



Title	母子分離ストレスの恐怖条件付け記憶増強の分子メカニズムに関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	戸田, 裕之
Description	配架番号 : 1680
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6927号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57210
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroyuki_Toda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 戸 田 裕 之

学 位 論 文 題 名

母子分離ストレスの恐怖条件付け記憶増強の分子メカニズムに関する研究

(Molecular mechanisms for the enhancement of conditioned fear memory induced by maternal separation)

【背景と目的】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）に晒されることによって、成人後のうつ病、不安障害などのリスクが増加することが示されている。幼少期の環境が遺伝的要因に影響して、遺伝子発現、そして生物学的な機能の変化を引き起こし、成人期の精神障害発症に至ると考える。このような“プログラム”効果は、ゲノム遺伝子の構造変化に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。ELS に晒されると成長後も、恐怖条件付けモデル（conditioned fear stress, CFS）による不安反応が亢進す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記憶のプロセスの障害に対して、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。DNA マイクロアレイを用いた我々の研究で、CFS によって変化し、不安障害の治療薬の一つであるセロトニン再取り込み阻害薬でその変化が回復す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。本研究では、母子分離ストレス（maternal separation, MS）を負荷されたラットの CFS における恐怖記憶のプロセスの障害と NTS 系の関連について検討した。

【材料と方法】（１）動物・行動解析。体重 230 - 270 g の雄性 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（animal facility rearing, AFR）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、雄性仔ラットのみ使用し、行動実験、生化学・分子生物学的実験を 10～14 週令目に施行した。Dexamethasone (DEX) /corticotropin releasing hormone (CRH) 試験、高架式十字迷路試験、海馬の Bromodeoxyuridine (BrdU) 陽性細胞数の測定、フットショック感受性試験、CFS など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 NTSR1 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 RT-PCR 法により遺伝子発現解析を実施した。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実施した。統計解析は SPSS statistics version 21 を用いた。全ての実験は、北海道大学動物実験委員会によって承認され、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。

【結果】（１）MS の視床下部・下垂体・副腎（hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA）系の異常の有無を DEX/CRH 試験を用いて検討した。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、交互作用に有意差は存在しなかった。オープンフィールド試験における、総移動距離と内側領域滞在時間、高架式十字迷路試験による、総移動距離と開放アーム侵入回数に有意差はなかった。（２）2 群間で海馬の BrdU 陽性細胞数に変化はなかった。（３）CFS において反復 2 元配置分散分析の結果、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 2 群間で有意差を認めた。(4) MS 群は AFR 群と比較して、NTSR1 の mRNA 発現量が扁桃体で有意に低下していた (unpaired t test, $p < 0.05$)。

(5) フットショック実施 24 時間後の同一箱暴露によって、NTSR1 の mRNA が有意に上昇した (1 元配置分散分析, $p < 0.05$)。(6) NTSR1 アンタゴニスト (SR48692) の扁桃体への局所投与によって、すくみ行動は 1 回目暴露 ($F_{(1, 19)} = 5.25$, $p < 0.05$)、2 回目暴露 ($F_{(1, 19)} = 37.17$, $p < 0.01$) とともに、薬剤投与による有意な変化を示した。Tukey 法による多重比較では、2 回目暴露群で 1000 nM 投与群が DMSO 投与群よりすくみ行動が亢進していた ($p < 0.05$)。また、NTSR1 アゴニスト (PD149163) の扁桃体への局所投与によって、2 回目暴露 ($F_{(3, 25)} = 5.45$, $p < 0.05$) で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 μ M 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 ($p < 0.05$)。(7) MS 群は AFR 群と比較して、NTSR1 遺伝子プロモーター領域を含む DNA フラグメントのメチル化が亢進していた (unpaired t test, $p < 0.05$)。

【考察】MS ラットは AFR ラットと比較して HPA 系のネガティブ・フィードバックの亢進を認めた。このことは、ELS によって HPA 系の異常が長期間に渡って続くという、過去のヒト及び動物実験の結果と一致している。MS ラットは高架式十字迷路試験とオープンフィールド試験における、条件付けられていない不安行動や活動量に変化はなかった。一方、MS は CFS におけるすくみ行動が 2 回目の暴露で増加しており、MS を負荷したラットは成獣後、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。また、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。これらの結果からも、恐怖条件付けられた不安記憶のプロセスにおける扁桃体の NTSR1 の重要性が示唆された。

本研究では、MS の扁桃体の NTSR1 遺伝子プロモーター領域を含む DNA 断片でのメチル化が亢進していた。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、不安記憶のプロセスの異常が重要な役割を果たしているとされており、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に関連している可能性が示唆された。

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。また、NTSR1 の mRNA の発現量の変化しか結果に示せず、技術的な問題もあり NTSR1 蛋白の発現量減少は確認できなかった。さらには、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おり、本研究で測定した遺伝子以外の恐怖記憶の増強に関連している可能性がある。

【結論】本研究の結果から、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示唆された。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可能性を示した初めての研究である。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。