野の眼窩前頭皮質 (orbitofrontal cortex, OFC) は扁桃体に投

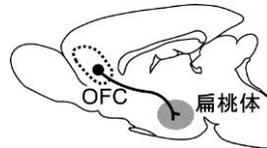


図1. 本課題で注目する OFC-扁桃体神経投射(ラット)。

射し抑制的作用を示すことで、衝動抑制機能を担うとされている (Berlin et al., *Brain* 2004) (図 1)。

一方、脳の発達には幼少期の経験が重要である。OFC の衝動抑制機能の発達についても、幼少期にスキミングを受けることが重要であると提唱されている (Schore, *Attach Hum Dev* 2000)。逆に、衝動的攻撃性を症状にもつ精神疾患では OFC の活動が低く、これは幼少期の虐待などが原因であると推測されている (Goodman et al., *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 2004)。このことから、幼少期の環境により OFC を含む衝動抑制の神経機構に変化が生じ、その後の精神疾患や問題行動の基盤になる可能性がある。幼少期に形成された人格は「三つ子の魂百まで」と言われるように容易に変化するものではない。不適切な行動特性が固定されると、それはその後の回復の妨げとなり、さらに育児を介して次世代に連鎖する原因ともなるため、きわめて大きな問題である。しかし、幼少期に形成された行動特性がどのように固定されるかは未だ不明である。

感覚系の研究はこの疑問にヒントを与える。感覚系神経回路は生後発達期の経験に適応的に成熟する。その際、よく活動する回路は強化・維持され、あまり使わない回路は除去される。例えば研究代表者がこれまで研究してきた視覚系では、幼少期に一方の眼を遮

蔽すると、大脳皮質はその眼に対する反応性を失い弱視となる。さらに遮蔽眼からの情報を運ぶ神経投射が退行するため、弱視という機能変化が神経回路として固定されてしまい、その後の機能回復の大きな妨げとなる。このことから、衝動的攻撃性のような高次の行動特性も幼少期に神経回路の在り様として脳に刻印されるのではないかと考えた。例えば、衝動抑制を担う神経回路が退行することが、衝動的攻撃性の増大を固定するのではないかという可能性である。

しかしこれまでの衝動的攻撃性と OFC の関係についての報告には次のような問題点がある。

- ・げっ歯類幼少期ストレスモデルの妥当性
既報の幼少期ストレスモデルとしては育児放棄、あるいは身体的虐待モデルがある (Konno et al, *Brain Res* 2006; Haller et al., *J Neuroendocrinol* 2014)。しかし、これらは虐待の 1 つの要素しか満たしていない。児童虐待は育児放棄と身体的虐待が複合など、複数の要素が重複している場合が多く、児童に対する影響も重大である (Ney et al., *Child Abuse Negl* 1994)。そのため、虐待の複数の要素を満たす動物モデルがより望ましい。
- ・ヒトとげっ歯類の間での OFC の機能の相同性
ヒトにおいては OFC が不安・衝動的攻撃性に関与すると報告されている。しかし、げっ歯類において、OFC と不安・衝動的攻撃性との関連を調べた研究が少なく、その関与は不明な点が多い。

2. 研究の目的

そこで申請者はげっ歯類 (ラット) をモデルに、不安や衝動的攻撃性の抑制回路の発達メカニズム、およびストレスの影響について、次の 3 点を目標として研究を遂行した。

- (1) 幼少期のラットに育児放棄・身体的ストレスを同時に与えた新規ストレスモデルの開発。
- (2) ラット OFC 機能の薬理的阻害が不安・衝動的攻撃性へ与える影響の解析。

以上により現在の問題点を解決した上で、(3) 衝動的攻撃性の抑制に関わると想定される OFC から扁桃体への神経投射に注目し、その投射軸索を可視化し、形態をの解析する方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 幼少期のラットに育児放棄・身体的スト

レスを同時に与えた新規ストレスモデルの開発

幼少期のラットを単独で飼育し、仲間とのコミュニケーションを剥奪した（図 2、隔離飼育：育児放棄の動物モデル）。それに加え、同期中に慢性的にフットショックを与えた（1日当たり数十秒）。成熟後に不安傾向、衝動的攻撃性などをオープンフィールド試験と電気ショック誘発闘争試験などにより行動学的に評価した。

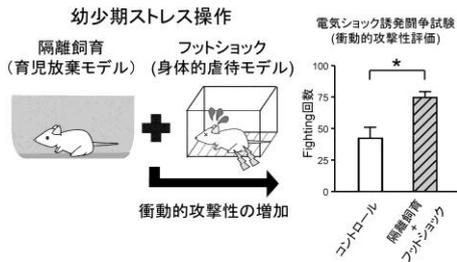


図 2. 本課題の新規幼少期ストレスモデル

(2) ラット OFC 機能の薬理的阻害が不安・衝動的攻撃性へ与える影響の解析

ラット OFC に GABA_A 受容体の作動薬であるムシモールを浸透圧ポンプで 1 週間持続的に注入し、慢性的に神経活動を抑制した。その期間中に不安傾向、衝動的攻撃性などを評価する行動解析を行った（図 3）。

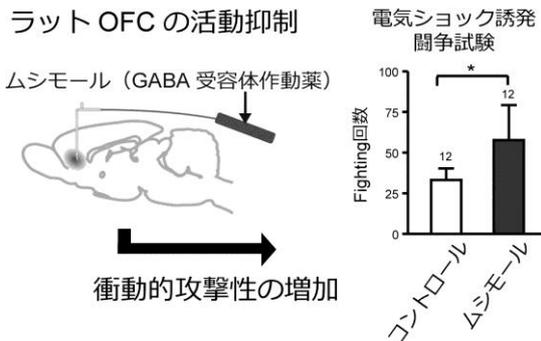


図 3. ラット OFC の活動抑制が衝動的攻撃性に与える影響

(3) OFC から扁桃体への投射軸索を可視化、解析方法の確立

ラット OFC に順行性神経トレーサーとしてビオチン化蛍光デキストランアミン (10kD, mini-Ruby) を電気泳動的に微量投与した。脳を薄切標本とし、ABC 法によりトレーサーを可視化した。

4. 研究成果

(1) 幼少期のラットに育児放棄・身体的ストレスを同時に与えた新規ストレスモデルの開発

幼少期に隔離飼育とフットショックを与えられたラットは高い不安傾向と衝動的攻撃性を示した（図 2、第 40 回日本神経科学大会）。このような行動異常は被虐待児が示す不安障害の発症、高い衝動性・暴力性などの行動特性に類似していると考えられる。

種々の行動学的評価を行う中で、これまで報告されていない不安様行動の行動指標を見出した。オープンフィールド試験においては壁への寄りかかり行動が見られる。これは立ち上がり行動とともに探索行動と考えられてきた。しかし不安様行動が増大すると予想される環境（明るい環境など）で、壁の高い位置によりかかる行動が特異的に増加する傾向が見られた。一方、立ち上がり行動は、明るい環境では減少した。さらに壁高位置へのよりかかり行動は抗不安薬により減少することから不安様行動と考えられた。従来より不安様行動の指標とされてきた中央領域での滞在時間と、壁高位置へのよりかかり行動を、オープンフィールドの明るさに対する反応について比較したところ、より暗い環境（10-75 lux）では、壁高位置へのよりかかり行動の方がはより敏感な指標となりうることが分かった（Kuniishi et al., Neurosci Res 2017）。

(2) ラット OFC 機能の薬理的阻害が不安・衝動的攻撃性へ与える影響の解析

まず、ムシモール投与により投与部位近傍の OFC 領域で神経活動が抑制されていることを、電気生理学的に確認した。

行動学的解析の結果、OFC を慢性的に抑制されたラットは、リンゲル液を投与したコントロール動物に比べて、オープンフィールド試験と明暗試験において高い不安傾向を示した。また電気ショック誘発闘争試験において高い衝動的攻撃性を示した（図 3、Kuniishi et al., Front Behav Neurosci 2017）。一方、強制水泳試験では OFC 抑制群はうつ様行動の減少を示した。

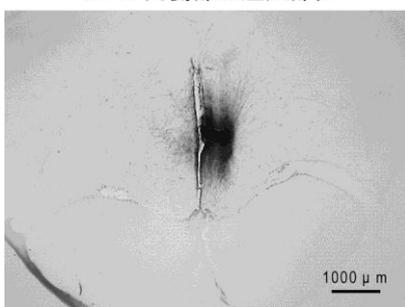
この結果より、ラットにおいても OFC が不安、衝動的攻撃性の抑制機能を担っていることが示唆される。

以上2つの結果を併せて考えると、幼少期の隔離&フットショックストレスによってOFC内の不安・衝動的攻撃性を抑制する神経回路の異常が起きている可能性が示唆される。

(3) OFC から扁桃体への投射軸索を可視化、解析方法の確立

トレーサー注入後の生存期間やトレーサーの呈色方法について種々の条件を検討した結果、10-14日の生存期間とチラミド増感法により扁桃体内に良好な標識軸索を観察できた(図4)。今後はまず正常軸索の形態を解析してゆく予定である。

OFC 内側部の注入部位



扁桃体内の標識軸索

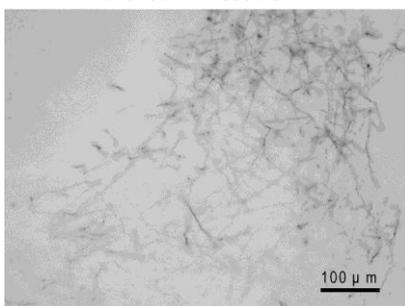


図4. OFC から扁桃体への投射軸索の標識

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2件)

① Kuniishi H., Ichisaka S., Yamamoto M., Ikubo N., Matsuda S., Futora E., Harada R., Ishihara K. and Hata Y. "Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats." *Neurosci. Res.* 123:27-35 (2017), 査読有, doi: 10.1016/j.neures.2017.04.012

② Kuniishi H., Ichisaka S., Matsuda S.,

Futura E., Harada R. and Hata Y. "Chronic inactivation of the orbitofrontal cortex increases anxiety-like behavior and impulsive aggression, but decreases depression-like behavior in rats." *Front. Behav. Neurosci.* 10:250 (2017), 査読有, doi: 10.3389/fnbeh.2016.00250

[学会発表] (計2件)

① 窪堀 希、一坂吏志、國石 洋、松田紗衣、太等恵里、原田里穂、石原康平、畠 義郎「ラットにおける新規幼少期ストレス負荷による行動、コルチコステロン、脳構造への影響と治療法の検討」第40回日本神経科学大会(2017/07/20-23、幕張メッセ、千葉市)

② 國石 洋、一坂吏志、松田紗衣、太等恵里、原田里穂、石原康平、窪堀 希、福田世実、畠 義郎「不安・うつ様行動、衝動的攻撃性へのラット眼窩前頭皮質の関与」第59回日本神経化学学会大会(2016/09/08-10、福岡国際会議場、福岡市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

畠 義郎 (HATA, Yoshio)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40212146

(2)研究分担者

一坂 吏志 (ICHISAKA, Satoshi)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50359874