

## 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25年 5月 1日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580303

研究課題名（和文）社会的ストレスが成長不全をおこすメカニズム

研究課題名（英文）Mechanisms of the growth inhibition in social defeat model of rats

## 研究代表者

豊田 淳 (TOYODA Atsushi)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：00292483

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、社会的ストレスで動物の成長が抑制されるメカニズムを解明することである。社会的ストレスを慢性的に受けたラットの顕著な特徴として成長不全が挙げられるが、この成長不全は摂食量の抑制が原因であることを明らかにした。この社会的ストレスによる摂食抑制は、摂食行動の制御に関わる視床下部のマロニル-CoA レベルの増加が原因であると示唆された。

研究成果の概要（英文）：This research focused on the growth inhibition in social defeated model of rats using the resident-intruder paradigm. The defeated model of rats showed anorexia-like symptoms following growth inhibition. Possibly, this was based on the disruption of hypothalamic regulation for feeding behaviors including malonyl-CoA signal pathway, because malonyl-CoA level in the hypothalamus of defeated rats abnormally increased.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：動物栄養学

科研費の分科・細目：農学・畜産学・草地学

キーワード：畜産学、ストレス、マロニル-CoA、うつ病、視床下部、成長、神経科学、栄養学

## 1. 研究開始当初の背景

ストレスは動物に様々な生理的影響を与える。家畜では異常行動の誘発や増体成績の悪化、乳生産量の減少、肉質の劣化などがおこり、生産性が著しく低下する。故にストレスの少ない環境で家畜を飼育管理することが生産性の維持に重要である。一方、ヒトではストレスがうつ病など精神疾患の増加につながり、自殺を誘発すると言われている。ストレスには様々なものがあるが、家畜、ヒ

トに共通して問題になるのは、個体間における社会的ストレスである。優位な個体が劣位の個体にとってストレスになり、それはしばしば慢性化するので、劣位の動物は長期間社会的ストレスにさらされることになる。私共は、この長期間の社会的ストレスが生体にどのような影響を与えるかに興味を持って研究を進めており、Resident-Intruder Paradigm (RIP) 法を用いて、社会的ストレスモデル動物の作製を行っている。RIP 法は、

Resident (居住者) が縄張り意識を持っているホームページに、Intruder (侵入者) を入れることで、Resident と Intruder の間で引き起こされる社会的闘争を利用する。闘争の結果、通常は Intruder が社会的敗北をするが、Intruder に敗北を長期間経験させることで、社会的ストレスを与える方法である。私共はウイスター系オスラットを Resident および Intruder 双方に用いた RIP 法によって、うつ病様ラットの作製に成功したのであるが、このモデルは各臓器の解剖学的変化がないものの、成長抑制と副腎肥大が起こることが明らかとなった。畜産現場においては、社会的闘争による成長不全は、群で管理する家畜で頻繁に起こることであり、私共が確立した RIP 法によるうつ病様ラットは、家畜間における社会的ストレスの動物モデルにもなりうる。本研究では畜産分野にとって非常に重要な問題である社会的ストレスによる成長不全のメカニズムに焦点を絞った。そこで、摂食行動、自発活動、代謝機構、ホルモン動態などに注目して研究を実施しているが、本課題では、特に、摂食行動と脂質代謝の双方に重要なマロニル-CoA とそれを制御するタンパク質の動態に着目した。

## 2. 研究の目的

RIP 法により慢性的に社会的ストレスを受けたラットは成長不全が起こるが、その詳しいメカニズムは不明である。しかし、副腎が肥大していることから、副腎皮質ホルモンなどのストレスに関する内分泌系、すなわち視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA 軸) が関与していることは間違いない。そこで、下記のポイントに絞って、この成長不全のメカニズムを明らかにすることにした。

### (1) 摂食行動および自発活動の解析

ストレスによる成長不全は、摂食量の低下 (エネルギー摂取の低下)、自発活動量の亢進 (エネルギー消費の亢進) などが原因として考えられる。そこで個体間の社会的ストレスが、摂食行動、自発活動におよぼす影響を明らかにすることにした。

### (2) 摂食行動制御因子の解析

摂食行動のコントロールに重要な視床下部のマロニル-CoA およびそれを制御するタンパク質 (AMP キナーゼ、以下 AMPK や、アセチル-CoA カルボキシラーゼ、以下 ACC) 群の動態について解析した。特にマロニル-CoA についてはアシル-CoA サイクリング法 (Microbe Environ. 2004. 19:179-189.) を改良して、より検出感度の高い方法を本解析に適用し、

微量サンプルから CoA 分子種を正確に定量することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Resident-Intruder Paradigm (RIP) 法による社会的ストレスモデルラットの作製

Resident ラットとしては、ウイスター系の雄、12 週齢を用いた。Intruder ラットとして、ウイスター系の雄 9 週齢を用いた。材料と方法についての詳細は公表論文に記載した (Iio et al. Neurosci Lett 2011)。なお、RIP 法については Tsankova らの方法 (Nat Neurosci. 2006 9(4):519-25.) を改変して行った。

### (2) 摂食行動および自発活動の解析

5 週間の RIP 法によるストレスモデル作製期間中には、ラットを摂食量・活動量測定装置 (小原医科産業社製) 内で個別に飼育し、摂食量、摂食行動パターン、自発活動量、自発活動パターンを経時的にモニターし、解析した。

### (3) 摂食行動制御因子の解析

マロニル-CoA や CoA 分子種の濃度をアシル-CoA サイクリング法 (Microbe Environ. 2004. 19:179-189.) を改良し、対照区、ストレス区の視床下部を用いて測定した。また、マロニル-CoA を制御するタンパク質である AMPK および ACC の発現量およびリン酸化の状態をウエスタンブロット法で解析した。

## 4. 研究成果

(1) Resident-Intruder Paradigm (RIP) 法による社会的ストレスモデルラットの作製

Resident および Intruder 双方に雄ウイスター系ラットを用いた。RIP 法により侵入ラットに居住ラットによる社会的ストレスを 1 日あたり 1 時間、慢性的に暴露した。これを 5 週間続けた (ストレス区)。5 週間のストレス暴露終了後、侵入ラットを強制水泳試験に供することで、侵入ラットが社会的ストレスモデルになっているかを評価した。うつ様行動を示し、社会的ストレスモデルとして利用できる個体について、以後の解析に利用した。5 週間の社会的ストレス暴露期間中、1 週間おきに体重測定した。その結果、ストレス区はコントロール区に比べ、ストレス暴露開始 1 週間から増体が有意に低かった (図 1)。

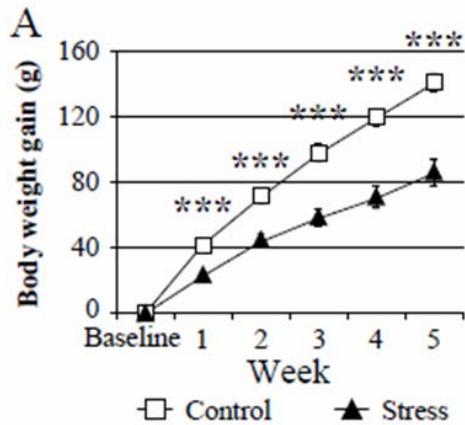


図1.社会的ストレスモデルにおける増体（成長）の推移

(2) 社会的ストレスモデルラットの摂食行動および自発活動の解析

5週間の社会的ストレス暴露期間中、ラットは摂食量・活動量測定装置（小原医科産業社製）に個別飼育し、自発活動および摂食量を経時的にモニタリングした。ストレス区では明期の自発活動量について対照区よりも有意に低く、摂食量も有意に低いことが確認された（図2および3）。

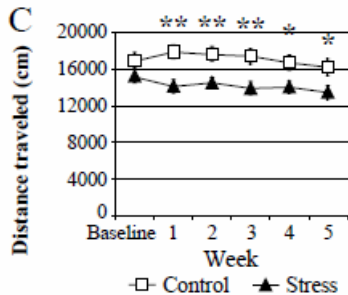


図2. 暗期の自発活動量

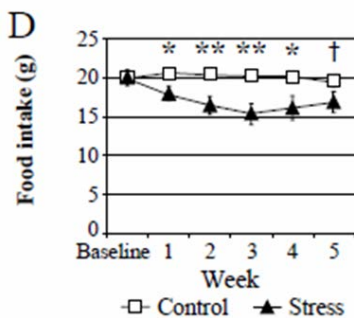


図3. 暗期の摂食量

(3) 摂食行動制御因子の解析

アシル-CoAサイクリング法を用いてラットのマロニル-CoA分析法の最適化を行い、社会的ストレスモデルラットの視床下部におけるマロニル-CoAの分析を行った。その結果、社会的ストレスモデルラットの視床下部ではコントロール区のラットと比較して、マロニル-CoAの濃度が高いことが明らかとなった（図4）。

次に社会的ストレスで視床下部のマロニル-CoA濃度が増加するメカニズムを解明するために、AMPKおよびACCの発現、リン酸化をウエスタンブロット法により解析した。AMPKがリン酸化されて活性化すると、ACCがリン酸化されて不活性化する。ACCはアセチル-CoAからマロニル-CoAを合成する酵素であるため、AMPKが活性化するとマロニル-CoAレベルは低下する。図5に示したように、社会的ストレスモデルでは視床下部のAMPKおよびACCのリン酸化レベルが対照ラットと比較して低いことが明らかとなった。

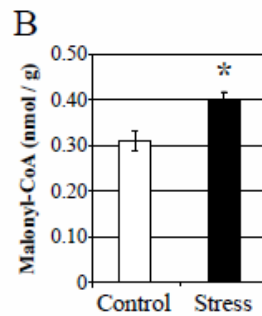


図4. 社会的ストレスモデルの視床下部におけるマロニル-CoA濃度

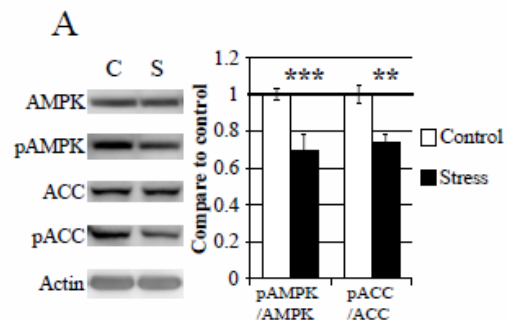


図5. 社会的ストレスモデルの視床下部におけるAMPK、ACCの発現およびリン酸化

以上をまとめると、慢性的な社会的敗北ス

トレスに暴露されたラットでは、摂食量の低下が体重増加の抑制につながり、この摂食の抑制は視床下部のマロニル-CoA 合成が活性化していることが原因であることが示唆された。今後は、社会的ストレスによるマロニル-CoA 濃度増加のメカニズムを解明することが課題であり、糖やレプチンなどの末梢の摂食関連シグナルが視床下部マロニル-CoA シグナルパスウェイにどのように伝わっているか解明することが必要である。

#### 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 7 件)

①Effect of diet composition on coenzyme A and its thioester pools in various rat tissues.

Tokutake Y, Iio W, Onizawa N, Ogata Y, Kohari D, Toyoda A, Chohnan S  
Biochemical and biophysical research communications 423(4) 781-784 2012 年 7 月  
査読あり  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.037.

② Anorexic behavior and elevation of hypothalamic malonyl-CoA in socially defeated rats.

Iio W, Tokutake Y, Matsukawa N, Tsukahara T, Chohnan S, Toyoda A  
Biochemical and biophysical research communications 421(2) 301-304 2012 年 5 月  
査読あり  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.004.

③Effects of chronic social defeat stress on MAP kinase cascade.

Iio W, Matsukawa N, Tsukahara T, Kohari D, Toyoda A  
Neuroscience letters 504(3) 281-284 2011 年 10 月  
査読あり  
doi: 10.1016/j.neulet.2011.09.047.

④Coenzyme A and its thioester pools in fasted and fed rat tissues.

Tokutake Y, Onizawa N, Katoh H, Toyoda A, Chohnan S  
Biochemical and biophysical research communications 402(1) 158-162 2010 年 11 月  
査読あり  
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.009.

[学会発表] (計 13 件)

①慢性的社会性ストレスによる摂食不振は

視床下部マロニル-CoA 濃度の 上昇によっておこる

飯尾 恒、小池広明、徳竹由華、松川典子、塚原隆充、長南 茂、豊田 淳  
関東畜産学会 2012 年 11 月 10 日

②慢性的社会性ストレスモデル動物における摂食量および体重の変化

田中勇氣、飯尾 恒、豊田 淳  
関東畜産学会 2012 年 11 月 10 日

③Anorexia and hypothalamic malonyl- CoA signaling pathway in chronic social defeated rats

飯尾 恒、徳竹由華、松川典子、塚原隆充、長南 茂、豊田 淳  
北米神経科学会 2012 年 10 月 17 日 (アメリカ)

④高脂肪食がラット組織内 CoA プールに及ぼす影響

徳竹 由華, 飯尾 恒, 豊田 淳, 長南 茂  
第 33 回肥満学会 2012 年 10 月 11 日

⑤社会的慢性ストレスを曝露されたラットは視床下部マロニル-CoA 濃度が増加し、摂食行動が抑制される

飯尾 恒, 徳竹 由華, 松川 典子, 塚原 隆充, 長南 茂, 豊田 淳  
第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月 18 日

⑥Modification of the Acyl-CoA Cycling Method for Analysis of CoA Pools

Y. TOKUTAKE, A. SAIJO, W. IIO, Y. OGATA, A. TOYODA, S. CHOHNAN  
米国微生物学会 2012 年 6 月 19 日 (アメリカ)

⑦社会的慢性ストレスモデルにおける増体抑制メカニズムの解明

飯尾 恒、徳竹、由華、松川 典子、塚原 隆充、長南 茂、豊田 淳  
日本畜産学会第 115 回大会 2012 年 3 月

⑧社会的慢性ストレスがラット白色脂肪および脾臓の TNF- $\alpha$ 、IL-6、レプチンの遺伝子発現に及ぼす影響

高木 良治、飯尾 恒、瀬尾 優太、松川 典子、塚原 隆充、豊田 淳、宮口 右二、小川 恭喜  
日本畜産学会第 115 回大会 2012 年 3 月

⑨食餌の質がラット組織内 CoA プールに及ぼす影響

徳竹 由華、鬼澤 直樹、飯尾 恒、豊田 淳、長南 茂  
第 32 回日本肥満学会 2011 年 9 月

⑩慢性的社会性ストレスと急性ストレスラットでの小腸消化吸收能の違い  
松川 典子、飯尾 恒、豊田 淳、中山 啓三、  
原 博、塚原 隆充  
日本栄養食糧学会 2011年5月

⑪絶食および飽食ラットにおける組織内 CoA  
プールの動態解析  
徳竹 由華、鬼澤 直樹、村田 恵、渡辺 央好、  
角田 梨奈、豊田 淳、長南 茂  
日本農芸化学会 2011年3月

⑫社会的ストレス誘導型うつ病モデルラット  
における増体抑制機序の解明  
松川 典子、飯尾 恒、豊田 淳、中山 啓三、  
原 博、塚原 隆充  
日本農芸化学会 2011年3月

⑬社会的ストレスによるうつ病モデルラット  
の増体抑制はなぜ起こるのか？  
松川典子、飯尾恒、豊田淳、原博、塚原隆充  
第16回 Hindgut Club Japan シンポジウム  
2010年12月

[その他]

ホームページアドレス

<http://doubutu.agr.ibaraki.ac.jp/siryoin/dex.html>

Facebook

<https://www.facebook.com/pages/%E8%8C%A8%E5%9F%8E%E5%A4%A7%E5%AD%A6%E8%BE%B2%E5%AD%A6%E9%83%A8%E9%A3%BC%E6%96%99%E8%B3%87%E6%BA%90%E7%A7%91%E5%AD%A6%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%AE%A4/183029258445748>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊田 淳 (TOYODA Atsushi)  
茨城大学・農学部・准教授  
研究者番号：00292483

### (2) 研究分担者

長南 茂 (CHONAN Shigeru)  
茨城大学・農学部・准教授  
研究者番号：70312775

### (3) 連携研究者

小針 大助 (KOHARI Daisuke)  
茨城大学・農学部・准教授  
研究者番号：50396595