

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07481

研究課題名(和文) 幼少期ストレスによる神経回路変容が引き起こす心身異常の総合的理解

研究課題名(英文) Psychosomatic and physical abnormalities caused by altered neural circuits due to childhood stress

研究代表者

宮園 貞治 (MIYAZONO, Sadaharu)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50618379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：幼少期に虐待やネグレクト(育児放棄)などの過剰なストレスを継続的に経験すると、将来、不安障害などの精神疾患の発症率が高くなるだけでなく、心臓病などの身体疾患の罹患率も大きく上昇すると言われている。本研究では、母仔分離ストレス負荷マウスを用いて、幼少期ストレスによって精神と身体に異常を発症する神経回路の変容機序の解明を目的とした。その結果、幼少期ストレスにより、扁桃体や側坐核等の神経回路に異常が生じ、嫌悪情動が弱くなることが示唆された。また、オキシトシンシグナルは、嫌悪情動の緩和に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会では、核家族化による周囲からの孤立や経済的困窮などの様々な背景から虐待やネグレクトが容易に起こり得る。その過剰なストレスによる心身の異常を理解し、その原因を解明するためには、神経回路の変容機序の正確な理解が求められる。本研究成果は、神経回路から誘発されるヒトを含めた動物の行動・内分泌・自律神経性の反応という体全体の生理学の解明、そして、心身疾患に対する新たな予防・治療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Experience of excessive stress such as abuse or neglect in childhood could induce increases in incidence of physical diseases such as heart disease as well as increases in the incidence of mental disorders such as anxiety disorders in the future. In this study, we aimed to elucidate the mechanism underlying the neural circuits altered by childhood stress using mice subjected to stressful mother-pup separation. The childhood stress could induce abnormalities in neural circuits in the amygdala and nucleus accumbens, resulting in reducing of aversive emotions. Also, oxytocin signaling was suggested to contribute to the reduction of aversive emotion.

研究分野：動物生理学

キーワード：ストレス 幼少 母仔分離 扁桃体 神経活性 恐怖 ネグレクト オキシトシン

1. 研究開始当初の背景

現代社会では、核家族化による周囲からの孤立や経済的困窮などの様々な背景から虐待やネグレクト（育児放棄）が起こり得る。幼少期に虐待やネグレクト（育児放棄）などの過剰なストレスを継続的に経験すると、将来、うつ病や心的外傷後ストレス症候群（PTSD）、パニック障害などの不安障害といった精神疾患の発症率が高くなることが疫学的に知られている。同時に、心臓病や肺がんの罹患率も大きく上昇すると言われている。このように、幼少期に受けたストレスが、将来にわたって、精神と身体の両方への異常発症リスクの増大に繋がることは、社会問題の一つである。

幼少期ストレスによる脳内神経回路の変容については不明な点が多い。これまでの報告により、例えば、実験動物ラットに、幼少期に母仔分離ストレスを与えると、成熟時に視床下部のオキシトシン発現量が減少するとともに、攻撃・不安行動が増加し、社会性行動が減少する（de Souza et al., 2013）。ヒトにおいては、幼少期に虐待やネグレクトを経験すると、血中オキシトシン濃度が低下する（Fries et al., 2005）。これらのことから、幼少期ストレスが情動・社会性障害を発症する機序にはオキシトシンの関与が示唆されているが、その脳内神経回路の変容についてはいまだ不明な点が多い。また、自閉症スペクトラム障害の患者では、オキシトシン点鼻薬によって社会性行動が改善することから（Watanabe et al., 2014）、オキシトシンの情動や社会性障害などに対する有用性が指摘されている。しかし、その作用機序は不明で、その効果についてもいまだ疑問視されている。

本研究では、動物実験の情動の評価方法のひとつとして天敵臭による恐怖反応を解析した。動物が生存していく上で、危険に対して恐怖を感じて適切に対応することは重要である。匂いによる先天的な恐怖情動は行動・内分泌・自律神経を制御する神経回路を駆動する。天敵の糞尿やその有効成分（カイロモン）は、天敵に遭遇した経験がないマウスなどの実験動物に対して、すくみなどの行動性、ストレスホルモンなどの内分泌性、血圧調節などの自律神経性といったさまざまな恐怖反応を引き起す。この先天的恐怖はヒトでも誘起されることから（Groot et al., 2012）、恐怖情動を誘起する脳内神経回路は様々な動物で共通すると考えられる。この神経回路は徐々に解き明かされつつある。我々は、オオカミの尿から同定したカイロモンであるアルキルピラジン化合物を用いて（Osada et al., 2014）、複数の匂い情報が扁桃体を介して統合されて強い恐怖反応を引き起すことを報告した（Miyazono et al., 2016）。

2. 研究の目的

本研究の目的は、幼少期ストレスによって精神と身体に異常を発症する神経回路の変容機序の解明である。そのために、幼少期母仔分離ストレスを与えたマウスにおいて、恐怖反応を測定し、その反応特性を同定した。また、免疫組織化学的手法により、活性化される神経回路を同定した。さらに、オキシトシン機能欠損による情動の変異について同定した。また、天敵臭による恐怖反応を情動解析としてより確立させるために、その恐怖特性をより詳細に同定した。

3. 研究の方法

(1) 母仔分離ストレスによる情動感受性の変化

3種類のアルキルピラジン化合物 2,6-dimethylpyrazine、trimethylpyrazine、3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine は東京化成工業から購入し、これらピラジン化合物の混合物を天敵臭の匂いとして用いた。また、酪酸は富士フィルム和光純薬から購入し、嫌悪臭として用いた。

匂い物質に対する恐怖反応における行動の変化を評価した。恐怖反応におけるマウスの行動の変化を調べるために、匂い物質を置いたテストケージ内でのマウスの行動を記録した。その記録から、匂い物質への忌避・接近・すくみ・危険確認などの行動を定量した。また、匂い物質によって活性化された脳内神経回路を同定するために、匂い物質に暴露したマウスの脳切片に対して c-Fos 免疫組織化学染色を行った。なお、C57BL/6J のオスマウスに対して、幼少期ストレスを負荷させるために、生後1～21日の間母親不在の環境下で飼育した。

(2) オキシトシンの機能欠損による情動の変異

Y字型迷路（図1）を用いて、オキシトシン受容体欠損マウスにおける嗅覚情動異常について調

べた。具体的には、Y字型迷路の片側に嫌悪臭である酪酸を置き、回避率を測定した。同様の測定を連日繰り返し、回避率がどのように変化するかを野生型マウスと比較した。



図1. Y字型迷路。片方の短腕に嫌悪臭である酪酸を置き、回避率を測定した。

(3) 天敵臭による恐怖情動に対する抗不安薬の影響

抗不安薬エチゾラムの恐怖反応のうちの体表面温度の低下（自律神経性の変化の指標）に対する効果を調べた。そのために、エチゾラムを経口投与したマウスにおける体表面温度の測定を行うため、赤外線デジタルサーモグラフィカメラで撮影・温度解析を行った。また、脳内神経回路活性についても同定するため、天敵臭に暴露したマウスの脳切片に対して c-Fos 免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

(1) 母仔分離ストレスによる情動感受性の変化

匂い物質に対する恐怖反応について評価するために、匂い物質を置いたテストケージ内でのマウスの行動解析を行った。その結果、母仔分離ストレスを負荷したマウスにおいて、嫌悪臭に対する忌避行動が消失した（図2）。一方、天敵臭に対する忌避行動には変化が見られなかった。この結果は、母仔分離ストレスにより嫌悪情動の神経回路に異常が生じ、本来嫌うはずの匂いを嫌わなくなったと推察される。そこで、嫌悪臭によって活性化された脳内神経回路を同定するために、嫌悪臭に暴露したマウスの脳切片に対して c-Fos 免疫組織化学染色を行った。

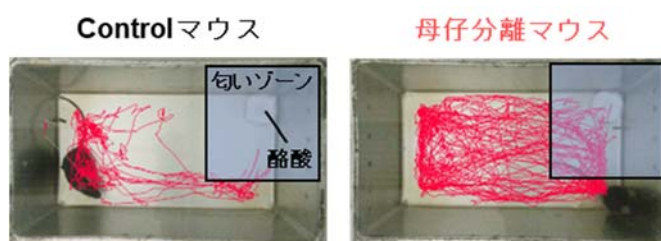


図2. 匂いに対する行動の軌跡。母仔分離ストレス負荷マウスでは忌避行動が消失した。

その結果、母仔分離ストレス負荷マウスでは、扁桃体基底外側部・中心部や側坐核などの活性シグナルが減少していたのに対して、嗅球や梨状皮質でのシグナルは変化しなかった。この結果は、母仔分離ストレスにより嗅覚機能に関連する脳部位に変化はなかったが、情動と関連する脳部位の機能は低下することが示唆される。

(2) オキシトシンの機能欠損による情動の変異

オキシトシン受容体欠損マウスにおける嗅覚情動異常を同定するために、Y字型迷路を用いて嫌悪臭に対する回避率の測定を連日繰り返し行った。その結果、野生型マウスでの嫌悪臭に対する回避率は、1日目は高く、日に日に低下して回避しなくなった。一方、オキシトシン受容体欠損マウスでは、回避行動が継続的に見られ、回避率の低下は見られなかった。この結果から、オキシトシンが本能的な危険忌避の緩和に寄与することが示唆される。

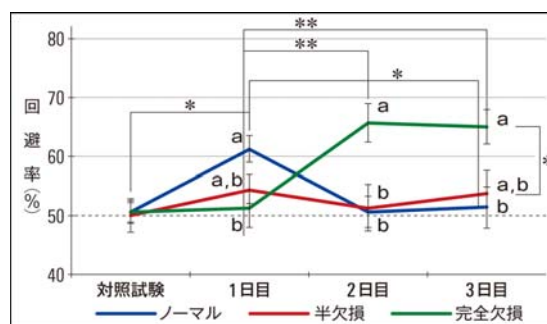


図3. 時間の経過に伴う回避率の変化。オキシトシン受容体完全欠損マウスでは、回避行動が緩和されなかった。

(3) 天敵臭による恐怖情動に対する抗不安薬の影響

抗不安薬エチゾラムの天敵臭による恐怖反応に対する効果を調べた。特に恐怖反応のうちの体表面温度に着目した。その結果、エチゾラムを経口投与したマウスでは、天敵臭による体表面温度の低下がほとんど見られなかった。その際、脳内の扁桃体（基底外側部・中心部）の活性シグナルは大きく減少し、その下流である視床下部におけるシグナルも低下したが、梨状皮質のシグナルには変化が見られなかった。この結果は、天敵臭による恐怖情動は扁桃体にエチゾラムのような抗不安薬が作用することで影響を受けるタイプの恐怖であることが示唆される。

引用文献

de Groot JHB, Smeets MAM, Kaldewaij A, Duijndam MJA, Semin GR. (2012) Chemosignals

- communicate human emotions. *Psychol. Sci.* 23:1417–1424.
- de Souza EO, Tricoli V, Roschel H, Brum PC, Bacurau AVN, Ferreira JCB, Aoki MS, Neves Jr M, Aihara AY, da Rocha Correa Fernandes A, Ugrinowitsch C. (2013) Molecular adaptations to concurrent training. *Int. J. Sports Med.* 34:207–213.
- Fries ABW, Ziegler TE, Kurian JR, Pollak SD. (2005) Early experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulating social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:17237–17240.
- Miyazono S, Osada K, Sasajima H, Noguchi T, Kashiwayanagi M. (2016) The main olfactory and vomeronasal systems modulate fear of predator wolf odor, pyrazine analogs. *Chemical senses* 41:E144.
- Osada K, Kurihara K, Izumi H, Kashiwayanagi M. (2013) Pyrazine analogues are active components of wolf urine that induce avoidance and freezing behaviours in mice. *PLoS One* 8:e61753
- Watanabe T, Abe O, Kuwabara H, Yahata N, Takano Y, Iwashiro N, Natsubori T, Aoki Y, Takao H, Kawakubo Y, Kamio Y, Kato N, Miyashita Y, Kasai K, Yamasue H. (2014) *JAMA Psychiatry* 71:166–175.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Osada K, Miyazono S, Ohata M, Noguchi T, Kashiwayanagi M	4. 巻 85
2. 論文標題 Changes in gaseous concentration of alkylpyrazine analogs affect mouse avoidance behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2343-2351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiga H, Wakabayashi H, Washiyama K, Noguchi T, Hiromasa T, Miyazono S, Kumai M, Ogawa K, Taki J, Kinuya S, Miwa T	4. 巻 57
2. 論文標題 Thallium-201 imaging in intact olfactory sensory neurons with reduced presynaptic inhibition in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4989-4999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-020-02078-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 野口智弘, 笹島仁, 宮園貞治, 志賀英明, 三輪高喜	4. 巻 27
2. 論文標題 嗅覚障害の発症機序の違いによって異なる嗅球シナプスの可塑性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 39-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazono S, Hasegawa K, Miyazaki S, Sakakima H, Konno S, Meguro S, Sasajima H, Noguchi T, Osada K, Kashiwayanagi M	4. 巻 824
2. 論文標題 Etizolam attenuates the reduction in cutaneous temperature induced in mice by exposure to synthetic predator odor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 157-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2018.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osada K, Ohta T, Takai R, Miyazono S, Kashiwayanagi M, Hidema S, Nishimori K	4. 巻 7
2. 論文標題 Oxytocin receptor signaling contributes to olfactory avoidance behavior induced by an unpleasant odorant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio029140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.029140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osada K, Miyazono S, Kashiwayanagi M	4. 巻 43
2. 論文標題 Structure-activity relationships of alkylpyrazine analogs and fear-associated behaviors in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Ecology	6. 最初と最後の頁 263-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10886-017-0822-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwayanagi M, Miyazono S, Osada K	4. 巻 3
2. 論文標題 Pyrazine analogues from wolf urine induced unlearned fear in rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2017.e00391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 野口智弘, 笹島仁, 宮園貞治, 柏柳誠	4. 巻 57
2. 論文標題 動物はひとつの匂いをふたつの鼻で嗅ぐ	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 23-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 野口智弘, 笹島仁, 宮園貞治, 高草木薫
2. 発表標題 ドパミン介在神経の特異的減少によって生じる嗅球シナプス応答の代償性振幅増加
3. 学会等名 第101回日本生理学会北海道地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮園貞治, 野口智弘, 笹島仁, 長田和実
2. 発表標題 マウスにおける2つの嗅覚系を介した天敵臭ピラジン化合物刺激に対する恐怖反応の制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田和実, 宮園貞治, 野口智弘, 柏柳誠
2. 発表標題 アルキルピラジン化合物の気相中濃度の経時的変化はマウスの忌避反応に影響を与える
3. 学会等名 日本味と匂学会第54回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osada K, Miyazono S, Noguchi T, Kashiwayanagi M
2. 発表標題 Changes in gaseous concentration of alkylpyrazine analogues affect mouse avoidance behavior
3. 学会等名 21th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮園貞治、長田和実、野口智弘、笹島仁、柏柳誠
2. 発表標題 マウスにおける主嗅覚・鋤鼻系を介した天敵臭ピラジン類に対する恐怖反応を制御する視床下部の神経活性
3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口智弘、志賀英明、宮園貞治、笹島仁、三輪高喜、柏柳誠
2. 発表標題 ロテノン鼻腔内投与後の急性期におけるマウス嗅神経興奮性の変調
3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮園貞治、長田和実、野口智弘、笹島仁、柏柳誠
2. 発表標題 マウスにおける主嗅覚・鋤鼻系を介した天敵臭ピラジン類に対する恐怖反応の制御
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田和実、太田亨、高井理衣、宮園貞治、西森克彦、柏柳誠
2. 発表標題 オキシトシン受容体欠損マウスで観察される嗅覚行動異常に対する修飾因子について
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noguchi T, Miyazono S, Kashiwayanagi M
2. 発表標題 Cycle duration-modulated information transfer of olfactory and vomeronasal sensory neurons in mice
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮園貞治、長田和実、笹島仁、野口智弘、柏柳誠
2. 発表標題 マウスにおける2つの嗅覚系によって誘発される天敵臭ピラジン類に対する先天的恐怖反応
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮園貞治、笹島仁、野口智弘、長田和実、柏柳誠
2. 発表標題 抗不安薬エチゾラムのオオカミ尿由来のピラジン誘導体によるマウス皮膚温度低下の抑制
3. 学会等名 日本味と匂学会第51回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長田和実、宮園貞治、柏柳誠
2. 発表標題 アルキルピラジン類似体の恐怖誘起作用の構造活性相関
3. 学会等名 日本味と匂学会第51回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長田和実、宮園貞治、西森克彦、柏柳誠
2. 発表標題 不快臭に対する嗅覚行動に及ぼすオキシトシン受容体の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

旭川医科大学研究者総覧 https://hyouka04.asahikawa-med.ac.jp/html/100000387_ja.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------