

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 6 月 14 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590086

研究課題名（和文）ストレス抵抗性形成機構におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御の
 解明

研究課題名（英文）Elucidation of the epigenetic regulation on the stress resistance

研究代表者

武田 弘志 (TAKEDA HIROSHI)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：70206986

研究成果の概要（和文）：5-HT_{1A}受容体作動薬の24時間前処置により形成される急性ストレス刺激に対する情動的抵抗性が、海馬におけるヒストン H3 のアセチル化に経時的相関があることを見出した。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるトリコスタチン A を脳室内に投与することで、ヒストン H3 アセチル化に相関するストレス抵抗性が形成された。したがって、海馬ヒストン H3 アセチル化を主軸としたエピジェネティクス制御が、ストレス性精神疾患の治療および予防に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that acetylated histone H3 was increased in the hippocampus of mice that had developed resistance to emotional stress by pretreatment with 5-HT_{1A} receptor agonist 24 h before testing. Interestingly, the histone deacetylase inhibitor trichostatin A also protected against the emotional changes induced by acute restraint stress, as well as histone H3 acetylation. The present findings suggest that the epigenetic mechanisms of gene regulation may play an important role in the development of emotional resistance to stress stimuli.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経精神薬理学

科研費の分科・細目：薬学

キーワード：ストレス、ストレス抵抗性、5-HT_{1A}受容体、トリコスタチン A、エピジェネティクス、ヒストン脱アセチル化酵素、ストレス性精神疾患

1. 研究開始当初の背景

元来、生体は、外界からのストレス刺激に適応し、恒常性を維持するための生理機能を有しているが、この機能の破綻が様々なストレス性疾患の発症に関係していると考えられている。したがって、ストレス刺激に対する生体の恒常性維持に関与する脳機能を考

究することは、適応障害をはじめとする様々なストレス性精神疾患の発症要因や予防因子を明らかにするための重要な課題である。我々はこれまでにセロトニン (5-HT) 受容体のサブタイプの一つである 5-HT_{1A} 受容体を薬理的に活性化する (5-HT_{1A} 受容体作動薬を投与する) ことにより、ストレス抵抗性モデ

ル動物を作成できることを見出している。また、5-HT_{1A} 受容体作動薬を投与されたマウスの海馬における遺伝子発現プロファイリングを GeneChip®を用いて行った結果、ヒストン脱アセチル化酵素の1つであり、遺伝子発現を抑制的に制御している histone deacetylase 10 (HDAC10)の mRNA 発現が 1/3 に減少していることも明らかにしている。DNA はヒストンなどのタンパク質と複合体（クロマチン）を形成し、折りたたまれゲノムとして細胞核内に凝集している。近年、核内の DNA のメチル化やヒストンのアセチル化などの化学修飾が DNA の凝集状態に影響を与え、RNA への転写を変化させることが明らかになってきた。このような DNA の塩基配列の変化によらない遺伝子発現変動はエピジェネティクス制御いわれ、近年、国内外における基礎医学的な研究の累積から、種々のストレス性精神疾患の病態および治療にエピジェネティクス制御に注目が集まっている。HDAC の減少は、ヒストンのアセチル化を誘導することから、情動的抵抗性の形成機構にもエピジェネティクス制御が関与している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、5-HT_{1A} 受容体刺激による情動的抵抗性の形成機構におけるエピジェネティックな遺伝子制御に着目し、行動学的、組織化学的、生化学的および分子生物学的検討を行う。

- (1) 5-HT_{1A} 受容体刺激による情動的抵抗性形成と海馬ヒストンアセチル化の経時間的特徴について検討する。
- (2) HDAC 阻害による情動的抵抗性形成と海馬ヒストンアセチル化の経時間的特徴について検討する。
- (3) 既存の抗不安薬および抗うつ薬がストレス抵抗性を形成するか否かを検討する。

3. 研究の方法

実験には ICR 系雄性マウスを用いた。

- ・マウス海馬における HDAC10 の局在を、HDAC10 と神経細胞のマーカーである neuronal nuclei (NeuN) およびアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) に特異的な抗体を用いて、免疫組織化学的染色法に従い検討した。
- ・5-HT_{1A} 受容体作動薬であるフレジノキササン(1mg/kg)を腹腔内投与し、その 0.5、24 および 48 時間後に 1 時間の拘束ストレス刺激を負荷し、直後にホールボード試験を行った。また、試験終了後に各種脳サンプルを採取した。
- ・HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) 165, 495, 1650 μM, 4 μL)を脳室内投与し、

その 0.5、2、4 および 24 時間後に 1 時間の拘束ストレス刺激を負荷し、直後にホールボード試験を行った。また、試験終了後に各種脳サンプルを採取した。

- ・上記で得られた脳サンプルを用いて、Western blot 法および RT-PCR 法に従い、種々のタンパク質および mRNA 発現量を定量解析した

なお、本研究は、実験動物に対する動物愛護上の問題に配慮し本学の「国際医療福祉大学動物実験規定」を遵守して、適切な実験動物の飼育と動物実験を実施した。

4. 研究成果

海馬における HDAC10 の局在について免疫組織化学的に検討した結果、HDAC10 様免疫活性は、神経細胞のマーカーである NeuN 様免疫活性と同一局在を示し、アストロサイトのマーカーである GFAP 様免疫活性とは同一局在を示さなかった (図 1)。以上のことから、HDAC10 は、海馬神経細胞において、遺伝子発現制御の一役を担っていることが考えられる。

HDAC10 (green) / NeuN (red) HDAC10 (green) / GFAP (red)

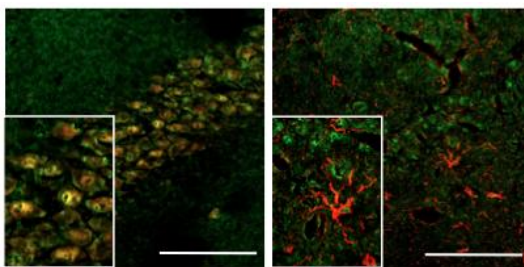


図 1 HDAC10 の海馬における局在

次に、5-HT_{1A} 受容体刺激により形成されるストレス抵抗性と、海馬ヒストン H3 アセチル化との経時間的関連性について検討した。拘束ストレス刺激を単回負荷したマウスでは、ホールボード試験における穴のぞき行動の低下など、情動性の低下が認められたが、フレジノキササンを拘束ストレス刺激負荷の 24 時間前に処置したマウスでは情動性の低下は認められず、ストレス刺激に対する抵抗性が形成された。一方、フレジノキササンを 0.5 時間前および 48 時間前に処置したマウスでは、ストレス抵抗性は形成されなかった (図 2; 上段)。また、フレジノキササン処置 0.5、24 および 48 時間後の海馬アセチル化ヒストン H3 (AcH3) タンパク質発現量を測定したところ、ストレス抵抗性が形成される 24 時間後においてのみ増加が認められた (図 2; 下段)。一方、このような変化は、既存の抗不安薬および抗うつ薬の処置によっては認められなかった。以上のことから、5-HT_{1A} 受容体刺激によるストレス抵抗性の形成には海馬ヒストン H3 のアセチル化が関与し、

これは、5-HT_{1A} 受容体刺激薬に特異的な反応である可能性が示唆された。

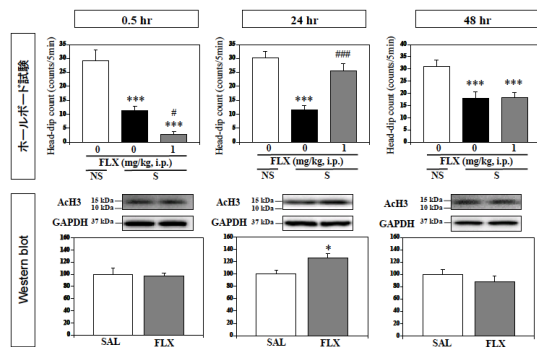


図 2 フレジノキサン(FLX)処置によるストレス抵抗性の形成と海馬アセチル化ヒストン H3 (AcH3) 発現の経時変化

次に、ストレス抵抗性形成と海馬ヒストンアセチル化の機能的連関について直接的に検証することを目的として、HDAC 阻害薬である TSA 処置の影響を検討した。その結果、TSA 処置 4 時間後をピークとして急性拘束ストレス刺激に対する抵抗性が形成され、さらに、海馬 AcH3 タンパク質発現量の増加が引き起こされることが明らかとなった。以上のことから、ストレス抵抗性の形成と海馬ヒストン H3 アセチル化との間には、経時的相関関係が存在することが示唆される (図 3)。

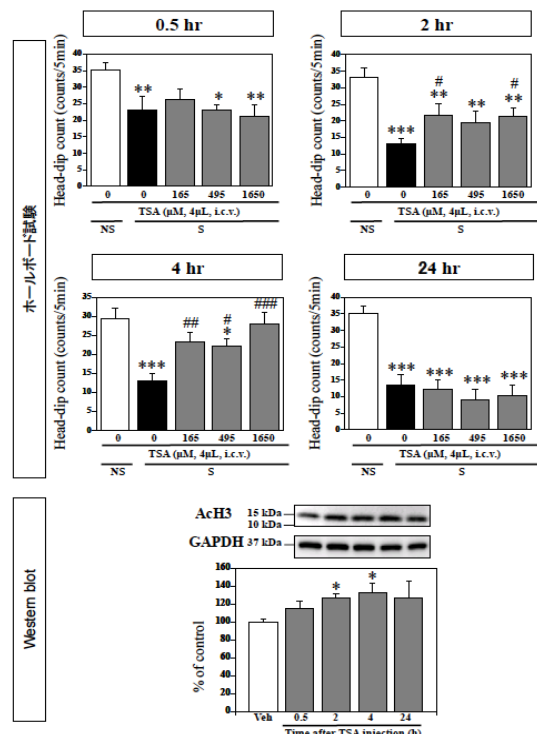


図 3 トリコスタチン A (TSA) 処置によるストレス抵抗性の形成と海馬アセチル化ヒストン H3 (AcH3) 発現の経時変化

一般に、ヒストンアセチル化は、遺伝子発現を促進的に制御することが知られている。したがって、ヒストン H3 のアセチル化亢進による、ストレス刺激に対する遺伝子応答の促進が推察される。

本研究では次に、TSA 処置 4 時間後に変化する機能タンパク質の同定を試みた。特に、近年、ストレス性精神疾患の病態生理および治療において注目を集めている脳由来神経栄養因子 (BDNF) に着目し、その発現変化を生化学的手法により検討した。その結果、TSA 処置 4 時間後において海馬 BDNF タンパク質の発現増加が、また、2 時間後において mRNA の発現増加が認められた。さらに、BDNF 発現とヒストンアセチル化との関連性について探求すべく、BDNF の遺伝子発現を促進的に制御することが知られている ヒストン H3 リジン 9 (H3K9) および 27 (H3K27) のアセチル化について検討した。その結果、TSA 処置 0.5 および 2 時間後に、AcH3K9 および AcH3K27 タンパク質発現量の増加が認められた。これらの結果から、TSA 処置 0.5 から 2 時間後に引き起こされるヒストン H3K9 および K27 のアセチル化が BDNF mRNA 発現亢進を誘導し、ストレス抵抗性形成の一役を担っている可能性が示唆される。これら遺伝子発現変化の生理学的意義をより詳細に考究することは、ストレス性精神疾患に関する病態研究や創薬・育薬研究で注目すべき新たなターゲット分子の提唱につながり、この分野の研究に新たな展開をもたらす可能性が考えられる。

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 5 件)

- ① Miyagawa K, Tsuji M, Takeda H. Possible involvement of histone acetylation in the development of emotional resistance to stress stimuli in mice. *Behav Brain Res*, 235, 318-325, 2012. 査読有り
- ② 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志. 5-HT_{1A} 受容体刺激によるストレス抵抗性の形成とエピジェネティクス制御 *ストレス科学*, 27, 120-131, 2012. 査読有り
- ③ 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志. ストレスに対する情動的抵抗性の獲得とヒストンアセチル化の機能的連関. *日本神経精神薬理学雑誌*, 32, 263-267, 2012. 査読有り
- ④ Miyagawa K, Tsuji M, Fujimori K, Saito Y, Takeda H. Prenatal stress induces anxiety-like behavior together with the disruption of central serotonin neurons in mice. *Neurosci Res*, 70,

- 111-117, 2011. 査読有り
- ⑤ 宮川和也, 辻 稔, 藤森完爾, 武田弘志. ストレス性精神疾患の病態研究とエピジェネティクス制御. 日本神経精神薬理学雑誌, 30, 153-160, 2010. 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① Miyagawa K, Tsuji M, Miyagishi H, Takeda H. The significance of hippocampal histone acetylation as a common factor involved in the development of emotional resistance and adaptation to stress in mice. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 21-23 日, 福岡国際会議場 (福岡).
- ② 武田弘志, 宮川和也, 辻 稔. 海馬ヒストンアセチル化はストレス刺激に対する抵抗性と適応の共通因子か. 第 28 回日本ストレス学会学術総会, 2012 年 11 月 29-30 日, 会議・研修施設 ACU (北海道).
- ③ 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志. 各種抗不安薬および抗うつ薬の情動的ストレス抵抗性形成に及ぼす影響—行動薬理的検討—. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会、第 22 回日本臨床精神神経薬理学会, 第 42 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 2012 年 10 月 18-20 日, 栃木総合文化センター (栃木).
- ④ 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志. 情動的ストレス抵抗性の形成機構における海馬ヒストンアセチル化の意義. 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18-21 日, 名古屋国際会議場 (愛知).
- ⑤ 宮川和也, 辻 稔, 竹内智子, 武田弘志. ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の脳室内投与によるストレス抵抗性の形成における分子メカニズムの解明. 第 2 回国際医療福祉大学学会学術大会, 2012 年 9 月 1-2 日, 国際医療福祉大学 (栃木).
- ⑥ 武田弘志, 宮川和也, 辻 稔. 神経精神医学研究における行動薬理的評価法の有用性. 日本安全性薬理研究会 第 3 回学術年会, 2012 年 2 月 17 日, 東京大学弥生講堂・一条ホール、アネックスセイホクギャラリー (東京)
- ⑦ 齋藤愛穂, 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志. 海馬ヒストンアセチル化を介した BDNF 発現亢進とストレス抵抗性の形成. 第 27 回日本ストレス学会学術総会, 2011 年 11 月 18-20 日, 東京国際交流会館 (東京).
- ⑧ 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志. 5-HT_{1A} 受容体刺激によるストレス抵抗性の形成とエピジェネティクス制御. 第 27 回日本ストレス学会学術総会, 2011 年 11 月 18-20 日, 東京国際交流会館 (東京).
- ⑨ 齋藤愛穂, 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志. ヒストン脱アセチル化阻害剤の脳室内投

与によるストレス抵抗性の形成. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会, 第 41 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 2011 年 10 月 27-29 日, 京王プラザホテル (東京).

- ⑩ 宮川和也, 辻 稔, 武田弘志. ストレスに対する情動的抵抗性の獲得とヒストンアセチル化の機能的連関. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会, 第 41 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 2011 年 10 月 27-29 日, 京王プラザホテル (東京).

〔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〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田弘志 (TAKEDA HIROSHI)
国際医療福祉大学・薬学部・教授
研究者番号: 70206986

(2) 研究分担者

辻 稔 (TSUJI MINORU)
国際医療福祉大学・薬学部・准教授
研究者番号: 70297307