

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月25日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790735

研究課題名（和文）ストレスによる社会行動変容におけるオキシトシン-オキシトシン受容体システムの役割

研究課題名（英文）Role of oxytocin and oxytocin receptor in stress responses in the brain

研究代表者

山口 奈緒子（YAMAGUCHI NAOKO）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：50380324

研究成果の概要（和文）：脳内のオキシトシンは中枢性ストレス応答に重要な役割を担っている。本研究では、オキシトシン受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いて、拘束ストレス負荷後の脳内ストレス応答におけるオキシトシン受容体の役割について検討した。その結果、オキシトシン受容体が、コルチコトロピン放出因子など脳内ストレス関連因子の発現制御に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Oxytocin is one of the important factors to regulate stress responses in the brain. In this study, I examined the role of brain oxytocin system after restraint stress exposure using oxytocin receptor knockout female mice. The present results suggest that oxytocin receptor mediate acute restraint stress-induced expression of stress-related factors including corticotropin-releasing factor in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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、オキシトシン、エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

オキシトシンは、視床下部室傍核や視索上核で産生され、脳内へ、もしくは下垂体後葉の神経終末を経由して血中へ分泌されるペプチドホルモンである。オキシトシンの作用としては古くから、分娩時の子宮筋収縮促進や乳汁射出など生殖機能に関連した作用が知られている。これらの生殖に関連する作用以外にも、近年、脳内オキシトシンの神経伝達・調節物質としての役割が、注目されるようになってきた。薬理学的手法やノックアウトマウスを用いた解析により、脳内のオキシトシンが社会行動（Kosfeld et al., 2005; Donaldson and Young, 2009; Winslow et al.,

2000）や情動行動（Amico et al., 2008）に関与することが報告されている。

オキシトシンはまた、脳内のストレス応答の制御においても重要な役割を果たす（Neumann et al., 2000; Windle et al., 2006）。ストレス応答の制御中枢である視床下部室傍核（PVN）にはオキシトシンニューロンが豊富に存在し、扁桃核や分界条床核、中隔核などストレス応答に関与する様々な部位に投射している（Winslow and Insel, 2002）。種々のストレスにより、PVNにおけるオキシトシンタンパクの発現レベルが増加し（Babygirija et al., 2010）、血中や扁桃核でのオキシトシン濃度が増加する

(Neumann et al., 2000; Ebner et al., 2005) ことから、ストレスにより増加したオキシトシンが脳内や血中に分泌され、ストレス応答に関与している可能性が推測される。

オキシトシンやその遮断薬の投与実験の結果は、この可能性を支持している。たとえば、脳室内や脳内に投与されたオキシトシンは、コルチコトロピン放出因子 (CRF) や cFos 発現などで示されるストレス応答を抑制する (Windle et al., 2004; Lee et al., 2007)。一方、脳室内投与されたオキシトシン受容体遮断薬は、非ストレスおよびストレス下のコルチコステロン量を増加させる (Neumann et al., 2000)。これらの報告は、脳内のオキシトシンがストレス応答に関与する可能性を支持するだけでなく、その作用が抑制性であることを示唆している。実際ヒトでは、ストレス関連疾患の 1 つであるうつ病に関して、オキシトシンの経鼻投与によってうつ症状が改善することが報告されている (Bakharev et al., 1986)。

オキシトシンは、CRF やエストロゲンなど様々なストレス関連因子との相互作用が示唆されている (McCarthy et al., 1996; Windle et al., 1997)。オキシトシンは、これらのストレス関連因子の発現調節も含めて、脳内ストレス応答において多面的に作用していると考えられる。しかし、ストレス応答の中核性制御におけるオキシトシン-オキシトシン受容体システムの生物学的・神経学的基盤に関しては、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、脳内のストレス応答におけるオキシトシンとその受容体の役割を明らかにすることを目的とした。

そのため、本研究ではオキシトシン受容体遺伝子ノックアウト (OTRKO) マウスとその野生型マウスを用いて急性ストレスを負荷し、ストレスによって誘起される脳内ストレス関連因子の発現について形態学的解析を行い、オキシトシン受容体の関与について検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物

成体雌のオキシトシン受容体遺伝子ノックアウト (OTRKO) マウスとその野生型 (OTRWT) マウスを用いた。実験開始時の週齢は、10~14 週齢であった。

(2) 卵巣摘除

拘束ストレス負荷の 14 日前に、イソフルラン麻酔下で卵巣摘除を行った。

(3) 拘束ストレス

ストレス群 (Stress) のマウスに対しては、市販の 50 ml チューブを用いて、拘束ストレスを負荷した。マウスをチューブ内に入れた後、ケージ内に 1 時間静置した。1 時間の拘束ストレス負荷の終了直後にペントバルビタール麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行い、脳を摘出した。

コントロール群 (Control) のマウスについては、ストレス群への拘束ストレス負荷と同じ時間帯にケージから餌と水を除いた以外は、通常の飼育環境に置いた。餌・水を除いてから 1 時間後にマウスをホームケージから出し、ストレス群と同様の手順で脳を摘出した。

(4) 免疫組織化学染色

前頭断凍結切片を作製した後、cFos、CRF、オキシトシン、トリプトファン水酸化酵素に対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。脳内の各部位ごとに陽性細胞数を計測し、総陽性細胞数を示した。

4. 研究成果

(1) ストレス後の室傍核における cFos 陽性細胞数の変化

拘束ストレス負荷による神経活動の変化について調べるため、神経活動のマーカーである cFos に対する免疫染色を行った。OTRWT マウスにおいて、室傍核 (PVN) での cFos 陽性細胞数は、拘束ストレスの負荷によって増加した。また、OTRKO マウスにおいても、PVN の cFos 陽性細胞数は、拘束ストレスの負荷によって著しく増加した (Fig. 1)。

ストレス負荷のない群で比較すると、OTRWT マウスと OTRKO マウスの cFos 陽性細胞数は、ほぼ同程度であった。ストレス後の cFos 陽性細胞数の増加は、OTRWT マウスと比べて OTRKO マウスの方がより顕著であった (Fig. 1)。

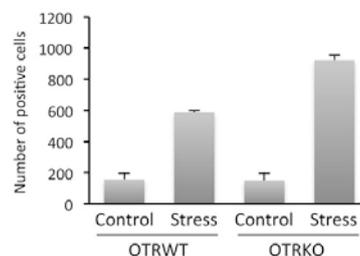


Fig. 1. 拘束ストレスによる cFos 陽性細胞数の変化

(2) ストレス後の室傍核における CRF 陽性細胞数の変化

OTRWT マウスにおいて、PVN の CRF 陽性細胞

胞数は、拘束ストレスの負荷によって微増した。OTRKO マウスにおいては、PVN の CRF 陽性細胞数は、拘束ストレスの負荷によって増加した (Fig. 2)。

ストレス負荷のない群で比較すると、OTRWT マウスと OTRKO マウスの CRF 陽性細胞数に差は認められなかった。ストレス後の CRF 陽性細胞数の増加は、OTRWT マウスより OTRKO マウスの方が顕著であった (Fig. 2)。

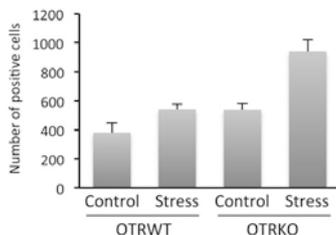


Fig. 2. 拘束ストレスによる CRF 陽性細胞数の変化

(3) ストレス後の室傍核における cFos/CRF 陽性細胞数の変化

OTRWT マウスにおいて、PVN での cFos と CRF を共発現した細胞数は、拘束ストレスの負荷によって増加した。また、OTRKO マウスにおいても、PVN の cFos/CRF 陽性細胞数は、拘束ストレスの負荷によって増加した (Fig. 3)。

ストレス負荷のない群で比較すると、OTRWT マウスと OTRKO マウスの cFos/CRF 陽性細胞数はほぼ同程度であった。ストレス後の cFos/CRF 陽性細胞数の増加は、OTRWT マウスより OTRKO マウスの方が顕著であった (Fig. 3)。

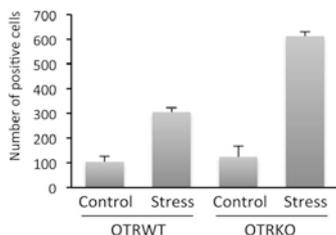


Fig. 3. 拘束ストレスによる cFos/CRF 陽性細胞数の変化

(4) ストレス後の背側縫線核におけるトリプトファン水酸化酵素陽性細胞数の変化

OTRWT マウスにおいて、背側縫線核 (DRN) のトリプトファン水酸化酵素 (TPH) 陽性細胞数は、拘束ストレスの負荷によってほとんど変化しなかった。OTRKO マウスにおいては、DRN の TPH 陽性細胞数は、拘束ストレスの負荷によって微増した (Fig. 4)。

ストレス負荷のない群で比較すると、OTRKO マウスの TPH 陽性細胞数は OTRWT マウスのものよりも多かった。同様に拘束ストレスを負荷した群で比較すると、OTRKO マウスの TPH 陽性細胞数は OTRWT マウスよりも多かった。

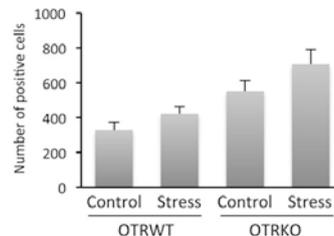


Fig. 4. 拘束ストレスによるトリプトファン水酸化酵素陽性細胞数の変化

(5) 結論

本研究では、急性ストレス後の脳内ストレス応答におけるオキシトシン受容体の役割を明らかにするため、OTRKO マウスを用いて脳内ストレス関連因子の発現変化を調べた。

その結果、PVN において非ストレス下の cFos 発現は OTRWT マウスと OTRKO マウスで同程度であったものが、ストレス下ではともに増加するものの、OTRKO マウスにおいてその増加がより顕著であることが明らかとなった。cFos 発現によって示された活動性について PVN の CRF 陽性細胞に限って検討したところ、同様に、非ストレス下では OTRWT マウスと OTRKO マウス間に差は認められなかったが、拘束ストレスによって OTRKO マウスではより顕著に増加することが示された。また、ストレス負荷後の OTRKO マウスにおいて、CRF 陽性細胞数や TPH 陽性細胞数が OTRWT マウスと比べてより顕著に増加した。これらの結果から、オキシトシン受容体の欠損によりストレス反応が増大する可能性が示唆された。

ストレス下では、オキシトシンが増加することが知られている (Neumann et al., 2000; Ebner et al., 2005)。増加したオキシトシンはストレス応答の抑制に働くと考えられている。実際、雄のオキシトシン遺伝子ノックアウトマウスを用いてストレスを負荷した先行研究によると、単回 4 時間の拘束ストレス負荷により、オキシトシンノックアウトマウスの PVN での CRH mRNA の発現量が、その野生型よりも有意に増加することが示されている (Nomura et al., 2003)。

本研究において、オキシトシン受容体が脳内ストレス応答に関与しており、ストレス応答の中核である PVN だけでなく、その他のストレス関連部位における種々のストレス関連因子の脳内発現にも影響を及ぼすことが明らかとなった。今後は、ストレス下でのオ

キシトシン-オキシトシン受容体システムによるストレス応答の制御に関する詳細なメカニズムの解明が求められる。

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1件)

- ① Naoko Yamaguchi, Kazunari Yuri.
Changes in oestrogen receptor- β mRNA expression in male rat brain with age. J Neuroendocrinol 査読有. 2012. 24. 310-318. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2011.02231.x.

[学会発表] (計3件)

- ① Naoko Yamaguchi, Akiko Mizushiri, Shoko Sagoshi, Kazuyo Nagata, Mumeiko C. Tsuda, Sonoko Ogawa. Social experience during pubertal period influences development of socio-emotional behavior in male estrogen receptor β knockout mice. 第35回日本神経科学大会. 2012年9月21日. 名古屋市(名古屋国際会議場)
- ② 富澤優美, 山口奈緒子, 永田知代, 佐越祥子, 津田夢芽子, 坂本敏郎, 小川園子. マウスの養育行動におよぼすストレスの影響. 日本動物心理学会第72回大会. 2012年5月12日. 西宮市(関西学院大学)
- ③ 山口奈緒子, 由利和也. Age-related changes in estrogen receptor- β mRNA expression in male rat brain. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2012年3月28日. 甲府市(山梨大学)

[その他]

ホームページ

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_antml/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 奈緒子 (YAMAGUCHI NAOKO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 50380324