

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26380990

研究課題名(和文) 妊娠・産産期女性の感情障害脆弱性の基盤となる神経内分泌機構の実験的検討

研究課題名(英文) An experimental study of neuroendocrinological mechanisms underlying vulnerability to emotional disorders in pregnant and postpartum women.

研究代表者

富原 一哉 (TOMIHARA, KAZUYA)

鹿児島大学・法文教育学域法文学系・教授

研究者番号：00272146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： エストロゲンは視床下部 下垂体 副腎軸 (HPA軸) に影響を与え、また、HPA軸の過剰亢進が感情障害と関連すると考えられている。そこで本研究では、エストロゲンの慢性的な循環レベルの向上がもたらす情動関連行動亢進効果に、HPA軸の反応変化が関与するかの解明を試みた。結果として、副腎除去はエストラジオールによるメスマウスの情動行動調節には影響を与えず、またエストラジオール投与によって視床下部のストレス関連ホルモンのmRNA発現は変化しなかった。これらの結果は、この情動関連行動亢進効果にはHPA軸の関与が低いことを示唆しており、他の可能性の検討が必要となる。

研究成果の概要(英文)： Recently we demonstrated that the chronic treatment of estrogen at higher doses increased, but at lower doses decreased, emotional behavior in female mice. Estrogen is also considered to affect the activity of a hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and hyperactivity of the HPA axis is associated with emotional disorder. Therefore, we investigated whether disturbance of HPA axis mediates the enhancing emotional behavior by treatment of estradiol. As the results, adrenalectomy (ADX) did not prevent the effect of estradiol, the animals treated with a higher dose estradiol showed enhanced fear and anxiety-related behavior regardless of ADX. There was no clear alteration in mRNA expressions of stress-related hormones in hypothalamus of female mice which treated with various doses of estradiol. These results suggest that HPA axis might not related the estrogenic regulation of emotional behavior in that situation. Other possibilities should be investigated in the future researches.

研究分野： 実験心理学

キーワード： エストロゲン 不安障害 産後うつ ストレス ホルモン マウス 情動

### 1. 研究開始当初の背景

不安や抑うつなどの感情障害の発症率には性差があり、特に女性においては月経期や産後、あるいは更年期など、性腺ホルモンの変動が大きい時期にその発症率が高まる (Kessler & Walters, 1998; Seeman, 1997)。したがって、女性の感情障害に対する脆弱性には、エストロゲンなどの性腺ホルモンの機能が大きく関与しているものと考えられる。しかしながら、げっ歯類を用いた実験的研究では、エストロゲンが不安やうつを抑制するという報告 (e.g. Galeeva & Touhima, 2001; Wolf & Frye, 2005) と、逆に促進したという報告 (e.g. Morgan & Pfaff, 2001, 2002) があり、エストロゲンの情動調節機能は一様でないことが示されている。そこで、我々はこれまで、どのような条件においてエストロゲンが情動関連行動の抑制や促進の効果を発揮するのかを検討してきた。結果として、エストロゲンの情動関連行動調節に対する対極の効果の発揮には、実験で用いられたエストロゲンの用量や作用期間等の方法的相違が関係しており、行動的発情をもたらす量のエストロゲンの単回投与と比較的低容量の慢性投与は情動関連行動の抑制を引き起こすが、より高用量の慢性投与は、逆に情動関連行動の増大を引き起こすことが明らかとなった (畑地・富原, 2011; Tomihara et al, 2009)。高用量エストロゲン慢性投与によって引き起こされる継続的なエストロゲン循環レベルの上昇は、妊娠期のホルモン状態に近似するため、この手続きは「産後うつ」などの周産期の女性の感情障害発症の神経内分泌メカニズムを探るための動物モデルを提供すると考えられる。一方、単回投与や低用量慢性投与のエストロゲンによる情動関連行動の抑制は、むしろ更年期や月経期の精神症状の生起メカニズムに関与すると考えられる。

ところで、エストロゲンによる情動関連行動の抑制のメカニズムについてはすでに多くのことがわかっている (Reviewed by Wolf and Frye, 2006) が、逆の情動亢進メカニズムについてはまだ全く分かっていない。そこで、我々は情動関連行動亢進メカニズムについて中心的に探索することとした。

### 2. 研究の目的

我々はこれまで、エストロゲン受容体 (ER) サブタイプ選択的アゴニストを用いた実験によって、2つの細胞内 ER サブタイプのうち、情動抑制効果には ER $\beta$  が、情動亢進効果には ER $\alpha$  が主に関与することを見出した。また、予備的研究により、エストロゲンの情動抑制機能に関与するとされているセロトニンやオキシトシンの活性操作は、亢進効果には大きな影響を及ぼさないことも確認した。一方、情動亢進効果はストレス負荷により顕著化することや (畑地他, 2010)、先行研究においてストレスに対する副腎皮質ホル

モン分泌が ER の活性の操作によって変化すること (Weiser & Handa, 2009)、また副腎皮質ホルモンの投与が情動関連行動を増大させることなどから、ストレス対処の神経内分泌反応系である視床下部下垂体副腎軸 (HPA 軸) がエストロゲンの情動関連行動亢進メカニズムに関与している可能性が高いと考えた。そこで、本研究では、エストロゲンの慢性的な循環レベルの向上がもたらす情動関連行動亢進効果に、HPA 軸の反応変化が関与するかの解明を試みた。

### 3. 研究の方法

最初の実験では、エストロゲンの情動亢進が、HPA 軸の過活性による副腎皮質ホルモン分泌増大によって媒介されているかを確認するため、卵巣切除メスマウスに様々な用量の 17 $\beta$ -estradiol を慢性投与し、さらに副腎除去を行った上で、open-field テスト、高架式十字迷路テスト、明暗箱往来テスト、文脈恐怖条件づけ学習課題を実施した。

次に、エストロゲンによる HPA 軸の反応変化を確認するため、17 $\beta$ -estradiol 慢性投与した卵巣摘出メスマウスへ、急性と慢性の拘束ストレスを施し、その後の情動反応と視床下部ホルモンの測定を行った。

上記の一連の実験において、エストロゲンの情動亢進効果に対して HPA 軸があまり関与していないことが示唆されたため、他のメカニズムの可能性を検討するため、これまで行って来なかった行動テストを導入し、エストロゲンの効果を広く判定することにした。具体的には、卵巣摘出メスマウスへ様々な用量の 17 $\beta$ -estradiol を慢性投与し、一般活動性の指標とされるホームケージでの走行輪活動や PTSD などの情動障害の動物モデルとして一般的に用いられる手がかり恐怖条件づけ学習課題を実施した。

### 4. 研究成果

(1) 卵巣切除メスマウスに、高用量 (50 $\mu$ g/ $\mu$ l: EB50 群)、低用量 (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l: EB0.5 群) の 17 $\beta$ -estradiol あるいは溶媒の sesame oil (oil 群) のいずれかを封入したシリコン性カプセル皮下移植し、さらに半数には副腎除去 (ADX) を行った上で、open-field テスト、高架式十字迷路テスト、明暗箱往来テスト、文脈恐怖条件づけ学習課題を実施した。その結果、先行研究と一致して、EB50 群で他の 2 群と比較して、明暗箱往来テストにおける明室滞在時間が短いことや文脈恐怖テストでのすくみ行動が増大するなど、不安や恐怖などの情動関連行動が亢進することが示された (図 1)。一方、副腎除去は、恐怖学習を全体的に低下させたものの、なお高用量群で高い不安や恐怖の傾向が示されたため、エストロゲンによる情動亢進効果には副腎除去は影響を及ぼさないことが示された。したがって、HPA 軸がエストロゲンの情動亢進効果に関与するとしても、それは上位の視床下

部 下垂体レベルであると示唆された。

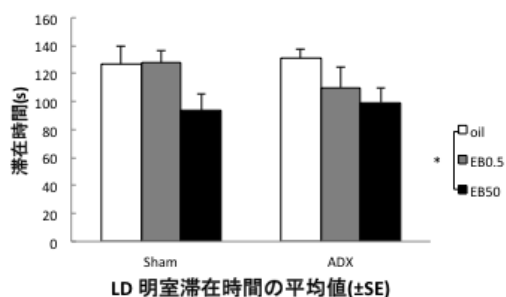


図1 明暗箱往來テストにおける明室滞在時間。エストロゲンの高用量投与群 (EB50) では低用量投与群 (EB0.5) や溶媒投与群 (oil) よりも滞在時間が短かったが、副腎除去 (ADX) はこの傾向に影響を与えなかった。

(2) 卵巣摘出メスマウスへ用量の異なるエストロゲンを慢性投与し、急性と慢性の拘束ストレスを施した際のメスマウスの情動反応と視床下部ホルモン反応を検討した。その結果、先行研究と一致して、高用量エストロゲンを投与したマウスの情動関連行動は亢進するが、急性や慢性の拘束ストレス処置による情動関連行動の変化は認められないことが示された (図2)。また、視床下部のコルチコトロピン放出ホルモンやバソプレシン、オキシトシンといったホルモンに関しても、免疫組織化学法により mRNA 発現を確認したが、エストロゲン投与やストレス処置による明確な影響は認められなかった (図3)。

視床下部のストレス反応系の変化なくエストロゲンの情動亢進作用が生じたという結果から、この作用は視床下部を中心としたストレス反応変化を介して生じているのではなく、むしろ異なる経路、例えば扁桃体や青斑核の活性変化などが関与している可能性が高い。

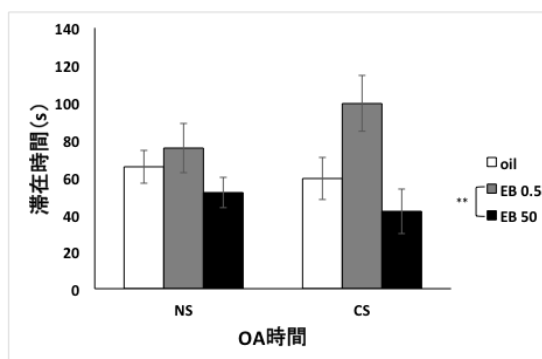


図2 高架式ゼロ迷路におけるオープンアーム (OA) 滞在時間。慢性ストレス群 (CS) でも非ストレス群 (NS) でも同様に、高用量投与群 (EB50) では低用量投与群 (EB0.5) よりも OA 滞在時間が短かった。

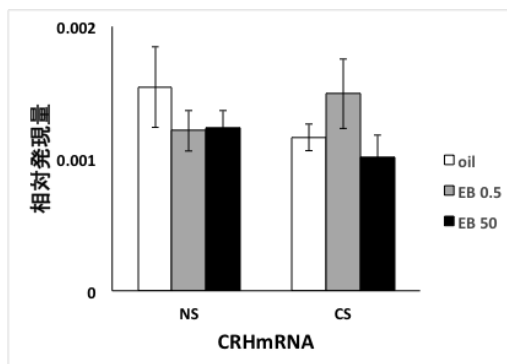


図3 視床下部におけるコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) mRNA の相対発現量。慢性ストレス群 (CS) でも非ストレス群 (NS) でも、エストロゲン投与用量による違いはなかった。

(3) 多くの情動関連行動テストの測度は「不動」や「すくみ」などの行動を含むため、一般活動性の影響を強く受ける。そこで、エストロゲンの対極的情動調節効果が、一般活動性の変化を介したアーチファクトではないことを確認するため、これまでと同様のホルモン操作手続きを用いて、マウスのホームケージ内回転輪走行活動を測定した。その結果エストロゲンの慢性投与は、用量にかかわらず、卵巣切除メスと比較して、走行輪活動によって測定されるメスマウスの一般活動性を増大させ、少なくとも高濃度のエストロゲンによるメスマウスの情動関連行動増大は、一般活動性の変化を原因とするものではないことが示された。

次に、PTSD などの情動障害の動物モデルとして一般的に用いられる恐怖条件づけ学習に対しても、エストロゲンが同様の効果を発揮するかを検討した。卵巣を摘出したメスマウスへ用量の異なるエストロゲンを長期慢性投与または単回急性投与し、文脈的恐怖条件づけと手がかり恐怖条件づけの2種類の恐怖条件づけテストでの恐怖反応を測定した。その結果、投与期間に関わらず、エストロゲンの高用量処置は、文脈的恐怖条件づけテストにおけるマウスのすくみ行動を促進させたが、手がかり恐怖条件づけテストにおいては、エストロゲン処置による差は示されなかった。文脈的恐怖条件づけは海馬依存、手がかり恐怖条件づけは扁桃体依存とされているため、本研究における相異は、恐怖学習に対するエストロゲンの作用部位を反映したものであると推測される。

#### 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 4件)

Nakata, M., Sano, K., Musatov, S., Yamaguchi, N., Sakamoto, T., and Ogawa,

S. Effects of pre-pubertal or adult site-specific knockdown of estrogen receptor  $\beta$  in the medial preoptic area and medial amygdala on social behaviors in male mice. *eNeuro*, 2016, **3**(2) e01555-15. 1-14. (査読有)

DOI: 10.1523/ENEURO.0155-15.2016

小川園子 性ステロイドホルモンの中枢作用による行動調節 *最新女性医療*, 2016, **3**(2), 58-62. (査読無し)

Kazuya Tomihara, Takahiro Zoshiki, Sayaka Y. Kukita, Kanako Nakamura, Ayuko Isogawa, Sawako Ishibashi, Ayumi Tanaka, Ayaka S. Kuraoka and Saki Matsumoto. Effects of diethylstilbestrol exposure during gestation on both maternal and offspring behavior. *Frontiers in Neuroscience*, 2015, **9**, Article 79. (査読有)

DOI: 10.3389/fnins.2015.00079.

大川あゆみ・富原一哉 女性の情動関連障害への脆弱性に対する性腺ホルモンの関与 *地域政策科学研究*, 2015, **12**, 69-89. (査読有)

<http://hdl.handle.net/10232/23101>

[学会発表](計11件)

富原一哉 育てる脳,育てられる脳 -「子育て」で変わる親子の脳- 生涯学習県民大学講座 2016年12月3日 かごしま県民大学中央センター(鹿児島県鹿児島市)

Kazuya Tomihara Estrogenic modulation of wheel-running activity is independent of that of fear- and anxiety-related behavior in female mice. 31st International Congress of Psychology 2016年7月28日 PACIFICO 横浜(神奈川県横浜市)

芹ヶ野優美・富原一哉 メスマウスの文脈及び手がかり恐怖条件づけ学習に対するエストロゲン処置の影響 第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 2015年9月18-19日 仙台市戦災復興記念館(宮城県仙台市)

富原一哉・井口法子 雄マウスの prepulse inhibition 阻害に対するエストロゲンの保護作用 第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 2015年9月18-19日 仙台市戦災復興記念館(宮城県仙台市)

Ayumi Okawa, Kazuya Tomihara The effects of chronic treatment of high-dose estrogen on the corticosterone concentration in serum and the mRNA expression of stress-related hormones in hypothalamus. 日本動物心理学会第75回大会 2015年9月11日 日本女子大学目白キャンパス(東京都文京区)

富原一哉 母性阻害の神経内分泌とその

適応的意義 鹿児島神経科学研究会第6回研究発表会 特別講演(招待講演) 2015年8月8日 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

小川園子 動物を用いた行動実験の理論と実際:行動神経内分泌学の立場から 第41回日本神経内分泌学会学術集会 神経内分泌入門(基礎編)(招待講演) 2014年11月2日 都道府県会館(東京都千代田区)

小川園子 社会行動の性差発現を支えるホルモンの働き 第67回日本自律神経学会総会シンポジウム「内分泌機能から見た自律神経調節」(招待講演) 2014年10月30日 ホテルラフレさいたま(埼玉県さいたま市)

Sonoko Ogawa Role of Two Types of Estrogen Receptors in Life-Long Action of Gonadal Steroids in the Regulation of Social Behavior. Satellite Meeting in Sydney ICN2014, "Recent and Future Trends in Neuroendocrinology -from Asia and Oceania to Global-", (招待講演) 2014年8月16日 Novotel Hotel Sydney Manly Pacific (Sydney, Australia)

Ayumi Okawa, Kazuya Tomihara 2014 Effects of adrenalectomy on estradiol-induced enhancement of emotion-related behavior in female mice. 日本動物心理学会第74回大会 2014年7月20日 犬山国際観光センター「フロイデ」(愛知県犬山市)

Kazuya Tomihara, Takuya Okawa 2014 Roles of estrogen receptor alpha and beta in regulation of emotion-related behavior by chronic treatment of estradiol in female mice. 日本動物心理学会第74回大会 2014年7月19日 犬山国際観光センター「フロイデ」(愛知県犬山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富原一哉(TOMIHARA KAZUYA)  
鹿児島大学・法文教育学域法文学系・教授  
研究者番号:00272146

### (2) 研究分担者

小川園子(OGAWA SONOKO)  
筑波大学・人間総合科学研究科・教授  
研究者番号:50396610

### (3) 研究協力者

大川あゆみ(OKAWA AYUMI)  
鹿児島大学大学院・人文社会科学研究所  
博士前期課程・大学院生