

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791248

研究課題名(和文)母子分離ストレスの不安行動の脆弱性への影響とその分子機構解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the enhancement of conditioned fear memory induced by maternal separation

研究代表者

戸田 裕之(TODA, HIROYUKI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・助教)

研究者番号：00610677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：出生後の発達段階のストレスはうつ病や不安障害のリスクを上げることが知られている。我々の研究では、母子分離ストレスを負荷したラットは、成獣後、恐怖条件付けモデルですくみ行動が増強しており、扁桃体のニューロテンシンレセプター1(NTSR1)の発現量が低下していた。NTSR1アンタゴニストを扁桃体内に局所注入すると恐怖条件付けモデルのすくみ行動が増加した。また、母子分離ストレスは扁桃体のNTSR1遺伝子のプロモーター領域のメチル化が亢進していた。以上の結果より、母子分離ストレスによって誘導された扁桃体のNTSR1遺伝子の変化が、成人期のうつ病や不安障害の発症脆弱性に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Stress during postnatal development is associated with an increased risk for depression and anxiety disorders later in life. With respect to conditioned fear, previous studies have indicated that early life stress influences its development in adulthood. The results showed that maternal separation (MS) enhanced freezing behaviors in fear-conditioned stress and reduced the gene expression of neurotensin receptor (NTSR) 1 in the amygdalas of adult rats. The microinjection of a NTSR1 antagonist into the amygdala increased the percentage of freezing in conditioned fear. Moreover, MS increased DNA methylation in the promoter region of NTSR1 in the amygdala. MS may leave epigenetic marks in the NTSR1 gene in the amygdala, which may enhance conditioned fear in adulthood. The MS-induced alternations of DNA methylation in the promoter region of NTSR1 in the amygdala may be associated with vulnerability to the development of anxiety disorders and depression in adulthood.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：ニューロテンシン 扁桃体 恐怖条件付けモデル エピジェネティクス 母子分離ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 幼少期のストレスと精神障害の関係

過去の臨床研究で、出生後の発達段階でストレス (early life stress, ELS) にさらされることによって、成人後のうつ病、不安障害や物質乱用のリスクが症状することが示されている。幼少期の環境の多様性が遺伝的な要因と相互作用して、遺伝子発現や生物学的な機能の変化を引き起こし、成長後まで続いて精神障害の発症に至ると考えられる。このような“プログラム”効果は、ゲノム遺伝子の構造変化を伴うエピジェネティックな制御によって生じる可能性が指摘されている。

(2) 恐怖条件付けモデルと幼少期ストレス

ELS を受けると成長後も、恐怖条件付けモデル (conditioned fear stress paradigm, CFS) による不安反応が亢進していることが報告されている。しかしながら、ELS によって生じる恐怖の記憶プロセスに対して、エピジェネティックな制御がどのような役割を果たしているのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

DNA マイクロアレイを用いた我々の過去の研究で、CFS によって変化し、様々な不安障害の治療薬の一種であるセロトニン再取り込み阻害薬でその変化が戻るただ一つの遺伝子として、ニューロテンシン (neurotensin, NTS) を見出している。しかしながら、ELS によって生じる恐怖条件付け反応の亢進における NTS の役割については明らかにされていない。本研究の目的は、母子分離ストレス (maternal separation, MS) を負荷されたラットの CFS における障害に NTS 系が関連しているかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物・行動解析

体重 230 - 270 g の雄の成獣 Sprague-Dawley (SD) ラットと妊娠 14 日目の SD ラットを用いた。生後 2 - 14 日目の 9 時半 - 12 時半の間に、MS ストレスを負荷した。通常飼育 (AFR, animal facility rearing) ラットをコントロール群とし、動物実験施設飼育者が週に 1 回ケージ交換を行った。以下の実験では、雄の仔ラットのみ使用し、行動実験、分子・神経化学実験を 10 - 14 週令に施行した。Dexamethasone (DEX) /corticotropin releasing hormone (CRH) 試験は、高架式十字迷路試験、フットショック感受性試験、CFS の行動解析を行った。また、ラット脳内にカニューレを挿入して、扁桃体に NTSR 1 アゴニストとアンタゴニストを局所注入して CFS を行った。

(2) 遺伝子解析

ラット脳から扁桃体と海馬の組織を切り出し mRNA を抽出して定量 PCR 法により遺伝

子発現解析を施行した。また、扁桃体組織から DNA を抽出して、メチル化 CpG アイランド・リカバリーアッセイ法により NTSR1 プロモーター領域のメチル化解析を施行した。また、SPSS Statistics version 21 (SPSS, Chicago, IL) を用いて統計解析を施行した。

全ての研究は、防衛医科大学校及び北海道大学大学院医学部動物倫理審査会実験委員会によって承認され、防衛医科大学校及び北海道大学大学院医学部動物実験規則国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定を遵守して施行した。

4. 研究成果

(1) MS の HPA 系、体重、非条件付け行動に対する影響

MS が終了した生後 14 日目の体重は、MS 群と AFR 群で有意差はなかった (図 1A)。また、生後 70 日目までの体重は、反復 2 元配置分散分析の結果、MS 群は AFR 群と比較して、群間の主効果、交互作用ともに有意差は存在しなかった。MS の HPA 系の異常の有無を DEX/CRH テストを用いて検討した (図 1B)。反復 2 元配置分散分析の結果、群間 ($F(1, 84) = 5.389, p < 0.05$) と時間 ($F(7, 84) = 15.75, p < 0.001$) の主効果に有意差が存在したが、群と時間の交互作用に有意差は存在しなかった。CRH の投与後、コルチコステロンの濃度は AFR 群と比較して MS 群では有意に上昇しており、AUC も上昇していた (MS: 14650 ± 2584 ; AFR: 8032 ± 1372 ; $p < 0.05$)。Tukey 法による多重比較では、20 時の MS 群のコルチコステロンの濃度が AFR 群と比較して有意に高値であった ($p < 0.05$)。18 時 - 19 時半のコルチコステロンの基礎値は MS 群と AFR 群で有意差がなかった。

オープンフィールド試験と高架式十字迷路試験によって、記憶非依存性の不安行動を評価した。オープンフィールド試験において (図 1C)、総移動距離と内側領域滞在時間に有意差はなかった。また、高架式十字迷路試験において (図 1D) 総移動距離と開放アーム侵入回数に有意差はなかった。

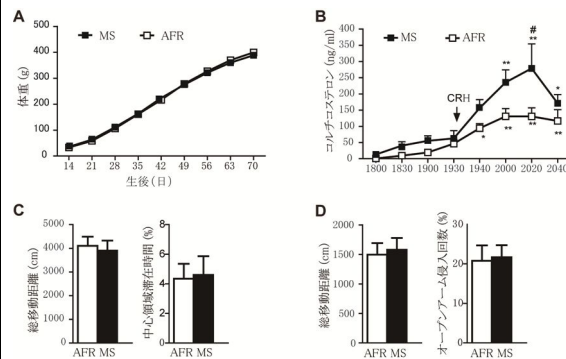


図 1 MS の体重、HPA 系、非条件付け行動に対する影響

A. MS ラットと AFR ラットの体重の推移 (MS, n = 22; AFR, n = 17)。B. DEX/CRH テストにおける血漿コルチコステロン濃度。全てのラットは 12 時に DEX (30 ug/kg i.v.)、19 時 31 分に CRH (50 ng/kg i.v.) を投与して、18 時から 20 時 40 分の間、合計 8 回採血を施行。MS ラットは有意にコルチコステロン濃度が高値を示した (* $p < 0.05$ vs AFR ラット, ** $p < 0.01$ vs ベースライン) (MS, n = 8; AFR, n = 6)。C. オープンフィールド試験。30 分間の総移動距離、中心領域滞在時間 (%) を解析 (MS, AFR, n = 8)。D. 高架式十字迷路試験。5 分間の総移動距離、オープンアーム侵入回数 (%) を解析 (MS, AFR, n = 8)。エラーバーは標準誤差を示す。

(2) MS の CFS に対する影響

図 2A は、痛みに関連した行動が初めて現れた足下電撃ショックの強さの最小値を示している。発声、前足挙上、後ろ足挙上、ジャンプのいずれも 2 群間に有意差は認めなかった。このことにより、MS 群と AFR 群で、足下電撃ショックの感受性に変化がないことが示された。次に、記憶に関連した行動を CFS にて評価した (図 2B)。反復 2 元配置分散分析にて、すくみ行動 (%) の群間 ($F(1, 19) = 5.25, p < 0.05$)、暴露回数 ($F(1, 19) = 37.17, p < 0.01$) の主効果はともに有意差を認めしたが、群間と暴露回数の交互作用には有意差は存在しなかった。

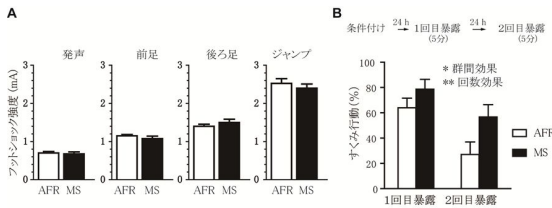


図 2 MS の CFS に対する影響
A. 電気刺激で生じる痛みへの感受性。痛みに対する典型的な反応 (発声、前足挙上、後ろ足挙上、ジャンプ) が生じるまでに要した、最低の電流。データは痛みの閾値を示す (mA) (各群、 $n = 8$)。B. 2.0 mA の電流による恐怖条件付け 24 時間後 (1 回目暴露) と 48 時間後 (2 回目暴露) のすくみ行動。2 元配置分散分析にて、群間の主効果 ($p < 0.05$)、回数の主効果 ($**p < 0.01$) に有意差が存在し、交互作用は有意差なし ($n = 10-12$ /群)。エラーバーは標準誤差を示す。

(3) MS の扁桃体、海馬における NTS 系の mRNA 発現に対する影響

扁桃体と海馬は恐怖の学習と記憶において中心的な役割を果たす。過去の研究にて NTS 系は、恐怖記憶のプロセスに重要な役割を果たしていることが分かっている。そのため、我々は、NTS、NTSR1、NTSR2 の扁桃体と海馬における発現量が、MS で変化するかどう

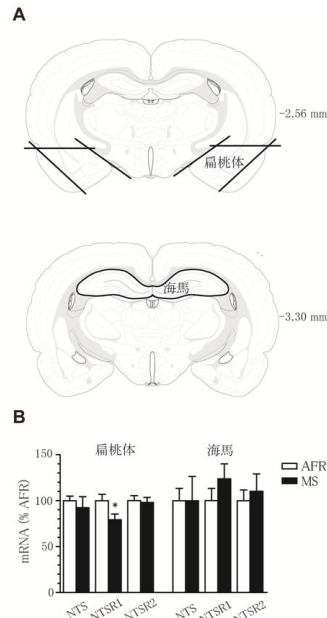


図 3 MS の NTS 系の mRNA 発現への影響
A. 扁桃体と海馬の切り取り部位 (黒線に囲まれた部分)。冠状断で 1 mm の厚さでスライスしてから切り出した。Paxinos and Watson のラット脳アトラスから引用 [69] (bregma から 2.56 と 3.30 mm 後方)。B. NTS、NTSR1、NTSR2 の mRNA 発現量の比較。MS ラットは、NTSR1 mRNA の発現量が扁桃体で有意に減少していた ($n = 7-9$ 群; $*p < 0.05, **p < 0.01$)。エラーバーは標準誤差を示す。

はなかった。

(4) NTSR1 アンタゴニストとアゴニストの扁桃体局所投与の CFS に対する影響

扁桃体における NTSR1 が、CFS において重要な役割を果たしているかどうかを検討するために、扁桃体に NTSR1 のアンタゴニストとアゴニストを局所注入して CFS への効果を検討した。SR48692 は NTSR2 と比較して NTSR1 に対して高い親和性を有しているため、NTSR1 アンタゴニストとして使用した。PD149163 は NTSR2 に対する親和性がなく NTSR1 に選択的に結合するため、NTSR1 アゴニストとして使用した。CFS と薬剤投与の時間を図 4A に示した。カニューラの先端の位置を図 4B と 4C に示した。薬物投与群と生理食塩水投与群の両方ともに、脳組織の明らかな損傷はなかった。図 4C は、生理食塩水または SR48692 (10 nM - 1000 nM) を扁桃体に局所投与した際のすくみ行動 (% DMSO 群) を示している。1 元配置分散分析によって、すくみ行動は 1 回目暴露 ($F(1, 19) = 5.25, p < 0.05$)、2 回目暴露 ($F(1, 19) = 37.17, p < 0.01$) ともに、薬剤投与によって有意な変化を示した。Tukey 法による多重比較では、1 回目暴露では全ての薬剤投与群で DMSO 群と比較して有意な変化はなかったが、2 回目暴露群では 1000 nM 投与群が DMSO 投与群よりすくみ行動が亢進していた ($p < 0.05$)。図 4E は生理食塩水、もしくは PD149163 (10 uM - 1000 uM) を扁桃体に投与したときのすくみ行動 (% 生理食塩水群) を示している。1 元配置分散分析によって、1 回目暴露 ($F(3, 25) = 0.104, p > 0.05$) では有意な変化はなかったが、2 回目暴露 ($F(3, 25) = 5.45, p < 0.05$) では有意な変化を認めた。Tukey 法による多重検定では、2 回目暴露の 100 uM 投与群が生理食塩水投与群と比較して、すくみ行動の有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。これらの結果より、NTSR1 アゴニスト (PD149163) の扁桃体への投与によって、条件付けられたすくみ行動が減少して、NTSR1 アンタゴニスト (SR48692) の扁桃体への投与によってすくみ行動が増強することが示された。

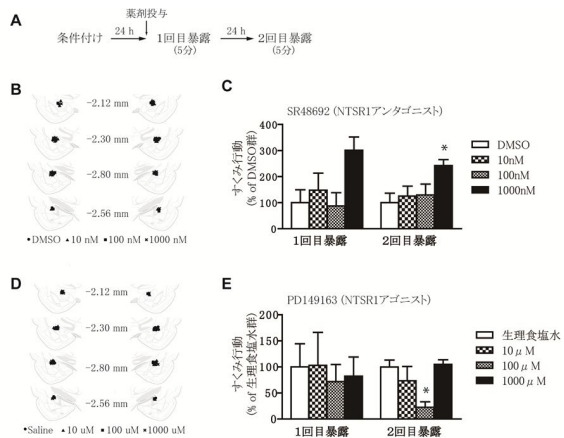


図 4 NTSR1 アゴニストとアンタゴニストの扁桃体内注入の CFS への効果
A. 実験デザイン。B. D. SR48692 (B) と PD149163 (D) を扁桃体内注入時の針先の場所。Paxinos and Watson のラット脳アトラスから引用 [69] (bregma から 2.12 - 2.56 mm 後方)。C. NTSR1 アンタゴニスト (SR48692) の扁桃体内両側投与によって、1000 nM 投与群の 2 回目暴露時のすくみ行動が有意に高値を示した。E. NTSR1 アゴニスト (PD149163) の扁桃体内両側投与によって、100 uM 投与群の 2 回目暴露時のすくみ行動が有意に低値を示した (全ての群のラットは $n = 7-8$; $*p < 0.05$ vs. 生理食塩水もしくは DMSO)。エラーバーは標準誤差を示す。

(5) MS の NTSR1 遺伝子プロモーター領域のメチル化の検討

図 5A は NTSR1 遺伝子の略図と CpG アイランドを示した。図 5B は NTSR1 のプロモーター領域の塩基配列と転写因子 (GATA, アクチベータータンパク質 2 (AP2), 特異的タンパク質 1 (SP1), CAAT ボックス, cAMP 応答配列 (CRE), 核因子インターロイキン 6 (NF IL6)) の結合可能部位を示した。第 1 エクソンの転写開始配列 ATG (+1) をアスタリスクで示した。NTSR1 遺伝子には、CpG アイランドの特徴を持つ G+C 豊富な領域が、転写開始配列を含む転写領域から伸びている (64.5%, 700 nt: -648 から +52)。-662 から -470 の間の転写領域に、NTSR1 遺伝子発現を促進する

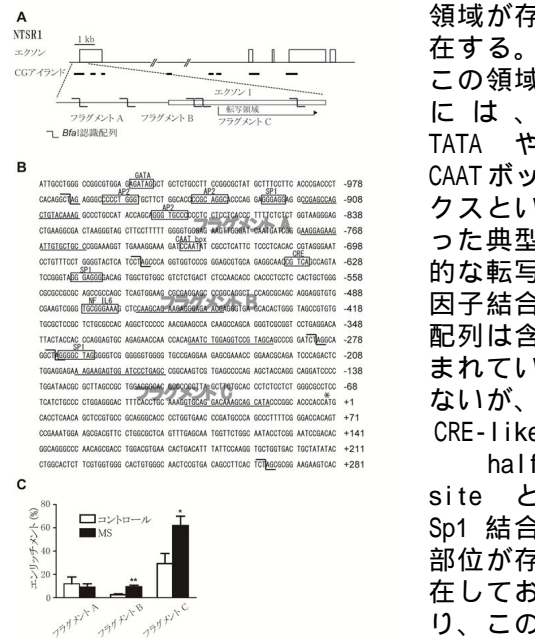


図 5 MS の NTSR1 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化への影響。A. NTSR1 遺伝子の略図と CpG アイランド (CGI) とフラグメント A、B と C の位置。B. NTSR1 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列 [34]。鍵型は B6.1 認識配列を示す。フラグメント A、B、C のプライマー塩基配列に下線を引いた。以下の転写因子が結合可能な場所を四角で示した。GATA, アクチベータータンパク質 2 (AP2), 特異的タンパク質 1 (SP1), CAAT ボックス, cAMP 応答配列 (CRE), そして核因子インターロイキン 6 (NF IL6)。第 1 エクソンの転写開始配列をアスタリスクで示した。C. MethyCollector Ultra Kit (Active Method) による NTSR1 プロモーター領域のメチル化解析の結果。エンリッチメント (%) は以下の式で計算した: $\text{エンリッチメント (\%)} = \frac{2^{(CT(FC) - CT(FC))}}{(1 + 2^{(CT(FC) - CT(FC))})} \times 100$ 。EF は 5 個以上の CpG 領域がメチル化している DNA 断片。UF は 4 個以下の CpG 領域がメチル化している DNA 断片。フラグメント B と C のエンリッチメント (%) は MS 群で有意に高値であった (n = 8 per group; *p < 0.05 vs. AFR, **p < 0.01 vs. AFR, unpaired t-test)。

強い制御領域が存在する。この領域には、TATA や CAAT ボックスといった典型的な転写因子結合配列は含まれていないが、CRE-like half site と Sp1 結合部位が存在しており、この部位が NTSR1 発現に対して重要な役割を担っている可能性がある。フラグメント A、B、C の位置を図 5A、5B に示した。図 5B の下線を引いた配列はフラグメント A、B、C のプライマーの位置を示している。エンリッチメント (%) は、各々のフラグメントのメチル化の程度を表している。リアルタイム PCR 解析によって、フラグメント B と C のエンリッチメント (%) は、MS 群は AFR 群と比較して有意に高値であることが示された (unpaired t-test; p < 0.01 と p < 0.05) (図 5C)。

(6) 結果の考察

本研究では、MS を負荷したラットは成獣後、恐怖条件付けされた不安行動が増強した。また、扁桃体の NTSR1 遺伝子発現が減少し、同遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化が

亢進した。加えて、扁桃体の NTSR1 を薬理的に遮断すると恐怖条件付けられた不安行動は増強し、逆に、NTSR1 を刺激すると不安行動は減弱した。これらの結果から、MS によって扁桃体の NTSR1 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化が亢進し、その結果 NTSR1 の発現量が減少して、恐怖条件付けられた不安行動が増強している可能性が考えられた。

MS ラットは AFR ラットと比較して、DEX/CRH テストにて、CRH 投与後のコルチコステロン血中濃度が有意に高値を示した。このことは、ELS によって HPA 系の異常が長期間にわたって続くという、過去のヒト及び動物実験の結果と一致している。MS は体重、高架式十字迷路試験で評価した不安行動、オープンフィールド試験で評価した活動量、フットショックによる痛みへの感受性には影響を与えなかった。一方で、CFS におけるすくみ行動は MS によって増加した。これらの結果から、MS を負荷されたラットは成獣後、恐怖条件付けられた不安記憶のプロセスに障害が生じている可能性が示唆された。

発達精神生物学や生理学の領域における研究では、環境によって遺伝子発現がリプログラミングされるという報告が多数存在する。これらの研究で共通して指摘されているのは、発達段階の環境が遺伝子発現とそれに引き続く機能の変化を引き起こし、その環境イベントが終了した後の成人になってからも続くということである。我々の結果では、MS によって、成獣後の扁桃体 NTSR1 の mRNA の発現量低下が生じていた。加えて、扁桃体の NTSR1 を薬理的に遮断すると CFS の 2 回目の暴露時のすくみ行動が増加し、NTSR1 を薬理的に刺激すると CFS の 2 回目暴露時のすくみ行動が減少した。これらの結果は、条件付けられた恐怖刺激における扁桃体の NTSR1 の重要性を示唆している。

本研究では、MS の扁桃体の NTSR1 遺伝子プロモーター領域のメチル化について検討した。フラグメント B と C の DNA メチル化は MS 群で有意に高値を示していた。フラグメント B は転写開始配列から 673-283 bp 上流に位置しており、NTSR1 遺伝子の発現を促進する強い制御領域を含んでいる。CpG ジヌクレオチド、特に、5' プロモーター領域のメチル化の亢進は、一般的に遺伝子発現の減少を引き起こすと言われている。よって、本結果から、MS ラットの NTSR1 遺伝子プロモーター領域のメチル化の亢進が、NTSR1 mRNA の発現の低下を引き起こしていると考えられる。要約すると、MS を負荷されたラットは成獣後、恐怖条件付けられた不安の亢進を認め、これは、扁桃体の NTSR1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の亢進によって生じている可能性が考えられる。

近年、ELS によって引き起こされた DNA のメチル化が、精神障害の発症・進行に関連している可能性が指摘されている。さらには、ヒトを対象とした臨床研究において、ELS は

心的外傷後ストレス障害や恐怖症の発症を促進すると報告されている。心的外傷後ストレス障害や恐怖症は、恐怖記憶のプロセスの異常が重要な役割を果たしていると言われており、本研究の結果から、扁桃体の NTSR1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、心的外傷後ストレス障害や恐怖症への脆弱性と関連している可能性が示唆された。

(7) 本研究の限界

本研究では、MS によって生じている扁桃体の NTSR1 mRNA の発現低下と恐怖記憶のプロセスの障害との関連が、因果関係があるのか相関しているだけなのかを明らかにしていない。この点が本研究の重大な限界である。このことを証明するためには、例えば、MS ラットの扁桃体の NTSR1 遺伝子を過剰発現させて、MS ラットの条件付けられた恐怖記憶の増強が改善することを確認する必要がある。恐怖記憶のプロセスには様々な遺伝子が関連していると報告されている。本研究でも、NTSR1 以外の遺伝子が恐怖記憶のプロセスに関連している可能性がある。恐怖条件付けモデルでは、再暴露の直前に薬剤を投与した際に効果が出る人が多いため、本研究では1回目暴露の直前に NTSR1 アゴニストとアンタゴニストを投与した。しかしながら、NTSR1 の CFS への効果を検討するために、恐怖条件付けの前や、条件付けの前と1回目暴露の前の両方などに薬剤を投与する実験も将来的に必要と考える。

(8) 本研究のまとめ

本研究では、MS によって扁桃体の NTSR1 遺伝子のプロモーター領域にエピジェネティックな変化が生じ、成獣後の恐怖条件付け記憶の増強を引き起こしている可能性があることを示した。これは、扁桃体の NTSR1 遺伝子のプロモーター領域の DNA のメチル化の変化が、恐怖条件付け記憶と関連していることを示した初めての研究である。しかしながら、本研究では、エピジェネティックな変化が相関しているだけなのか、因果関係があるのかについては証明することができていない。ELS は、成人後の不安障害やうつ病発症・進行の脆弱性に重要な役割を担っているとされている。本研究の結果から、扁桃体の NTSR1 遺伝子を操作することによって、これらの疾病から回復する可能性が示唆された。この仮説を証明するためには、MS ラットの扁桃体の NTSR1 遺伝子を過剰発現することによって、MS によって増強された恐怖条件付け不安記憶から回復するかどうかを確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hiroyuki Toda, Shuken Boku, Shin Nakagawa, Takeshi Inoue, Akiko Kato, Naoki Takamura, Ning Song, Masashi

Nibuya, Tsukasa Koyama, Ichiro Kusumi. Maternal Separation Enhances Conditioned Fear and Decreases the mRNA Levels of the Neurotensin Receptor 1 Gene with Hypermethylation of This Gene in the Rat Amygdala. PLoS One, 査読有, May 15;9(5), 2014

〔学会発表〕(計4件)

H Toda, S Nakagawa, S Boku, Ning Song, A Kato, T Inoue, T Koyama. Dexamethasone/corticotrophin releasing hormone test in maternal separation stress models. Neuroscience 2009, 2009, Chicago

H Toda, S Nakagawa, S Boku, Ning Song, N Takamura, A Kato, T Inoue, T Koyama. Maternal separation stress and vulnerability to anxiety behavior in rats. International College of Neuropsychopharmacology, 2010, Hong Kong

H Toda, S Nakagawa, S Boku, N Takamura, N Song, A Kato, T Inoue, T Koyama. Influence of early-life stress on behavior, HPA axis activity, gene expressions and hippocampal neurogenesis in adulthood rats. Neuroscience 2010, 2010, San Diego

H Toda, S Nakagawa, S Boku, N Song, N Takamura, A Kato, T Inoue, T Koyama. Vulnerability to anxiety behavior induced by maternal separation stress may occur through the increase of DNA methylation at neurotensin type 1 receptor promoter region in rat amygdala. Neuroscience 2011, 2011, Washington DC

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 裕之 (TODA Hiroyuki)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教

研究者番号：00610677