

若令ラットでは、線条体で、30分と120分以降で有意に($P<0.05$)負荷前と比較して TNF 含量が増加し、ストレスによって、TNF が線条体で変化して行くことが明らかとなった。また、老令と若令の比較では、線条体、視床下部において基礎値で、老令群で有意に TNF 含量が小さかった。

D. 考察

脳内のサイトカインの変化については、これまでストレスとインターロイキン 1β に関する報告が多く、今回我々が調べた TNF に関する報告は少ない。今回脳内のいくつかの部位で TNF の含量が老化によって変化していることは、老化による HPA 系やその他の脳機能の変化を考える上で興味深いものと考えられた。

E. 結論

本年度、恐怖条件づけにおける、老化による pCREB の変化が確認された。pCREB のリン酸化にはサイトカインが関与することが想定されており、脳内で認められたサイトカインの含量の差や、ストレスによる変化が今後どのように影響して行くかさらに検討して行きたい。

F. 引用文献

- 1) J.W. Papez : A proposed mechanism of emotion. Arch Neurol Psych 39: 725-743 ,1937.
- 2) L. Stubley-Weatherly, J.W. Harding, J.W. Wright :Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats : Brain Res. 716: 29-38, 1996.
- 3) K.A. McNish, J.C. Gewirtz, M.Davis: Evidence of contextual fear after lesions of hippocampus : a disruption of freezing but not fear-potentiated startle. J, Neurosci. 17: 9353-9360, 1997.

- 4) R. Bourtchuladze, B. Frenguelli, J. Blency, D. Cilffi, G. Schutz, A.J. Silva: Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding Protein. Ce11 79: 56-68, 1994.
- 5) S. Impey, D.M. Smith, K. Obrietan, R. Donahue, C. Wade, D.R. Storm: Stimulation of cAMP response element(CRE)- mediated transcription during contextual learning. Nature Neurosci. : 595-601, 1998.
- 6) J.A. Oler, E.J. Markus : Age-related deficits on the radial maze and in fear conditioning : hippocampal processing and consolidation. Hippocampus 8: 402-415, 1998.
- 7) C.A. Murray, M.A. Lynch: Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin- 1β is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. J. Neurosci. 18, 2974-2981, 1998.
- 8) M. Hatzinger, J.M.H.M. Reul, R. Landgraf, F. Holsboer, I. Neumann : Combined Dexamethasone / CRH test in rats : Hypothalamo-pituitary-adrenocortical system alterations in aging, Neuroendocrinology, 64:349-356, 1996.
- 9) M. Odio, A. Brodish: Age related adaptation of pituitary-adrenocortical responses to stress, Neuroendocrinology: 49:382-388, 1989
- 10) S. Scaccianone, A. De Sciallo, L. Angelucci: Age related changes in hypothalamo-pituitary-adrenocortical system activity in the rat, Neuroendocrinology, 52:150-155, 1990.
- 11) J.M.H.M. Reul, J. Rothuizen, E.R. de Kloet: Age related changes in the dog hypothalamo-pituitary-adrenocortical system:

Neuroendocrine activity and corticosteroid receptors. *J Steroid Biochem mol Biol*, 40:63-69,1991.

12) Jam van Eelkelen, N.Y.Rots, W.Sutanto, E.R. de kloet: The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the brown norway rat, *Neurobiol Aging*, 13: 159-170, 1991.

13) R.L. Hauger, K.V.Thrivikraman, P.M.Plotsky: Age-related alterlations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male fischer 344 rats, *Endocrinology*, 134: 1528-1536,1994.

14) F.Shintani, T.Nakaki, S.Kanba et al: Involvement of interleukine-1 in immobilization stress induced increase in plasma adrenocorticotropic hormone and in release of hypothalaic monoamines in the rat, 15: 1961-1970, 1995.

15) A.D.Dunn, J.Wang: Cytokine effects on CNS biogenic amines, *Neuroimmunomoduration*, 2: 319-323, 1995.

16) 杉山仁視, 久保田正春, 神庭重信: 科学的基盤としての神経・免疫・内分泌相関, リエゾン精神医学・精神科救急医療(黒澤尚, 山脇成人 編), 中山書店, 東京, 2000.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

高齢者の精神機能老化機序の解明とその対策に関する精神神経免疫学的研究

老化ラットのストレス脆弱性に関する研究
—アポトーシス関連遺伝子からみた脆弱性—

分担研究者 山脇 成人 広島大学医学部精神神経医学講座教授

老年期ストレス性精神障害の発症機序に、Bcl-2・Baxの発現変化を介したアポトーシスによる神経細胞障害が関与している可能性を明らかにする目的で、成人期及び高齢ラット脳内Bcl-2・Bax発現に対する慢性多様性ストレスの影響を検討した。

本研究の結果、成人期及び高齢ラット大脳皮質前頭部・海馬のBcl-2・Bax mRNA発現やBcl-2・Bax immunoreactivityレベルは、対照群（同年齢未処置群）と比較して有意な差のないことが明かとなった。従って本研究結果から、老年期のストレス脆弱性の亢進に、ストレス誘発性のアポトーシス機構は関与していないと考えられた。

キーワード： aged rat, multiple stress, apoptosis, Bcl-2, Bax

A. 研究目的

ストレスによって引き起こされる代表的な精神疾患に、うつ病や外傷後ストレス障害があげられる。老年期うつ病は成人期のうつ病と比較して、しばしば抗うつ薬による治療への反応性に乏しく、病状の遷延化が起こりやすいという特徴がある。このような老年期うつ病の臨床経過に加えて、再発を繰り返すような老年期の難治性うつ病患者では、MRIを用いた海馬の容積の有意な低下が報告されている。同様に抗うつ薬への治療反応性に乏しい外傷後ストレス障害でも、海馬の容積の有意な低下が報告されている。このようなストレスの前駆する精神障害にみられる海馬の萎縮のメカニズムに関しては、これまで余り検討が成されていない。しかしながらサルやラットを用いた動物実験から、適応困難なストレスの長期暴露によって海馬の錐体細胞の変性・消失が報告されており、上述した精神障害での海馬の萎縮にはストレスによる神経細胞の変性による変化が密接に関与していると推察されている。

一方でストレスによる神経細胞の変性過程には、ネクローシスによる過程とアポトーシスによる過程の関与が予想されているが、そのいずれのメカニズムによるかは未だに不明である。近年のアポトーシスの分子機序に関する研究の発展から、protooncogeneであるBcl-2はアポトーシスを誘発するチトクロームcのミトコンドリアから細胞質への流出を阻害する作用のあることが解明され、アポトーシスの抑制に重要な役割を果たしていると

考えられている。その一方でBcl-2ファミリーの1つであるBaxは、bcl-2とヘテロダイマーを形成してBcl-2の抗アポトーシス機能を阻害することが報告され、アポトーシスを促進する上で重要な役割を担っていると考えられている。

このような観点から今回我々は、以下のようなストレス性精神障害の発症機序を解明する目的で、慢性多様性ストレスによるラット脳内Bcl-2、Baxの発現に対する影響を検討した。1) 適応困難な慢性ストレスの暴露によって、ラット脳内のBcl-2、Baxの発現がアポトーシス誘発的に変化する。2) 成人期ラット脳での変化に比べ、高齢ラット脳でのストレスによるアポトーシス誘発性は亢進している。

B. 研究方法

実験には、全て雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、生後 11 週齢のものを成人期ラット、生後 20 か月のものを高齢ラットとした。各群の対照群は、同年齢でハンドリングのみ行ったラットを用いた。固形飼料および蒸留水は自由に摂取出来るようにし、12 時間毎に明暗期を保ち飼育した。なお、以下の実験は広島大学動物実験指針に基づき行った。

ストレスは、適応困難で海馬の神経細胞の変性を起こすことが報告されている慢性多様性ストレス（拘束ストレス 60 分、振動ストレス 60 分、強制水泳ストレス 30 分を連続して毎日行う）を 21 日間負荷した。ストレスパラダイム終了直後に断頭し、大脳皮質前頭部および海馬

を抽出し、-80°Cで凍結保存した。

ラット大脳皮質前頭部および海馬内の bcl-2、bax mRNA 発現量の測定は Northern blot 法にて行った。Total RNA の抽出後、MOPS, formaldehyde を含む 1% agarose gel に 15 µg の total RNA を電気泳動し、nitrocellulose 膜に転写した。Bcl-2, Bax のプローブは、各塩基配列と相補的な 40 mer のオリゴヌクレオチドに terminal transferase を用いて [α -³²P] dATP で標識して、プローブとしてハイブリダイゼーションに用いた。各物質の転写産物である放射活性をもつバンドの解析には、フジフィルムの BAS2000 を用いた。

Bcl-2, Bax の蛋白発現に該当する、各物質の immunoreactivity の計測は、Western blot 法にて行った。脳組織から細胞質分画を取り出し、40 µg の蛋白量を 10% SDS-polyacrylamide ゲルで泳動し、ナイロン膜に転写した。次に、Bcl-2, Bax の 1 次抗体、2 次抗体 (HRP-linked) でインキュベーションを行い、各物質の蛋白発現の該当するバンドを検出した。その後、各物質の immunoreactivity の値を得るために、検出したバンドの濃度をデンストメーターで測定した。

各群間の発現量の比較は、Mann-Whitney U test を用い、5%有意水準以下で有意と判断した。

C. 研究結果

成人期ラットによる結果：成人期ラットでの、慢性多様性ストレスによる大脳皮質前頭部及び海馬の Bcl-2, Bax mRNA の発現を検討したが、対照群との間に有意な差はみられなかった。Bcl-2, Bax の immunoreactivity の慢性多様性ストレスによる影響を同じく大脳皮質前頭部及び海馬で検討したが、有意な差はみられなかった。

老齢ラットによる結果：老齢ラットでの、慢性多様性ストレスによる大脳皮質前頭部及び海馬の Bcl-2, Bax mRNA の発現を検討したが、対照群との間に有意な差はみられなかった。Bcl-2, Bax の immunoreactivity の慢性多様性ストレスによる影響を同じく大脳皮質前頭部及び海馬で検討したが、有意な差はみられなかった。

D. 考察

今回の研究結果は、成人期及び老齢ラットに適応困難な多様性ストレスを慢性に投与しても、ストレス負荷による大脳皮質前頭部・海馬の Bcl-2, Bax の mRNA レベル及び immunoreactivity レベルは

変化しないことを示していた。今回の研究では、直接アポトーシスの発現を証明する TUNEL 染色などの、神経細胞の変性をみる実験は行わなかった。しかしながら、Bcl-2 発現の低下はアポトーシス誘導に極めて重要とされている点を考えると、今回用いた慢性多様性ストレス暴露ではアポトーシスの関与する神経細胞変性は引き起こされないと推論される。ストレスに伴う細胞障害の形成過程には、興奮性アミノ酸刺激による NMDA 受容体を介した細胞内カルシウムの濃度亢進や、グルココルチコイド亢進によるグルコースの取り込み低下による変性メカニズムなどが報告されている。このような細胞障害のメカニズムが、ネクロシスを引き起こすのかアポトーシスを引き起こすのかは未解明であり、ストレス性精神障害の発症機序を明らかにする上で今後の検討が必要と考えられる。その一方で高齢者にみられるストレス脆弱性の発現に関しては、同一ストレスが成人期に暴露された場合と異なる遺伝子発現変動による機能障害の関与の可能性もあり、高齢及び成人期ラットの間での同一ストレスに対する遺伝子発現の違いなどを比較検討していく必要もあると思われる。

E. 結論

老齢及び成人期ラットで見られる慢性多様性ストレスに伴う海馬神経細胞の変化は、アポトーシスとは異なったメカニズムによって引き起こされる可能性が示唆された。同時に高齢者にみられるストレス脆弱性の形成に、アポトーシスによる機能障害は関与しない可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

論文発表

特記すべき事項なし。

学会発表

第 23 回日本生物学的精神医学会にて発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Takashi Kudo	Impairment of response to ER stress in presenilin 1 mutant	C.Tanaka, P. I.McGeer, Y.Ihara	Neuroscientific Basis of Dementia	Birkhäuser	Basel	2001	193-199

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
神庭重信他	情動記憶と海馬	日本薬理学雑誌	116巻補冊	111-115	2000
Nobuto Shibata et al	No genetic association between alpha-2 macroglobulin I100V polymorphism and Japanese sporadic Alzheimer's disease	Neurosci.Lett.	290	154-156	2000
Takashi Kudo et al	Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease?	Neurobio.Aging	21	215-224	2000
工藤 喬他	プレセニン蛋白の病理	Pharma Medica	18(2)	41-48	2000.

20000176

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。