

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590702
 研究課題名（和文） ソーシャルストレスによる遺伝子発現異常の解析（乳仔期ストレス有無の影響）
 研究課題名（英文） Effects of the chronic social stress on behavior and gene expression in the brain
 研究代表者
 石毛 敦（ISHIGE ATSUSHI）
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：20383705

研究成果の概要：

現代社会において問題視されている社会的ストレス、特に“いじめ”を想定したストレス実験系を構築した。それが与える影響さらには予防・治療法を解明していくことを目的とした。本ストレス負荷により海馬脳神経栄養因子（BDNF）とグルココルチコイドレセプター（GR）関連遺伝子の発現上昇と恐怖記憶の獲得（不安様症状）が起こることを突き止めた。本ストレス負荷による BDNF mRNA 発現上昇を伴った不安は柴胡加竜骨牡蠣湯で改善できる可能性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：ストレス、行動異常、遺伝子発現、マウス、SSRI、漢方薬、柴胡加竜骨牡蠣湯

1. 研究開始当初の背景

いじめのような社会的ストレスが生体に与える影響について当時は明らかになってはいなかった。そのため、慢性的に社会的ス

トレスを負荷する方法を開発する必要性に迫られており、さらにその影響を検討することで、いじめなどの社会的ストレスが与える影響を検討する必要性が高かった。

また、社会的ストレス負荷方法を開発すると同時にストレス脆弱性についても検討する必要性があった。つまり、最近の若者の異常行動として指摘されている所謂「切れる」という行動の原点は何処にあるのかと言う命題であった。

2. 研究の目的

本研究目的は社会的恐怖ストレス (SDS) が長期に負荷された場合の生体への影響を行動学的および分子生物学的に検討しようというものである。また、近年若者の「切れる」という異常行動が問題視されており、その原因が何時の時点にあるのかを検討することも目的とした。ここでは、育児中の母マウスのストレスに注目した。

さらには、ソーシャルストレスを長期に負荷されたときの症状に対し抗うつ薬や漢方薬がどのような効果があるのかを検討することを3つめの目的とした。

3. 研究の方法

SDS 長期負荷方法

ICR系マウスへの SDS 負荷は4週間行った。小ケージに ICR系マウスと EL マウスを1匹ずつ入れ、1日1時間 fighting を行った。fighting 終了から翌日の fighting までの間、fighting を行ったマウス同士を、透明なしきりを使って二匹飼いし、sensory contact を行った。SDS 負荷における ICR系マウスと EL マウスの組み合わせは毎日変更した。

恐怖条件付け試験

4週間の SDS 負荷終了1日後、恐怖条件付け試験を行った。恐怖条件付け試験には、video tracking of fear conditioning system (Med Associates, Inc) を用いた。ICR系マウスをグリッド床の conditioning chamber に入れ、90秒おきに 0.8 mA の foot shock を2回与えた。24時間後、同マウスを同じグリッド床の上に乗せ、180秒間の行動を記録した。この間に示したすくみ行動の時間を video freeze software (Med Associates, Inc) で解析し、180秒間におけるすくみ行動時間の割合 (%) を算出した。

海馬における遺伝子発現

SDS 負荷終了3日後、ICR系マウスを断頭器を用いて断頭した。その後、脳から海馬を摘出し、網羅的遺伝子発現解析 (GeneChip) を行い、さらに有意差のあった遺伝子に関しては RT-PCR 法にて確認した。

統計処理

データは、平均 ± 標準偏差 (mean ± S.D.) として表示した。統計学的有意差検定には t 検定を用い、危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) の場合に有意な差があったとした。

母親への拘束ストレス負荷

出産日当日を Postnatal day (PND) 0 と

し、PND1~21の3週間毎日、1日3hr(9:30~12:30)の拘束ストレスを母マウスに負荷した。拘束には、5mm幅の切込みを1本縦に入れた50mLファルコンチューブを用いた。control群は母マウスに仔を自由に飼育させた。母親への拘束ストレス負荷が終了した翌日(PND22)3週齢にて離乳させ雌雄別々のケージに移した。

4. 研究成果

<恐怖条件付け試験>

コントロールマウスのすくみ行動時間(不安行動)は、180秒間のうち平均80秒(44%)であった。一方、SDS負荷マウスのすくみ行動時間は平均120秒(67%)であり、SDS負荷により、すくみ行動時間の有意な増加が認められた。長期のSDS負荷は不安行動を増加させることが明らかとなり、これがある種のいじめのストレスと類似点があると仮定すると、いじめのストレスは不安を増加させ、それが相乗的に蓄積され精神疾患へとつながる可能性を示唆するものである。

海馬における遺伝子発現

GeneChip解析の結果、特徴的な変化としては、海馬においてGR mRNA発現量が上昇し、BDNF pathway上の遺伝子群は軒並み上昇していた。

これまでのストレスに関連した論文では、ストレス負荷群におけるBDNF mRNAの減少を報告しているものはあれど、上昇の報告はない。では、BDNF mRNAの上昇がどのような際に引き起こされるかを検索したところ、我々の状況とリンクする可能性のある報告として「恐怖記憶の固定」があった。そこで、今回の我々のソーシャルストレス実験においてもこの「恐怖記憶の固定」が起きている可能性を探るべく、同様の時間ポイントにおいて恐怖記憶の有無を調べる「恐怖条件付け試験」を行った。その結果、2週と4週においてストレス負荷群のすくみ行動時間が増加した。BDNF mRNAは1週の時点で上昇していることから、遺伝子と行動の時間的相関性は見られなかったが、恐怖記憶の固定に先立ちBDNF関連遺伝子発現が増加し始めることを確認した。従って、SDS負荷により恐怖の固定が起こり、その際BDNFが強く関与していることが考えられた。

この結果は、BDNFの増加が関与するストレス疾患もあり得る可能性を示唆するものである。言い換えればSSRI等の抗うつ薬はセロトニン量を増すことで結果的にはBDNF発現量を増加させ、うつ症状を改善するとされているが、BDNFが発症に関与する場合、今回は恐怖による不安行動であったが、抗うつ薬が無効な場合も存在することを物語るもので臨床上意義深い結果を得ることが出来た。

< 母親への拘束ストレス負荷 >

子育て中に母子分離ストレスを子に負荷すると大人になり、不安行動などの異常行動を呈するとの論文が数多く報告されている。我々も追試験を兼ね母子分離ストレスによる影響を観察してきたが、母子分離ストレスは母親の違いによって様々な反応を起こすことを確認した。つまり、ある母親が育てた場合には母子分離ストレスによって子供の不安を生じるが、別の母親に育てられた場合には母子分離ストレスを負荷されても全く不安を生じない子供もいることが分かり、むしろ母親側の要因のほうが大きいのではないかという考えに至った。そこで、子育て中の母親マウスに拘束ストレスを出産翌日より負荷し、子供が8週以上の大人になってから行動を観察した。その結果子供の顕著な行動異常は認められなかったが、子供の成長障害を生じることを初めて明らかにすることが出来た。母親にストレスを負荷することにより、子供に間接的ではあるが、母親のストレスの影響がおよび成長障害を惹起することを世界で初めて確認することが出来た。

< ストレスを受けた母親に育てられたマウス(8週齢)のソーシャルストレスの影響 >

母親のストレスは子の成長障害という形で具現化されることが明らかとなったが、行動学上は顕著な異常行動は認められなかった。そこで、後のストレスとしてソーシャルストレスを、拘束ストレスを受けた母マウスに育てられた子マウス(8週齢)に負荷し、母親ストレスの影響を検討した。その結果、今回の条件ではむしろソーシャルストレスによる恐怖不安は弱められるような結果が得られた。母ストレスにより何らかの影響を受ける可能性が示唆されたため、条件を変え詳細な検討の必要性を感じた。

< 4週間ソーシャルストレス負荷された病態に対する漢方薬と抗うつ薬の作用 > (恐怖条件付けテストでの結果)

4週間のソーシャルストレスは、恐怖条件付けテストでの無同時間を有意に延長した。長期のソーシャルストレス負荷は不安を増強させることがわかった。この増強した不安に対し抗うつ薬(フルボキサミン)と漢方薬(柴胡加竜骨牡蛎湯)の効果を比較検討した。その結果、本モデルでは、抗うつ薬であるフルボキサミンは抗不安効果を示さなかったが漢方薬の柴胡加竜骨牡蛎湯では著明な抗不安効果が認められた。同時期に測定した海馬でのBDNF mRNA発現は4週間のソーシャルストレス負荷により、mRNA発現上昇が認められ、柴胡加竜骨牡蛎湯により発現が正常レベルまでに改善していた。しかし、フルボキサミンでは同改善効果は認められなかった。本研究の結果、BDNFの上昇を伴う不安症状が存在する可能性を示唆することができ、そ

のような不安症状は抗うつ薬があまり効かない場合もあることを示唆するものと考えられた。

< まとめ >

今回の研究の主な目的は「いじめ」を受けた場合の行動学的あるいは分子生物学的変化を捉えようとしたものである。「いじめ」を暴力による肉体的ストレスと威嚇による精神的ストレスの複合したストレスと考え「ソーシャルストレス」を選択し、これを長期間負荷することで検討した。

その結果、これまでのストレス負荷研究の結果とは明らかに異なり、「BDNF」の発現上昇が発症に關与する恐怖不安が惹起させることを明らかにすることが出来た。ストレスの負荷条件によっては、従来の抗うつ薬が効かない場合もあることを示唆しているものと考えられる。つまり、「BDNF」を増加させることで作用する抗うつ薬では効果を示さないストレス疾患(不安症状やうつ症状を示す場合でも)も存在する可能性を示唆した研究で社会的、医学的な意義の大きい結果が得られたものと考えられる。

もう一つの主題にした母親のストレスによる影響を子育て中の母マウスに拘束ストレスを負荷することで検討した。子育て中の母親に拘束ストレスを負荷しても、その子供は行動学的には顕著な異常行動を大人になっても起こすことはないが、明らかな成長障害を惹起するという事実が確認された。この結果は、子供に直接的なストレスが負荷することはなくとも、母親にストレスが加わることで子供に様々な影響を及ぼす可能性を示唆したもので成長障害に止まらずさらなる検討が必要と思われた。

さらに、母ストレスによる子供のストレス脆弱性についても検討を加えた。

すなわち、子育て中にストレスを受けた母親に育てられた子供のストレス脆弱性を検討すべく、8週齢以上になった時点でソーシャルストレスを負荷し、行動学的な観察を行った。その結果、変化は見られるものの特にストレス脆弱性が低くなるというものではなかった。今後、条件を変え検討する必要性が十分あるものと考えられた。

最後に長期にソーシャルストレスにさらされた場合、海馬のBDNF mRNA発現上昇を伴う不安症状の増強が起こり得ることを示し、その不安症状は抗うつ薬では改善出来ない場合もあることを示唆することができた。抗うつ薬はBDNFを増加させることにより抗うつ作用を発現することが報告されており、BDNF上昇を伴う不安には効果を示さないのかもしれない。今後詳細に検討していかねばならない課題の一つと考えられた。漢方薬である柴胡加竜骨牡蛎湯は長期ソー

シャルストレスによる不安の増強を改善したばかりかソーシャルストレスによるBDNFmRNAの発現上昇も抑制した。この結果は恐怖という記憶を漢方薬である柴胡加竜骨牡蛎湯は正常な形に戻している可能性を示唆するもので興味深いものであった。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Tsuiji K, Namai K, Uruse M, Minagawa S, Nakata H, Ishige A, Watanabe K
Effects of the chronic social defeat on behavior and gene expression in the brain.
第51回神経化学会
Center for KampoMedicine, Keio University
school of Medicine, Toyama. 2008.9.11-13

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石毛 敦 (ISHIGE ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20383705

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

築地 謙治 (TSUIJI KENJI)

慶應義塾大学・医学部・大学院生

生井 和樹 (NAMAI KAZUKI)

星薬科大学・薬学研究科・大学院生

中田 英之 (NAKATA HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・大学院生

村上 優 (MURAKAMI YU)

東京理科大学・薬学研究科・大学院生

漆瀬 道洋 (URUSE MICHIIHIRO)

東京理科大学・薬学研究科・大学院生