

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700406

研究課題名（和文） 心の再生：生育環境が原因となる精神疾患の新規治療法開発

研究課題名（英文） Regeneration of mind：Development of a novel treatment of psychiatric disorder caused by nurturing environment such as child abuse

研究代表者

一坂 吏志（ICHISAKA SATOSHI）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50359874

研究成果の概要（和文）：育児放棄モデルである母子分離では新生児期に母親から分離されたラットが成熟後不安様行動等を示す。本研究では、治療法開発で用いるより感度の高い指標について調べるため行動解析を行った。その結果、母子分離により最も変化したのは、オープンフィールド試験における壁への寄りかかり行動の増加であった。そして、その寄りかかり行動が高感度な新規不安様行動であることを抗不安薬ジアゼパムを用いて明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

In rodents maternal-separation (MS), which is a neglect model, increases depression- and anxiety-like behaviors and hypothalamic- pituitary- adrenal responses to stress in adulthood. In this study, we analyzed what is the most sensitive behavioral indicator of MS to develop a novel treatment. We found that MS increased markedly the duration of leaning-against-wall behavior in open field test in rats, and that the leaning-against-wall behavior was a new high sensitive anxiety-like behavior by using anxiolytic.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,500,000 | 750,000   | 3,250,000 |
| 2010年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 2011年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学／神経薬理学

キーワード：神経可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病、人格障害、自殺、凶悪犯罪の増加が社会問題となっており、児童虐待等幼少期の養育環境との関連性が疑われているが、減少したセロトニンを増加させる対処療法、時間を要する精神療法が主流であり、再発率も高く、新たな治療法の確立が重要となっている。

## 2. 研究の目的

児童虐待・親との別離等の養育環境が原因となる精神疾患の原因領域と推定されている前頭眼窩野の幼少期に形成された原因となる神経回路を成熟後に消去し、治療する新規精神疾患治療法の開発を最終目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) 準備として、豊環境ケージを2つ作製し、行動解析法としてオープンフィールド試験と強制水泳試験法を、コルチコステロン測定法としてELISA法を、モデル動物として母子分離等の実験系を初めて立ち上げる。

(2) 幼少期から成熟期まで様々な週齢のSDラットの前頭眼窩野と視覚野を取り出し、神経回路の安定化等に関わる分子の生後発達変化をウエスタンブロッティング法を用いて調べる。

(3) 生後初期のラットを母子分離し、幼少期に豊環境で飼育した群と成熟後に豊環境で飼育した群でのうつ状態を血中コルチコステロン量の上昇、行動解析等により比較し、成熟後での豊環境の効果を調べる。

(4) 生後にラットを母子分離し、成熟後にストレス脆弱性を示すようになったラットの前頭眼窩野に、アクチン安定化に関わる分子の阻害剤を投与することにより神経回路を消去可能な状態にし、出来るだけ安心な環境（豊環境等）におくことにより不要な回路を消去し、ストレス脆弱性が短期間に改善するのかを明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 実験方法の確立

##### ①豊環境ケージ

ステンレス製の大型犬用ケージをもとに、ステンレス製の網を張り、3階までのフロアと階段を取り付け、トンネル、ランニングホイールをはじめ多種のおもちゃをそろえることができた。また、標準ケージ同様に側面を登れないようにするためにアクリル板をとりつけた。

##### ②行動解析

今回、行動解析が初めてであるため、オープンフィールド試験と強制水泳試験の両方に使用できる解析ソフトとしてANY-mazeを使用することにし、解析用PCとともに準備することができた。また、オープンフィールド試験装置と強制水泳試験装置も準備することができた。そして、ラットを用いて解析できるように実験条件を確立することができた。

##### ③ELISA法

今回、本研究室ではELISA法が初めてであるため、12連マルチチャンネルピペット等を準備し、コルチコステロン用のELISAキットを用いることで測定できるようすることができた。

##### ④母子分離

今回、母子分離が初めてであり、解析法を試すためには明確な影響を調べることでできる実験指標が必要であるため、様々な母子分離条件を試みることで条件を決めることができた。

以上の様にほぼ全ての実験方法を立ち上げることができた。

(2) 神経回路の安定化等に関わる分子の生後発達変化をウエスタンブロッティング法をもちいて調べた。神経突起伸展に関わる分子CDK5と安定化に関わる分子RhoA-DrebrinA系路の生後発達変化を前頭眼窩野と視覚野で比較したところ、CDK5は視覚野では眼優位可塑性の臨界期に増加し、成熟後には減少していたが、前頭眼窩野では成熟後まで増加した状態が続いていた。また、安定化に関わる系路は視覚野で臨界期に最も低下していたが、前頭眼窩野でも時期が少し遅くなるもののほぼ同様の変化を示すことが明らかとなった。これらの結果から前頭眼窩野では成熟後でも新たな神経回路をつくるのが容易にできるが、形成された神経回路を消しやすいのは視覚野同様発達期でありその時期を外れると難しくなると考えられた。

(3) 生後初期のラットを生後2-14日まで3時間/日や24時間一回などいくつかの条件で母子分離し、その後、行動解析としてオープンフィールド試験と強制水泳試験を行った。その結果、条件としては、生後2-14日まで3時間/日が効果が高いことがわかった。

また、生後5日から35日までの間、体重の変化についても調べたが、差はみられず、母子分離による体重への影響は観察されなかった。

何度か実験を繰り返した結果、期待された強制水泳試験でのうつ様行動（無動時間）の増加は5分間全体では有意な変化は確認されなかった。

また、オープンフィールド試験の不安様行動に関しても中心領域滞在時間と接触走性のいずれにおいても有意な変化は確認できなかった。

しかし、想定していなかった壁への寄りかかり行動が雄と雌の両方で有意に増加することが明らかとなった（図1参照）。寄りかかり行動は領域としては一番外の上から観察すると壁の領域にあたり、不安様行動で知られる中心領域と逆の領域であるものの、一般的にはよく使われる指標ではなく、接触走性が壁にそって動く行動であるのに対し、寄りかかり行動は壁に手をつけて両足で立ち止まる行動であり、その行動が不安様行動であるのかについて先行研究を調べたが、報告

はなく、不明であった。

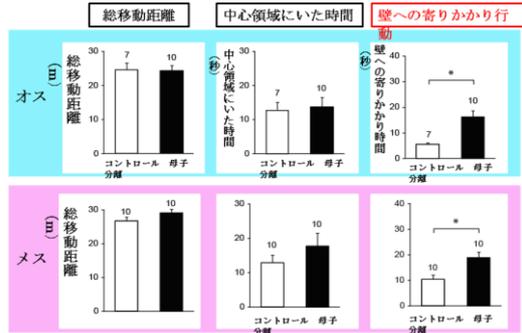


図1 母子分離の影響

そこで、この寄りかかり行動が不安様行動であるのかを調べることにした。まず始めに夜行性のラットにとって嫌な明るい条件で寄りかかり行動が増加するのかを調べた。その結果(図2参照)、先行研究同様に中心領域滞在時間が減少したことからラットが不安であると考えられた。この時寄りかかり行動は著しく増加していた。このことから寄りかかり行動が赤い不安な条件でも増加する行動であり、これまで知られる不安の指標よりも感度の高い行動であることがわかった。また、立ち上がり行動は逆に減少していたことから寄りかかり行動は立ち上がり行動とは異なる意味合いの行動であることもわかった。

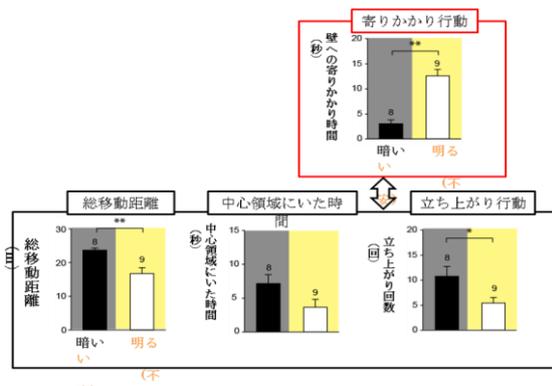


図2 明るさによる不安の影響

さらに寄りかかり行動が不安様行動であるのかを抗不安薬であるジアゼパム(2mg/kg, 腹腔内投与)を用いて調べた。その結果(図3参照)、明るさによる寄りかかり行動の増加が抗不安薬により阻害されることが明らかとなった。ただし、このとき不安様行動である中心領域滞在時間に変化はみられなかった。

しかし、先行研究においてSDラットでは中心領域滞在時間への抗不安薬の効果がみられないことが報告されていることから、その効果の確認されているWistarラットを用いて同様の実験を行った。その結果、抗不安

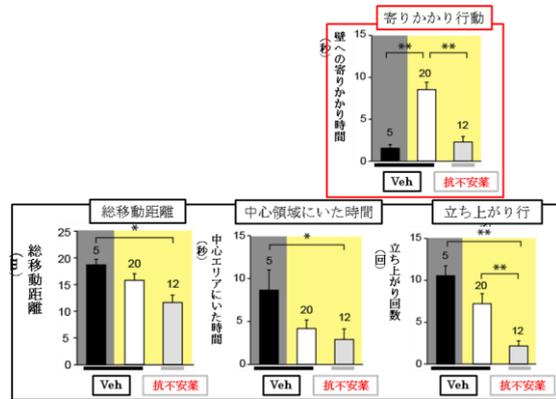


図3 抗不安薬ジアゼパムの影響

薬により中心領域滞在時間が増加し、そのときに寄りかかり行動は先ほど同様に減少した。現在、さらに不安惹起薬による寄りかかり行動への影響についても調べているところである。

以上の結果より、寄りかかり行動は不安様行動であり、現在使用されている不安様行動の指標よりも感度が著しく高く、そのため母子分離の効果をより強く検出できる指標であると考えられる。また、この指標は動物種や性別の影響を受けないことから非常に有効な新規不安様行動であると思われる。新規治療法を試すうえで出来るだけはっきりとした指標が必要なため、今後治療法を試すうえでも有効であり、一般的にも使用動物数を減らせるなどの利点のある指標であると考えられる。現在、寄りかかり行動の意味についても検討中であるが、現在のところ逃避系路探索行動である可能性が高いことを示すデータが得られている。詳細に関してはさらなる検討が必要であるものの、新規な不安な状況から逃避したいとの思いの表れなのかもしれないと現在のところ考えている。

次に幼少期の豊環境飼育と成熟後の豊環境飼育の効果については、現在ところ治療法として有効であることを示すデータは得られておらず、豊環境ケージ内で喧嘩することも観察されることから母子分離によるストレス脆弱性を改善するのではなく逆に悪化させる可能性もある。実際にマウスではそのような結果も報告されている。詳細についてはさらに検討している最中である。

最後にコルチコステロン量の変化に関しては、現在解析中であり、今後、新規治療法を検討するうえでオープンフィールド試験の寄りかかり行動に加えて改善効果を調べる指標になる可能性がある。今後、既にサンプリングを終えている豊環境群も含めてELISA法で解析することで新たな知見が得られることが予想される。

(4) 生後にラットを母子分離し、成熟後にス

トレス脆弱性を示すようになったラットの  
前頭眼窩野に、アクチン安定化に関わる分子  
の阻害剤を投与することにより神経回路を消  
去可能な状態にし、出来るだけ安心な環境に  
おくことにより不要な回路を消去し、ストレ  
ス脆弱性が短期間に改善するのかを明らか  
にすることが本研究の最終目標である。しか  
し、本研究においては、母子分離の影響を  
想定していた行動解析で確認できなかったた  
め予定よりも研究の進展が遅れてしまい、  
効果を調べるところまでには至らなかった。  
生化学と電気生理が専門であり、母子分離  
と行動解析が今回が初めてであったことも  
見通しの甘さにより期間内に実験を終える  
ことができなかったことと関係していると思  
われ、反省しているところである。これまで  
の状況としては、前頭眼窩野へ試薬を投与  
するカニューレや手技といった方法に関して  
は既に確立することができている。現在、  
練習も兼ねて GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニスト  
であるムシモール投与により前頭眼窩野機  
能を低下させた時の寄りかかり行動への影  
響を検討中である。今後、最終目的である  
分子標的試薬の前頭眼窩野内投与による  
効果を寄りかかり行動、コルチコステロン、  
衝動性等のヒトの症状にできるだけ近い指  
標を用いてできるだけ早く調べたいと考  
えている。

#### 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 Phase advance of the light-dark cycle  
perturbs diurnal rhythms of brain-derived  
neurotrophic factor and neurotrophin-3  
protein levels, which reduces  
synaptophysin-positive presynaptic  
terminals in the cortex of juvenile rats.  
Hamatake M., Miyazaki N., Sudo K.,  
Matsuda M., Sadakata T., Furuya A.,  
Ichisaka S., Hata Y., Nakagawa C., Nagata  
K., Furuichi T., Katoh-Semba R.  
J. Biol Chem. 査読有 286, 21478-21487,  
2011

② Activation of p38 mitogen-activated  
protein kinase is required for in vivo  
brain-derived neurotrophic factor  
production in the rat hippocampus  
R Katoh-Semba, R. Kaneko, S. Kitajima, M.  
Tsuzuki, S. Ichisaka, Y. Hata, H. Yamada,  
N. Miyazaki, Y. Takahashi and K. Kato  
Neuroscience 査読有 163, 352-361, 2009

[学会発表] (計 3 件)

① 新生児期における母子分離経験はオー  
プンフィールド試験における寄りかかり行  
動を増加させる

一坂 吏志, 山本未希, 井久保樹子, 國石洋,  
嶋義郎

第 54 回日本神経化学学会大会 2011 年 9 月 27  
日 金沢(山代温泉 瑠璃光)

② BDNF 量は PKA あるいは神経活動の阻害  
により p-CREB ではなく MeCP2 の変化を伴  
って変化する

山本未希, 一坂 吏志, 仙波りつ子, 嶋義郎

第 54 回日本神経化学学会大会 2011 年 9 月 27  
日 金沢(山代温泉 瑠璃光)

③ Developmental changes of signaling  
molecules that regulate neurite outgrowth  
and myelination in the rat orbitofrontal  
cortex and visual cortex.

Ichisaka S., Miyahara M., Yamamoto A,  
Kojima K and Hata Y.

第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 17  
日 名古屋(名古屋国際会議場)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/neurobio/5980.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

一坂 吏志 (ICHISAKA SATOSHI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号 : 50359874