

厚生科学研究費補助金  
脳科学研究事業

ストレスへの適応破綻の脳内分子機構の解明と  
予防法の開発に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13年(2001年)3月

主任研究者 山 脇 成 人

## 目 次

I. 総括研究報告書	
ストレスへの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究……………	1
II. 分担研究報告書	
1. ストレスによる遺伝子発現機構研究……………	10
森信 繁	
2. ストレスによる細胞内情報伝達機構研究……………	14
加賀谷有行	
3. ストレスの適応破綻に関する臨床的研究-Sensory gating system-に関する研究……	15
岡本 泰昌	
4. ストレスの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究……………	17
西谷 信之	
5. ストレス負荷時の神経細胞アクチン骨格再構成に関する研究……………	24
尾藤 晴彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

ストレスの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究

主任研究者 山脇成人 広島大学医学部神経精神医学講座 教授

研究要旨 ストレスに対する適応破綻の脳内メカニズムを明らかとする目的で、平成 12 年度は以下のような研究を試みた。1) 急性ストレス負荷によってカルシウム依存性の細胞内情報伝達物質である protein phosphatase 2A, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)の活性が亢進する。ストレス負荷に伴う転写因子 cAMP response element binding protein のリン酸化からみると、ストレス負荷中はキナーゼ活性が、ストレス終了後はフォスファターゼ活性の亢進が有意になると考えられた。2) ストレス脆弱モデルラット海馬では、ストレス負荷によって細胞内情報伝達物質である C-Jun N-terminal kinase 2, heat shock 90-kDa protein A の発現が顕著に変動していた。3) 薬理的ストレスモデルであるデキサメサゾン慢性投与によって、セロトニン 2A 受容体-カルシウムを介した細胞内情報伝達機能が亢進していた。4) ストレスによる海馬神経細胞の機能形態変化をみるために、Dr. Eric R. Kandell より提供された CaMKII promoter を用いて GFP-actin 複合体を、海馬神経細胞の初代培養細胞に発現させた。5) 細胞内カルシウム濃度亢進の機構の違いによって、アクチンの細胞内での動きの異なることが明らかとなった。6) 脳磁場を用いたストレスによる脳機能の研究から、外界からの刺激に対する馴化の抑制をストレスは引き起こす可能性が示唆された。7) 脳磁場・頭皮上脳波を用いた研究からストレス負荷及び負荷後も、後頭部 $\alpha$ 波に代表される大脳基礎律動の抑制の起こることが明らかとなった。8) 脳磁場・磁気共鳴分光法を用いたストレス研究から、優位半球の海馬を中心に海馬の神経律動抑制とエネルギー代謝の亢進の引き起こされることが明らかとなった。

このような結果の大半は急性ストレスによる脳内情報伝達機能の変動をみたものであり、ただ単にストレスに伴う反応をみている可能性がある。従って次年度以降は、慢性多様性ストレスモデルやストレス性精神障害症例での各種検討を行い、ストレス適応破綻のメカニズム解明に迫る計画である。

分担研究者 森信繁  
広島大学医学部  
助教授  
加賀谷有行  
広島大学医学部  
講師  
岡本泰昌  
広島大学医学部  
助手  
西谷信之  
国立身体障害者  
リハビリテーションセンター研究所  
室長  
尾藤晴彦  
京都大学医学研究科  
講師

神機能の障害であり、精神医学的見地からみると外傷後ストレス障害やうつ病がこれに該当すると考えられる。従ってストレスに対する適応破綻の脳内メカニズムを解明することは、ストレス関連性精神障害の発症機序・治癒過程の解明にもつながり、現在その有病率の増大が懸念されているうつ病の治療法の改革にも寄与する重要な課題と思われる。このような観点から本研究では基礎研究として、1) ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明(分担:森信 繁)・2) ストレスによる細胞内情報伝達研究(分担:加賀谷有行)・3) ストレスによる神経機能形態研究(分担:尾藤晴彦)を、臨床研究として4) MEGを用いたストレスによる脳機能変動の研究(分担:岡本泰昌)・5) MEGによる脳機能研究とその画像診断(分担:西谷信之)を課題に、ストレスの適応破綻の分子メカニズムに関する研究を行った。

A. 研究目的

適応困難なストレスに生体が暴露されると、種々の臓器で固有のホメオスタシスが障害され、適応破綻状態が引き起こされる。脳での適応破綻の表現型が精

初年度になる平成 12 年度については、各分担研究部門で以下のような目的によ

る研究を遂行した。

A-1. ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明：脳内遺伝子の転写過程で重要な役割を担っている cAMP response element binding protein (CREB)の活性化-不活化に及ぼすストレスや抗うつ薬の作用を解明する目的で、本年度は protein phosphatase (PP) 2A, calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II の活性に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響を検討した。これと平行して本年度の同分担研究では、ストレス脆弱性の形成の脳内メカニズムを解明する試みとして、ストレス脆弱ラットの海馬でストレスによって特異的に発現の変動する遺伝子の探索を開始した。

A-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究：ストレスによって引き起こされるセロトニン(5-HT<sub>2</sub>)受容体に共役した細胞内情報伝達系の障害を明らかにする目的から、本年度は薬理学的ストレスモデルとしてのデキサメサゾン慢性投与による 5-HT 受容体刺激行動・5-HT 受容体性状・phospholipase C (PLC)などの細胞内情報伝達物質の変化を検討した。

A-3. ストレスによる神経機能形態研究：ストレスによって引き起こされる海馬神経細胞の早期変性メカニズムを形態学的に解明することを目的に、本年度は可視化できる GFP-actin の作成とこの複合体の海馬培養細胞への導入を試みた。

A-4. MEG を用いたストレスによる脳機能変動の研究：外界からの刺激に対して個体の適応を促進する形で作用していると考えられている sensory gating system (gating out と gating in という概念から成り立つ機能であり、前者は重要でない刺激に対する受容機能の縮小を、後者は重要な刺激に対する受容機能の増幅を意味する)のストレスによる変化を解明する目的で、本年度は健康成人を対象に MEG を用いて急性ストレスの gating out に及ぼす影響やストレス予期反応と gating out との関連性を検討した。

A-5. MEG による脳機能研究とその画像診断：ストレス負荷の及ぼす海馬を含む脳活動の変化の解明を目的に、本年度は頭皮上脳波・脳磁場計測・磁気共鳴分光法を用いてストレスの脳機能への影響を検討した。

## B. 研究方法

B-1. ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明

雄性 Sprague-Dawley ラットを対象に、急性拘束ストレスや抗うつ薬（三環

系のイミプラミンと選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) パロキセチン) 単回投与・14 日間投与の下記酵素活性に与える効果を検討した。

PP2A のセリン/スレオニンフォスファターゼ活性を計測した。方法としては PP の基質として特異的な Promega 社製の phosphopeptide を用いて、PP2A 活性に適した反応条件下で phosphopeptide の分解による、free phosphate の量を spectrophotometer で計測した。脳組織の蛋白量は、Bio-Rad Protein Assay 法で測定した。CaMKII 活性測定には、脳組織から遠心法にて抽出した細胞質分画を、サンプルとして用いた。測定法はカルシウム・カルモジュリン存在下及び非存在下での [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP の取り込みを、CaMKII に特異的な biotinylated peptide substrate (BPS) と biotin capture membrane の結合を用いてシンチレーションカウンターで計測することで行った。同様に脳組織の蛋白量は、Bio-Rad Protein Assay 法で測定した。

マクロアレイ・マイクロアレイ法によるストレス脆弱性関連遺伝子の検索には、下記の二つのストレス脆弱モデルラットの海馬を用い、正常飼育ラット海馬との間で急性ストレス負荷に伴って発現の顕著に異なる遺伝子を探索した。新生児期分離ストレスパラダイムでは新生児期母子分離 7 日間を負荷した個体を脆弱とみなし、成熟後に急性拘束ストレスを負荷し、同一のストレス負荷を受けた正常飼育個体との間での遺伝子発現を比較した。慢性過密飼育ストレスパラダイムでは 21 日間の過密飼育によって、正常環境飼育ラットと比較して有意に体重増加の低い個体を脆弱群とみなした。これに対して 21 日間の過密飼育にもかかわらず、正常環境飼育ラットと同様の体重増加を示したラットをストレス耐性群と見なした。同様に急性拘束ストレス負荷を行い、海馬で顕著に発現の異なる遺伝子を探索した。マクロアレイ法は 200 個の cDNA を含む Clontech Rat Stress Array を用い、mRNA から [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 存在下で逆転写した cDNA をプローブとする方法で行った。マイクロアレイ法は 1152 個の遺伝子に特異的な oligonucleotide を含む Margen 社の Rat Express Microarray を用い、mRNA から single strand cDNA→double strand cDNA→biotin-rCTP による標識 cRNA をプローブとする方法で行った。この cRNA probe を glass microarray と hybridization 後、biotin に対する二次

抗体に cyanine-3 を結合させた複合体と incubation を行った。結果の解析には、GMS417 を用いた。

#### B-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究

デキサメサゾン 14 日間投与を Wistar 雄性ラットに行いストレスモデルとし、行動解析は 5-HT<sub>2A</sub> 受容体刺激行動 (DOI による首振り運動; WDS) を計測した。受容体の性状については、5-HT 受容体 (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>) 及び  $\alpha_1$  アドレナリン受容体( $\alpha_1$ -AR) を受容体結合実験にて行った。細胞内情報伝達物質は PLC, Gq, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>R) 受容体を対象に、western blot 法で評価を行った。

#### B-3. ストレスによる神経機能形態研究

GFP-actin 発現アデノウィルスの作成は、COS-TPC 法を用いて GFP-actin を CMV プロモータの下流に結合させたものと、NSE(neuron-specific enolase)の下流に結合させたものの二つを作成した。この二つのリコンビナントアデノウィルスを HEK293 細胞内で作成し、ウィルスカ価が高い細胞上清が得られた。同上清を用いたところ、マウス初代培養神経細胞への感染・GFP-actin の発現が認められた。GFP-actin 発現アデノウィルスを用いた過剰神経興奮状態における樹状突起アクチン動態の解析に関しては、マウス海馬初代培養法を用いたシナプス形成期以降の神経アクチン細胞骨格の動態を観察した。real-time imaging は Bio-Rad MRC1024 レーザー共焦点顕微鏡システムに、カスタムのステージアダプター・カスタムチェンバーを用い、室温条件下で生きた海馬細胞の種々の細胞外刺激によるタイムラプス GFP 蛍光計測を行った。神経細胞特異的 GFP-actin 発現マウスの作成に関しては、Columbia 大学 Eric R. Kandel 教授より forebrain-selective な発現を可能にする CaMKII promotor を供与を受け、同プロモータ下流に GFP-actin を結合した複合体を作成した。

#### B-4. MEG を用いたストレスによる脳機能変動の研究

脳磁場の測定は、頭部全体をカバーするニューロマグ社製 204channel 脳磁計を用いて行った。なお本年度は、健康正常人を対象とした研究である。

急性ストレスの gating out に及ぼす影響に関しては、反復聴覚刺激に対する反応を正常環境下及び身体的ストレス下で計測する方法で施行した。聴覚刺激は

クリック音 (70dBHL) の対 (condition 刺激、test 刺激) 刺激で行い、P50 の等価電流源(ECD)を左右半球別々に同定後、ECD の位置・潜時・強度を求めた。P50 habituation の程度は、condition 刺激の ECD の強度と test 刺激の ECD の強度の比 (Mt / Mc) で評価した。身体的ストレスはセ氏 0~2 度の氷水に 30 秒間左手を浸す cold-pressor test を、情動的ストレスは International Affective Picture System(IAPS) (Lang et al. 1988)を用いた。陽性の情動を惹起する刺激を陽性情動刺激条件、陰性の情動を惹起する刺激を陰性情動刺激条件として用いた。身体的ストレス負荷条件ではストレス負荷の前後に、情動的ストレス負荷条件ではストレスを負荷しながら、聴覚刺激に伴う P50 の測定を行った。

ストレス予期反応と gating out の関連性に関しては、予期的反応時間課題である二つ 1 組の刺激(予告刺激 S1 とターゲット刺激 S2)を一定の刺激間隔(2sec)でモニターに呈示し、S2 後のボタン押し反応時間の計測を行った。刺激は、IAPS から異なる情動価 (pleasant/unpleasant/neutral ; 各 30 枚)を持つスライドを選定後、S1-S2 の組み合わせを固定して被験者には S1 から S2 の情動価が予測出来る条件で行った。ボタン押し反応時間は、情動価 (pleasant/unpleasant/neutral) 毎に算出した。脳磁場データは情動価毎に S1 呈示前 500msec から S2 呈示後 1000msec を off-line で加算平均した。算出した波形から 204channel の等磁場線図を作成し、磁場の湧き出しと吸い込みのピークを同定し、ピーク時点において電流双極子モデルを適用し、脳内信号源 (位置および強度) の推定を行った。

#### B-5. MEG による脳機能研究とその画像診断

頭皮上脳波記録は、国際 10-20 システムに従った 20 個の電極に、眼球運動・瞬目の監視のための 2 電極と両耳朶の基準電極を加えて行った。脳磁場の測定は、頭部全体をカバーするニューロマグ社製 122channel 脳磁計を用いて行った。事象関連磁気共鳴分光法は、1.5 Tesla Proton-MRI (TR 1500 ms, TE 135 ms) で、STEAM 法で行った。なお本年度は、健康正常人 10 名を対象とした研究である。

ストレス負荷時のヒト大脳の基礎律動の変化に関しては、ストレス負荷として長時間開眼持続・瞬目抑制課題 (20 分間) を用い 1) 頭皮上脳波記録から得られた

自発脳波の周波数解析と基礎律動変化の解析・2) 脳磁図から得られた脳磁場の周波数解析を行い、安静時とのそれぞれのパラメーターに関して比較した。ストレス刺激内容の差異によるヒト海馬の活動の変化に関しては、快・不快写真による視覚刺激負荷時の、脳磁場計測及び事象関連磁気共鳴分光法による脳活動の変化を計測した。快・不快写真による視覚刺激は、IAPS から、それぞれの情動反応に適した写真を選択した。無秩序に 100 回刺激呈示を行い被験者には標的写真の呈示回数を数えるよう指示し、標的・非標的の刺激に伴った脳磁場波形を記録後、多電流源モデルを用いて活動源が海馬に推定される波形を抽出して周波数解析を行った。磁気共鳴分光法による実験では、脳磁場計測と同様の視覚による快・不快刺激を用いて、左右の海馬体及び海馬傍回の磁気共鳴スペクトルを記録した。得られた磁気共鳴スペクトルに対して残存する水成分の制御を行った後、Choline-compound (Cho、分光周波数 3.20 ppm)、Creatine-compound (Cr、3.00 ppm)、N-acetylaspartate (NAA、2.01 ppm)の分光周波数を含む周波数帯域で基線補正を行い、さらに高速フーリエ変換ならびに Gaussian 変換した各スペクトルを積分した。その後安静時の各物質の値で課題負荷時の値を補正し、Cho/NAA、Cr/NAA の相対値を統計処理した。

#### (倫理面への配慮)

本研究で行われたすべての動物実験及び臨床研究は、各研究者の所属機関の倫理委員会による審査を経て、研究の実施に関する許可を得たものである。

### C. 研究結果

#### C-1. ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明 ストレスおよび抗うつ薬投与による脳内 PP2A 活性への影響

急性拘束ストレス 45 分間負荷にて大脳皮質前頭部・海馬で、有意な PP2A 活性の亢進がみられた。イミプラミン急性実験では、投与後 1h で大脳皮質前頭部・海馬部で有意な PP2A 活性の亢進がみられた。イミプラミン慢性投与によって、最終投与後 1h で海馬に有意な PP2A 活性亢進がみられた。パロキセチン急性実験では、投与後 1h で大脳皮質前頭部・海馬に有意な PP2A 活性亢進がみられた。パロキセチン慢性投与によって、最終投与後 1h の時点で海馬に有意な PP2A の活性の亢進がみられた。

#### ストレスの及ぼす CaMKII 活性への影響

大脳皮質前頭部での CaMKII 活性は、急性拘束ストレス 45 min 負荷で亢進傾向をみた。海馬での CaMKII 活性は、急性拘束ストレス 45, 90 min 負荷で有意な亢進をみた。

#### マクロアレイ・マイクロアレイ法を用いたストレス脆弱性関連遺伝子の探索

マクロアレイ法を用いたストレス脆弱ラット海馬で対照群 (ストレス耐性群) と比較して、著しく発現の変化している遺伝子を探索した。新生児期分離ストレスパラダイムからみたストレス脆弱群の海馬では、C-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) 及び 94-kDa glucose-regulation protein の発現が顕著に亢進していた。慢性過密飼育ストレスパラダイムからみたストレス脆弱群の海馬では、heat shock 90-kDa protein A, vimentin の発現が顕著に低下し、cellular glutathione peroxidase 1 の発現が顕著に亢進していた。

マイクロアレイ法を用いたストレス脆弱ラット海馬での検討では、プレリミナリーな状況であるが以下のような結果を得ている。新生児期分離ストレスパラダイムからみたストレス脆弱群の海馬では、3 個の遺伝子の発現が亢進し 14 個の遺伝子の発現が低下していた。慢性過密飼育ストレスパラダイムからみたストレス脆弱群の海馬では、14 個の遺伝子の発現が亢進し 5 個の遺伝子の発現が低下していた。

#### C-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究

慢性ストレス状態の薬物学的モデルであるデキサメサゾン(Dex)慢性投与によって、大脳皮質の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の増大と DOI 急性投与による WDS の亢進がみられた。その他の受容体発現には、変動はみられなかった。このため 5-HT<sub>2A</sub> 受容体と共役している細胞内情報伝達物質である PLC, Gq, IP<sub>3</sub>R の発現量を western blot 法で検討したが、有意な変化はなかった。

#### C-3. ストレスによる神経機能形態研究

GFP-actin 発現アデノウィルスの作成  
Adex-NSE-GFP-actin と Adex-CMV-GFP-actin とをともに初代培養神経細胞に感染させ神経細胞での GFP-actin 発現に成功したが、前者は一細胞当たりの発現が低いため GFP-actin 蛍光測定が不可能であった。これに対して、Adex-CMV-GFP-actin は、神経細胞のみならずグリア細胞にも非常に高い発現

量を認めた。ウィルスのタイターを下げた状態で神経培養を感染させると、視野の中で互いに離れた細胞に散発的に GFP-actin を発現させることが可能となるので、以降同条件を用いて以下の実験を行った。

GFP-actin 発現アデノウィルスを用いた過剰神経興奮状態における樹状突起アクチン動態の解析

上記ウィルスを用い、神経活動依存的に制御される神経細胞骨格動態の可視化を、海馬錐体細胞の初代培養系にて試みた。内在性神経活動負荷時において、シナプス形成後の海馬神経細胞では、樹状突起上の GFP-actin の点状構造は部位によって異なった動きを示した。過剰な NMDA 受容体刺激を介した Ca<sup>2+</sup>流入によって、一部の樹状突起スパイン内アクチン集積が増強され、形態変化も伴う可能性が示唆された。

神経細胞特異的 GFP-actin 発現マウスの作成

トランスジェニックマウス作成のためのベクターコンストラクトをすべて構築し、現在受精細胞へのインジェクションを準備中である。

C-4. MEG を用いたストレスによる脳機能変動の研究

急性ストレスの gating out に及ぼす影響

身体的ストレス負荷による P50 habituation の計測から、ストレス負荷前には  $0.57 \pm 0.12$  であったものが、ストレス負荷後には  $0.92 \pm 0.29$  となった（被験者：5名）。情動的ストレス負荷条件での P50 habituation は、対照条件で 0.30・陽性情動刺激条件で 0.26・陰性情動刺激条件で 0.58 であった（被験者：1名）。P50 の潜時はいずれの条件（ストレス負荷の有無、condition 刺激、test 刺激など）でも変化がなかった。ECD の位置はシルビウス裂付近の側頭葉上面に推定された。

ストレス予期反応と gating out の関連性

ボタン押し反応時間は不快刺激に対して最も早く、ついで快刺激そして中性刺激の順であった。いずれの情動刺激においても予期的反応が、刺激呈示前約 300msec 付近で、前頭前野に信号源が認められた。信号源の強度は、不快刺激で大きかった。一方で情動刺激に対する視覚誘発反応は、不快刺激で小さかった。予期的反応の強度と視覚誘発反応の強度の間に、負の相関の可能性が認められた。

C-5. MEG による脳機能研究とその画像診断

ストレス負荷時のヒト大脳の基礎律動の変化

頭皮上脳波、脳磁場計測の両者で、記録開始時(閉眼状態)後頭部で 10 Hz 前後の  $\alpha$  波が、また両側頭部で 10 Hz 前後の  $\mu$  リズムが認められた。活動周波数帯域の変動は、認められなかった。次に開眼状態では両計測共にその活動が抑制され、持続する開眼状態ではそれぞれの周波数帯域の抑制傾向は持続した。開眼・標的固視では  $\alpha$  波は検査開始当初に比べて再度の閉眼によっても抑制状態が持続していたのに対して、開眼・風景画像鑑賞時では再度の閉眼にもかかわらず検査開始時に比べて活動比が高まっていた。一方  $\mu$  リズムに関しては、再度の閉眼時の活動比は、検査開始時程度にまで回復していた。

ストレス刺激内容の差異によるヒト海馬の活動の変化

脳磁場計測では、快・不快写真呈示の標的刺激の結果、いずれの刺激呈示であっても両側の海馬に活動源が認められた。活動源の大きさは、刺激呈示 20% の確率で不快刺激を標的とした時が最大であった。TSE による解析では、 $\alpha$  帯域 (8-12 Hz) において、標的刺激として不快刺激が 20% の割合で呈示された場合、最も非同期しており、そのピークは刺激呈示後 400-450 ミリ秒であった。このことは、動物の写真、乳幼児の写真にかかわらず認められた。また左右の海馬での差は、左側海馬においてこの傾向が顕著であった。

事象関連磁気共鳴分光法による研究では、安静時の海馬におけるスペクトルからの相対値 Cho/NAA、Cr/NAA が、大脳皮質のそれらと大きく異なることが判明した。安静時の相対値を基準にして快・不快写真刺激時のそれぞれの相対値を補正した Cr/NAA 値は、不快刺激を標的にした時に、両側海馬で増大し特に左側海馬で有意に増大していた。一方 Cho/NAA 値は、快・不快刺激のいずれに対しても安静時のそれより低下しており、特に左側海馬での低下が著明であった。

D. 考察

ストレス適応破綻の脳内分子メカニズムの解明の一つとして、ストレスのよって引き起こされる細胞内・核内情報伝達系の変動を、拘束ストレスと薬物的ストレスモデルであるデキサメサゾン慢性投与から本年度は検討した。その結果、急

性拘束ストレスでは細胞内のカルシウム濃度亢進やカルモジュリンの活性化によって機能が調節されている。PP2A, CaMKII の活性の亢進が明らかとなった。これまでの本研究者らの急性拘束ストレスによる PP2B (calcineurin) 活性や CREB のリン酸化の変化などの結果を含めて考察すると、急性ストレス負荷の初期には細胞内のカルシウム/カルモジュリン依存性のキナーゼ・フォスファターゼの活性は双方亢進しているが、キナーゼ系が有意となって CREB を介した遺伝子発現が亢進することを示している。その一方で、急性拘束ストレス終了後には CREB を介した遺伝子発現が低下することが明らかになっており、結果的にはフォスファターゼ系が有意となることが示唆される。抗うつ薬の慢性・急性投与によっても海馬では有意な PP2A 活性の亢進が得られており、これまでの本研究者らの PP2B 活性の研究と総合すると、抗うつ薬の作用はフォスファターゼ系を亢進させることになる。従って本年度の研究で得られたストレス負荷直後にキナーゼ系の亢進が起こり、ストレス終了後にフォスファターゼ系の亢進が起こる現象は、ストレスに対する適応メカニズムではないかと考えられる。このため次年度以降には慢性多様性ストレスモデルなどを用いた実験系で、ストレス破綻状態のキナーゼ系・フォスファターゼ系の変化を明らかにしたいと考える。薬物学的ストレスモデルでも同様に 5-HT<sub>2</sub> 受容体-IP3-カルシウム情報伝達系の亢進が結果として得られており、細胞内情報系からみたストレス適応破綻にはカルシウム依存性酵素の活性のインバランスを含めた、同情報系の障害があると予想される。

ストレスによる神経機能形態研究に関しては、本年度は GFP-actin 分子の発現を海馬神経細胞にもつトランスジェニックマウス作成の基礎的検討として、海馬初代培養細胞での発現実験を行った。その結果、カルシウム流入の過剰負荷の経路が異なると、アクチン動態に対して全く異なる作用を及ぼすことが明らかになった。これらの実験データは、ストレス等にみられる過剰神経活動などに伴って発生するカルシウム流入源の組み合わせによって、細胞骨格再構築の分布が制御されている可能性を示唆している。次年度以降はこの可能性を検証していくとともに、この知見の実際の病態における意義をトランスジェニックマウスを用いたストレスモデル実験によって確認していく予定である。

ストレスの脳機能に与える影響の研究に関しては、まず頭皮上脳波・脳磁場の解析からストレス負荷によって基礎律動の後頭部波の抑制がみられ、ストレス負荷終了後も抑制が残存していた。一方中心溝附近でのリズムは、ストレス負荷時のみ抑制されていた。このような波と波のストレス負荷による反応の違いは、視床皮質投射路を介した視床から頭頂後頭部皮質への神経情報はストレス因性刺激に影響されるのに対して、中心溝附近での刺激は視覚感覚運動皮質野の活動に影響しないことを示唆している。従って視覚刺激によるストレスはストレス終了後も視覚領野の活動性が持続するために波を抑制するのに対して、中心溝附近での刺激は視覚領野を介さないためにストレス終了後にはリズムの抑制が解除されると考えられる。このように大脳皮質で基礎律動の抑制がストレス中及び終了後にもみられたことは、強度または急性ストレス負荷時の脳機能破綻のメカニズムに関連していると考えられる。

海馬のストレス刺激に対する反応を脳磁場計測で解析した結果から、左側海馬を中心に視覚による不快刺激呈示後に帯域の脱同期の最大値が得られた。この結果は、ストレス負荷の代用である不快刺激の弁別に対して、海馬神経律動が抑制されたことを意味している。右利きの被験者で左海馬が刺激されたことは、不快情報の情緒・感情に関連する弁別に、優位半球の海馬が関与することを示唆している。同じく海馬のストレス刺激に対する反応を磁気共鳴分光法で解析した結果から、不快刺激の弁別に海馬神経細胞エネルギー代謝の亢進を伴うことが明らかとなった。この結果は、ストレス負荷の代用である不快刺激の弁別に対して、海馬神経細胞内のミトコンドリアを中心としたエネルギー代謝が亢進することを示唆していると考えられる。

#### E. 結論

本年度はストレス適応破綻の脳内メカニズムの解明を目的に、急性ストレスを主に用いてストレス負荷に伴う脳機能の変化を、細胞内情報伝達機能・遺伝子発現機能・神経細胞の機能形態・脳磁場及びエネルギー代謝機能の各観点から検討した。1) 急性ストレス負荷によって細胞内カルシウム依存性の情報伝達系は機能亢進し、ストレス初期にはキナーゼ系の、終了後にはフォスファターゼ系の機能亢進が有意となる。2) ストレス脆弱ラット海馬では、細胞内情報伝達系の機能に密接に関与している、JNK-2

遺伝子の顕著な発現亢進と HSP-90 の顕著な発現低下がみられた。3) 海馬神経細胞の初代培養に GFP-actin 分子を発現させ、細胞内カルシウム濃度亢進に伴って actin が細胞内を移動することが明らかとなった。4) 急性ストレス負荷及び負荷後に基礎律動である後頭部波の抑制が起こり、ストレスが脳の基本的活動を抑制することが明らかとなった。5) 急性ストレス負荷によって海馬の神経細胞律動の抑制やエネルギー代謝の顕著な亢進が得られ、この結果はストレスによって海馬機能は変動することを意味している。

以上の結果は急性ストレスに伴う脳内の反応であり、ここで得られた機構の慢性ストレス負荷やストレス性精神障害症例での変化を検討することが、ストレス適応破綻の脳内メカニズム解明につながると思われる。

F. 健康危険情報  
該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Bito H, Kavalali ET, Zhuo M, Deisseroth K, Tsien RW. : Synaptic modulation of dendritic  $Ca^{2+}$ -influx and gene expression. in "Slow Synaptic Responses and Modulation" (K. Kuba, H. Higashida, D.A. Brown, T.Yoshioka eds., Springer Verlag, Tokyo), pp. 182-188, 2000.
2. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. : Activity-dependent regulation of communication from synapse to nucleus. in "Challenges for Neuroscience in the 21st Century" (O. Hayaishi ed., Japan Scientific Societies Press, Tokyo), pp. 107-120, 2000.
3. Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. : Critical dependence of CREB phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs rather than action potentials. *J. Neurosci.* 20: 266-273, 2000.
4. Madaule P, Furuyashiki T, Eda M, Bito H, Ishizaki T, Narumiya S. : Citron, a Rho target that affects contractility during cytokinesis. *Microsc. Res. Tech.* 49: 123-126, 2000.
5. Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S. : A critical role for a Rho-associated kinase p160ROCK in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* 26: 431-441, 2000.
6. Morinobu S, Russel DS, Sugawara S, Takahashi M, Fujimaki K. : Regulation of phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein by paroxetine treatments. *Clin. Neuropharmacol.* 23: 106-109, 2000.
7. Fujinaki K, Morinobu S, Duman RS. : Administration of a cAMP phosphodiesterase 4 inhibitor enhances antidepressant-induction of BDNF mRNA in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacol.* 22: 42-51, 2000.
8. Jitsuiki H, Kagaya A, Goto S, Horiguchi J, Yamawaki S. : The effect of lithium carbonate on the enhancement of serotonin-2A receptor elicited by dexamethasone. *Neuropsychobiology* 41:55-61, 2000.
9. Kozuru T, Kagaya A, Takebayashi M, Horiguchi j, Yamawaki S. : Chronic electroconvulsive shock decreases ( $\pm$ )1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride (DOI) -induced wet-dog shake behaviors of dexamethasone-treated rats. *Life Sciences* 66:1271-1279,2000.
10. See V, Boutillier AL, Bito H, Loeffler JP. : Calcium-calmodulin dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *FASEB J.* 15: 134-144,2001.
11. Yamamoto M, Hilgemann DH, Feng S, Bito H, Ishihara H, Shibasaki Y, Yin HL : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *J. Cell Biol.* (in press).

12. Nishitani N, Maeno M, Maruyama K, Okamoto J : Magnetoencephalographic and biochemical aspects of event-related cognitive activities in hippocampus. *NeuroImage* (in press).
  13. Takahashi J, Tanaka K, Morinobu S, Fujimaki K, Li S-T, Kato K, Ohkawa M, Yamawaki S, Katon N. : The influence of restraint stress on the expression and the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin in the rat brain. *Synapse* (in press).
  14. Katagiri H, Kagaya A, Nakae A, Morinobu S, Yamawaki A. : Modulation of serotonin-2A receptor function in rats after repeated with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipine. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* (in press).
2. 学会発表
  1. Bito H, Furuyashiki T, Ishizaki T, Narumiya S. : A role for Rho and p160ROCK in the initiation of axon outgrowth and the control of growth cone dynamics in central neurons. *Neurosci. Res. Suppl.* 24, S35, O-104, 2000. 第23回神経科学学会大会(9.4-6, 2000)
  2. Furuyashiki T, Bito H; Narumiya S. : Multiplicity in activity-dependent actin regulation in hippocampal neurons. 第23回神経科学学会大会 2000.9.4-6. (*Neurosci. Res. Suppl.* 24, S42, O-164, 2000)
  3. Matsuoka Y, Bito H, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Nakao K, Narumiya S. : The role of prostaglandin receptors in mediating stress response in the central nervous system. 第23回神経科学学会大会 200.9.4-6. (*Neurosci. Res. Suppl.* 24, S26, O-048, 2000)
  4. 尾藤晴彦 : 神経初代培養細胞を用いた神経シグナリングの解析. 第23回日本神経科学学会大会プログラム・抄録集, p.286, L10-2, 1999. 第23回日本神経科学学会大会 200.9.4-6.
  5. 尾藤晴彦, 古屋敷智之, 成宮周 : カルシウムシグナリングの神経活動依存的転写調節とアクチン動態制御における役割. *生化学*72, 614, S18-2, 2000. 第73回日本生化学会 2000.10.11-14.
  6. 古屋敷智之, 尾藤晴彦, 成宮周 : 海馬神経細胞における神経活動依存的なアクチン細胞骨格制御. 第73回日本生化学会 2000.10.11-14. (*生化学*72, 1018, 3P-229, 2000).
  7. Bito H, Furuyashiki T, Ohashi K, Mizuno K, Ishizaki T, Narumiya S. : A role for Rho and p160ROCK in the initiation of axon outgrowth and the control of growth cone dynamics in cultured cerebellar granule neurons. 第30回北米神経科学学会年会 2000.10.11-14. (*Soc. Neurosci. Abstr.*, 26, 833, 314. 4, 2000).
  8. Furuyashiki T, Narumiya S, Bito H. : Patterned synaptic activity induces actin reorganization in synaptically connected hippocampal neurons. 第30回北米神経科学学会年会 2000.11.4-9. (*Soc. Neurosci. Abstr.*, 26, 562, 213.3, 2000).
  9. Loeffler JP, Sée V, Boutillier AL, Bito H. Cleavage of calcium-calmodulin dependent protein kinase type IV (CaMKIV) during apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. 全欧神経科学学会大会シンポジウム 2000. (*Eur. J. Neurosci.* 12:7-7, Suppl. S 2000).
  10. Nishitani N, Maeno M, Maruyama K, Okamoto J: Magnetoencephalographic and biochemical aspects of event-related cognitive activities in hippocampus. 7<sup>th</sup> Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping. 2001.6.10-14.
  11. 西谷 信之, 飯嶋 睦, 岡本 泰昌, 山脇 成人 : 脳リズムとストレス 第30回日本臨床神経生理学会学術大会 2000.12.13-15.
  12. 田中和秀, 高橋 淳, 藤巻康一郎, 菅原幸子, 森信 繁, 加藤進昌 cPTSD モデルラットのCREB情報伝達系からみたストレス応答性について. 第22回日本生物学的精神医学会 2000.3-4.
  13. 藤巻康一郎, 高橋 淳, 田中和秀, 李 勝天, 加藤邦夫, 森信 繁 : ラ

- ット脳内 calcineurin 活性に及ぼすストレスの影響. 第22回日本生物学的精神医学会 2000.3-4.
14. 森信 繁: ストレス性精神障害の発症機序に関わる CREB リン酸化-脱リン酸化インバランス. 第28回薬物活性シンポジウム 2000.11. (日本薬理学雑誌, 116 (Suppl 1): 107-110, 2000) .
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
該当事項なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

ストレスによる遺伝子発現機構研究

分担研究者 森信 繁 広島大学医学部助教授

研究要旨 ストレス適応破綻のメカニズムには、ストレスによる脳内遺伝子発現の変動が深く関与していると予想され、その結果ストレス関連性精神障害が発症してくると思われる。本分担研究者はこの仮説に従って本年度は、以下のようなストレスによる情報伝達系や遺伝子発現変化を明らかにした。1) ストレス負荷によってprotein phosphatase 2A活性が亢進し、CREB活性化を促進するCaM K IV活性に対して抑制的に作用する。2) ストレス負荷によってCaMKIIの活性が亢進し、CREB活性化を促進する。3) ストレス脆弱・耐性ラット間でストレスに应答した遺伝子発現の差をマクロアレイ・マイクロアレイ法で比較し、脆弱群で特異的に発現の亢進する遺伝子を検出した。

A. 研究目的

ストレスに関する臨床精神医学的研究から、適応困難なストレスに暴露されることによって、外傷後ストレス障害・大うつ病といった精神障害が引き起こされることが報告されている。このような精神障害は換言すればストレスによる脳内情報処理過程の適応破綻状態ともみなされ、ストレス適応破綻の脳内メカニズムを解明することは、上記精神障害の発症機序や治癒過程の解明に貢献すると予想される。

大うつ病や外傷後ストレス障害などの発症過程には慢性のストレス状態がしばしば前駆し、病状の回復には抗うつ薬を主とした慢性の薬物治療が必要となってきた。ストレス因の除去が困難で容易に再発を繰り返したような難治性の症例では、海馬の容積の減少が報告されている。同時に動物を用いたストレス研究から、適応困難なストレスに長期暴露された際には脳内で複数の遺伝子の発現が変動し、海馬の神経細胞の障害が引き起こされることも明らかとされている。上記のような臨床的・基礎的研究結果の蓄積は、脳内のストレス適応破綻のメカニズムに、慢性のストレスによる遺伝子発現の変化が密接に関連していることを示唆している。従って本分担研究者は、ストレス適応破綻の脳内メカニズムの解明には、ストレスによる遺伝子発現変動の機序を明らかにする必要があると考えた。

ストレスなどの外界からの刺激に伴う脳内の遺伝子発現変動には、細胞内から核内に情報を運び遺伝子の転写を調節する機能をもつ転写因子の活性が、key

element であることが明らかとされている。中でも特に cAMP response element binding protein (CREB)は、プロテインキナーゼ A・カルシウム・神経栄養因子受容体など多くの細胞内情報伝達系の変化を受けて活性が調節されており、この意味で中枢神経系では主要な転写因子と考えられている。これまで本研究では、CREB の不活化（リン酸化 CREB の脱リン酸化）に関与する、カルシニューリンの発現や機能に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響を検討してきた。このため本年度は一層ストレスや抗うつ薬の CREB 活性化-不活化への影響を明らかにする目的で、protein phosphatase (PP) 2A, calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II の活性に及ぼす、ストレス・抗うつ薬の影響を検討した。

ストレス適応破綻という現象を生体の側からとらえると、この現象はストレスに対する脆弱性という特性と関連があると推察される。従って同一ストレス条件下でストレスに脆弱な個体の脳に特異的に発現の異なる遺伝子を探索することは、ストレス適応破綻の分子メカニズムを解明する上で重要なストラテジーと考えられる。このような観点から本年度はストレス脆弱ラット海馬で特異的に発現の異なる遺伝子を、マクロアレイ・マクロアレイ法を用いてスクリーニングする実験を行った。

B. 研究方法

B-1. PP2A 活性の測定

実験にはすべて、雄性 Sprague-

Dawley ラットを用いた。今回用いたストレス方法は、急性拘束ストレスである。抗うつ薬投与は単回投与及び 14 日間投与を行い、用いた抗うつ薬は三環系のイミプラミンと選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) パロキセチンである。

PP2A の活性としては、セリン/スレオニンフォスファターゼ活性を評価した。具体的には PP の基質として特異的な Promega 社製の phosphopeptide を用いて、PP2A 活性に適した反応条件下で phosphopeptide の分解による、free phosphate の量を spectrophotometer で計測した。脳組織の蛋白量は、Bio-Rad Protein Assay 法で測定した。

#### B-2. CaMKII 活性の測定

実験にはすべて、雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。今回用いたストレス方法は、急性拘束ストレスである。

CaMKII 活性測定には、脳組織から遠心法にて抽出した細胞質分画を、サンプルとして用いた。測定法はカルシウム・カルモジュリン存在下及び非存在下での、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  の取り込みをシンチレーションカウンターで計測することで行った。なお CaMKII に取り込まれなかった  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  の wash には、CaMKII を特異的な biotinylated peptide substrate (BPS) と反応させこれによって出来た  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -CaMKII-BPS 複合体と biotin capture membrane を結合させることによって、余剰の  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を除去する方法を用いた。脳組織の蛋白量は、Bio-Rad Protein Assay 法で測定した。

#### B-3. マクロアレイ・マイクロアレイ法によるストレス脆弱性関連遺伝子の検索

すべての実験に、雄の Sprague-Dawley rat を使用した。マクロアレイ・マイクロアレイ法による遺伝子発現の差を検討するためのストレス脆弱ラット作成には、新生児期分離ストレス及び慢性過密飼育ストレスの二つのパラダイムを用いた。

##### 新生児期分離ストレスパラダイム

<ストレス脆弱モデル>：誕生後 2 日目から 8 日目まで毎日 1 時間 (午前中) 母子分離を行った。成長後 (BW: 300g) に急性の拘束ストレス (2 時間) を施行し、直ちに断頭にて海馬を摘出した。<ストレス抵抗モデル>：誕生後は通常的环境下で飼育した。成長後 (BW: 300g) に急性の拘束ストレス (2 時間) を施行し、直ちに断頭にて海馬を摘出した。

##### 慢性過密飼育パラダイム

<ストレス脆弱性モデル>：過密飼育ストレスを 21 日間行った。通常的环境下で飼育したラットと比較し、有意に体重

増加が少なかったものを用いて、急性の拘束ストレス (2 時間) をかけた直後に断頭し直ちに海馬を摘出した。<ストレス抵抗性モデル>：過密飼育ストレスを 21 日間行った。通常的环境下で飼育したラットと比較し、体重増加に有意な差のみられなかったラットを用い、急性の拘束ストレス (2 時間) をかけた直後に断頭し直ちに海馬を摘出した。

##### マクロアレイ法

用いたマクロアレイは、200 個の cDNA を含む Clontech Rat Stress Array である。

ストレス耐性群・脆弱群は、それぞれ 5 匹のラット海馬から抽出した mRNA を混合して用いている。抽出した mRNA を DNaseI 処理後に、 $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  存在下で逆転写酵素を用いて single strand cDNA に逆転写した。これを probe としてメンブレンとハイブリダイゼーションさせ、非特異的結合を wash 後に各 cDNA spot に結合している probe の放射活性を、Fuji Film BAS2000 にて計測した。耐性群と脆弱群での放射活性の比が、3 倍以上のものを発現に有意な違いのある遺伝子と考えた。

##### マイクロアレイ法

用いたマイクロアレイは、1152 個の遺伝子に特異的な oligonucleotide を含む Margen 社の Rat Express Microarray である。

ストレス耐性群・脆弱群は、それぞれ 5 匹のラット海馬から抽出した mRNA を混合して用いている。逆転写酵素を用いて single strand cDNA に逆転写後、double strand cDNA を作成し、これを鋳型に T7 polymerase 反応を用いて biotin-rCTP を取り込ませた cRNA を作成した。この cRNA probe を glass microarray と hybridization 後、biotin に対する二次抗体に cyanine-3 を結合させた複合体と incubation を行った。結果の解析には、GMS417 を用いた。

##### (倫理面への配慮)

本研究に用いたストレスパラダイムについては、広島大学動物実験倫理委員会の許可を得ている。

## C. 研究結果

### C-1. ストレスおよび抗うつ薬投与による脳内 PP2A 活性への影響

急性拘束ストレスによるラット大脳皮質前頭部・海馬での PP2A 活性の変化について検討したところ、急性拘束 45, 90 min 負荷にて大脳皮質前頭部での有意な PP2A 活性の亢進がみられた。急性拘束 45 min 負荷にて海馬で有意な PP2A 活

性の亢進が、同 90 min 負荷で PP2A 活性の亢進傾向がみられた。

急性・慢性抗うつ薬投与による脳内 PP2A 活性への影響については、三環系抗うつ薬イミプラミンおよび SSRI パロキセチンを用いた。イミプラミン急性実験では、投与後 1h で大脳皮質前頭部・海馬部で有意な PP2A 活性の亢進がみられた。イミプラミン慢性投与実験では、最終投与後 1h の時点で海馬で有意な PP2A 活性亢進がみられた。パロキセチン急性実験では、投与後 1h, 2h で大脳皮質前頭部の、投与後 1h で海馬の有意な PP2A 活性亢進がみられた。パロキセチン慢性実験では、最終投与後 1h の時点で海馬で有意な PP2A の活性の亢進がみられた。

C-2. ストレスの及ぼす CaMKII 活性への影響

急性拘束ストレス 45, 90 min 負荷に伴う、大脳皮質前頭部・海馬での CaMKII のリン酸化能を検討した。その結果、海馬では 45, 90 min 拘束負荷で有意な活性の亢進をみた。大脳皮質前頭部では 45 min 拘束負荷で、活性の亢進傾向をみた。

C-3. マクロアレイ・マイクロアレイ法を用いたストレス脆弱性関連遺伝子の探索

マクロアレイ法を用いたストレス脆弱ラット海馬で対照群（ストレス耐性群）と比較して、著しく発現の変化している遺伝子を探索した。新生児期分離ストレスパラダイムからみたストレス脆弱群の海馬では、C-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) 及び 94-kDa glucose-regulation protein の発現が顕著に亢進していた。慢性過密飼育ストレスパラダイムからみたストレス脆弱群の海馬では、heat shock 90-kDa protein A, vimentin の発現が顕著に低下し、cellular glutathione peroxidase 1 の発現が顕著に亢進していた。ストレス脆弱群と耐性群との間で急性拘束ストレスによって発現の違いがみられる遺伝子は、僅かに 200 個分の 2-3 個であり全体の 1.5%程度に過ぎなかった。

マイクロアレイ法を用いたストレス脆弱ラット海馬での検討は、現在詳細な解析を行っている最中であるが、脆弱群と耐性群との間で 2 倍以上発現のことなる遺伝子という条件では以下のような結果を得ている。新生児期分離ストレスパラダイムからみたストレス脆弱群の海馬では、3 個の遺伝子の発現が亢進し 14 個の遺伝子の発現が低下していた。慢性過密飼育ストレスパラダイムからみたストレス脆弱群の海馬では、14 個の遺伝子

の発現が亢進し 5 個の遺伝子の発現が低下していた。ストレス脆弱群と耐性群との間で急性拘束ストレスによって発現の違いがみられる遺伝子は、1152 個中それぞれ 17, 19 個であり僅かに 1.6%程度に過ぎなかった。

D. 考察

本研究によって急性拘束ストレスに伴い、PP2A の活性と CaMKII の活性の亢進が引き起こされることが明らかとなった。本年度の研究結果に加え、これまで本研究者らが行ってきた PP2B 発現・活性や CREB のリン酸化への急性拘束ストレスの影響をみた研究結果をあわせて考察すると、以下のような脳内遺伝子発現への作用を急性拘束ストレスは有することになる。急性拘束ストレスによって CREB リン酸化は有意に亢進し、ストレス終了後には一過性の低下を経て再び basal レベルになっている。このような現象はストレス暴露直後は CREB リン酸化を促進する CaMKII の活性亢進が主要な役割を果たし、その後はリン酸化 CREB の脱リン酸化や CREB リン酸化の抑制に間接的に関与する、PP2B や PP2A の活性亢進が優位になることを示唆していると考えられる。今回の研究結果では海馬での CaMKII 活性のストレスによる有意な活性の亢進が得られておらず、全体的には CREB のリン酸化を抑制する PPs の活性亢進が目立っていた。このような結果は、今後の研究で CREB リン酸化に対してもう一つの重要な酵素である CaMKIV の、ストレスによる活性を検討する必要性を示していると考えられる。

抗うつ薬投与による結果は、慢性投与に比べて特に急性投与で顕著であるが PP2A 活性を亢進させていた。このような結果はこれまでの本研究者らの PP2B 活性への抗うつ薬投与による結果と合わせ考えると、抗うつ薬は CREB リン酸化を抑制する作用を有し、ストレスなどの刺激に伴う CREB を介した遺伝子発現の変化を抑制していると考えられる。

ストレス脆弱性の形成に関与する遺伝子の探索については、マクロアレイ法で幾つかの興味深い遺伝子の発見を行っている。新生児期分離ストレスから検出された JNK2 の脆弱個体での発現亢進は、ストレスによる c-Jun リン酸化の亢進を示唆しており、c-Jun によって発現の調節されている遺伝子の中にストレス脆弱性形成に密接に関連している遺伝子のあることが予想される。また慢性過密飼育ストレスから検出された HSP90A 遺伝

子の脆弱個体での発現低下は、ストレスによる glucocorticoid 受容体のステロイドホルモンによる核内移動性の増大や PP2B 活性の低下が、ストレス脆弱性に密接に関与している可能性を示唆している。

#### E. 結論

本年度分担研究にて得られた結果は、ストレスや抗うつ薬が転写因子 CREB の活性化-不活性化に関与していることを証明しており、ストレス適応破綻の分子メカニズムには CREB によって発現の調節されている遺伝子群が関与していることが明らかとなった。同時にストレス性精神障害の予防として、ストレスによる CREB 活性化を抑制する方法が期待されることを示唆している。ストレス脆弱性形成には、脳内で豊富な発現の報告されている転写因子 c-Jun を介した遺伝子発現系や、ステロイドホルモン情報伝達系および PP2B 活性の障害が関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表

##### G-1. 論文発表

1) Takahashi J, Tanaka K, Morinobu S, Fujimaki K, Li S-T, Kato K,

Ohkawa M, Yamawaki S, Katon N. The influence of restraint stress on the

expression and the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin in the rat brain. Synapse (in press).

2) Morinobu S, Russel DS, Sugawara S, Takahashi M, Fujimaki K.

Regulation of phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein by paroxetine treatments. Clin Neuropharmacol. 23: 106-109, 2000.

3) Fujinaki K, Morinobu S, Duman RS. Administration of a cAMP phosphodiesterase 4 inhibitor enhances antidepressant-induction of BDNF mRNA in rat hippocampus. Neuropsychopharmacol. 22: 42-51, 2000.

##### G-2. 学会発表

1) 森信 繁：ストレス性精神障害の発症機序に関わる CREB リン酸化-脱リン酸化インバランス. 第 28 回薬物活性シンポジウム. 2000 年 11 月. (日本薬理学雑誌, 116 (Suppl 1): 107-110,

2000)

2) 田中和秀、高橋 淳、藤巻康一郎、菅原幸子、森信 繁、加藤進昌：PTSD モデルラットの CREB 情報伝達系からみたストレス応答性について. 第 22 回日本生物学的精神医学会. 2000 年 3-4 月.

3) 藤巻康一郎、高橋 淳、田中和秀、李 勝天、加藤邦夫、森信 繁：ラット脳内 calcineurin 活性に及ぼすストレスの影響. 第 22 回日本生物学的精神医学会. 2000 年 3-4 月.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

該当事項なし。

厚生科学研究費補助金（平成12年度脳科学研究事業）  
分担研究報告書  
ストレスによる細胞内情報伝達機構研究

分担研究者 加賀谷有行 広島大学医学部講師

**研究要旨** H-P-A 機能亢進モデルとして、デキサメサゾン（dexamethasone）を反復処置することにより薬理的ストレスをラットに反復負荷し、そのラットにおける行動学的変化やセロトニン(5-HT)-2A 受容体機能およびそれに連関する細胞内情報伝達機能について検討した。その結果、薬理的ストレス反復負荷は 5-HT-2A 受容体機能を比較的特異的に変化させると考えられた。この機能変化を気分安定薬や ECS が改善した。

#### A. 研究目的

うつ病や慢性ストレス状況下では視床下部-下垂体-副腎皮質機能（H-P-A 機能）が亢進していると考えられている。本年度は、H-P-A 機能亢進モデルとして、デキサメサゾン（dexamethasone）を反復処置することにより薬理的ストレスをラットに反復負荷し、そのラットにおける行動学的変化やセロトニン(5-HT)-2A 受容体機能およびそれに連関する細胞内情報伝達機能について検討し、さらこれらに対するカルシウムチャンネル拮抗薬ニモジピンの影響について検討した。

#### B. 研究方法

ラットに薬理的ストレス負荷剤であるデキサメサゾン（dexamethasone : Dex）を2週間反復投与した。その後 5-HT-2A 受容体作動薬である DOI 誘発性首振り運動（wet dog shakes : WDS）を観察した。また、脳を取り出して、5-HT-1A 受容体、5-HT-2A 受容体、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体数を受容体結合実験により、phospholipase C、Gq、inositol-1,4,5-trisphosphate receptor 蛋白質量をウェスタン法により測定した。Dex 反復投与後のラット脳スライスを作成しカリウム刺激による細胞内カルシウム反応を測定した。続いて WDS に対する気分安定薬リチウム、カルシウム拮抗薬ニモジピン反復投与、重傷うつ病治療法通電療法（ECS）の効果を検討した。

#### C. 研究結果

Dex 反復投与により WDS が亢進した。5-HT-1A 受容体、5-HT-2A 受容体、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体のうち 5-HT-2A 受容体のみが亢進していた。しかし細胞内情報伝達系の構成蛋白である phospholipase C、Gq、inositol-1,4,5-trisphosphate receptor のいずれも変化なかった。ラット脳スライスにおける検討では、Dex 反復処置群では、カルシウム刺激性細胞内カルシウム増加反応が亢進していた。リチウム反復処置では Dex 反復処置による WDS 亢進が改善した。ニモジピン反復処置、ECS 反復処置でも Dex 反復処置による WDS 亢進が改善した。

#### D. 考察

薬理的ストレス負荷により 5-HT-1A 受容体、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体を変化させず、この影響は 5-HT-2A 受容体に比較的特異的であると考えられた。この機能変化を気分安定薬や ECS が改善したことは、気分障害の病態とその治療薬の作用機序を考慮する上で興味深い。

#### E. 結論

薬理的ストレス反復負荷により、ラットにおける 5-HT-2A 受容体機能が亢進し、この機能亢進が気分安定薬で改善することが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- H.Jitsulki et al. (2000) *Neuropsychobiol.* 41: 55-61.
- A.Kagaya et al. (2000) *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 24: 85-95.
- T.Kozuru et al. (2000) *Life Sci.* 66: 1271-1279.
- M.Takebayashi et al. (2000) *Neuropsychobiol.* 42: 120-126.
- A.Kagaya et al. (2000) *J. Neural Transm.* 107: 919-929.
- Y.Uchitomi et al. (2001) *Psychopharmacol.* 153: 244-248.
- A.Kagaya et al. (2001) *Neuropsychobiol.* 43: 59-62.
- S.Kouhata et al. (2000) *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* (in press)
- Y.Kannan et al. (2001) *Neuroimmunomodul.* 8: 132-141
- H.Katagiri et al. (2001) *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* (in press)
- I.Miyoshi et al. (2001) *J. Neural Transm.* (in press)

##### 2. 学会発表

- A.Kagaya et al. : International Symposium on Neural Signaling and Protein Phosphorylation-Dephosphorylation 2000.6.3-6.5 Fukuoka
- K.Kurata et al. : 22nd Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum 2000. 7. 9-13, Brussels.
- T.Fukumoto et al. : 22nd Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum 2000. 7. 9-13, Brussels.
- T.Tamura et al. : 22nd Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum 2000. 7. 9-13, Brussels.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究要旨 Sensory gating systemとは外界からの刺激に対して、生体の感受性を変化させる前注意的な神経機構で、環境への適応に重要な役割を果たしていると考えられている。今回の検討から、急性のストレスはgating systemの異常を引き起こすこと、さらにこのgating systemの異常はストレスの予期に関連している可能性が考えられた。

#### A. 研究目的

Sensory gating systemとは外界からの刺激に対して、生体の感受性を変化させる前注意的な神経機構である。生体にとってあまり重要でない刺激に対しては反応を小さくし (gating out)、重要な刺激に対しては反応を大きくする (gating in) ことで生体の環境への適応や、生存にとって役割を果たしていると考えられている。われわれは、このシステムの異常がストレス関連疾患の病態生理に関連しているとの仮説を立て、以下の検討を行った。一つめとして、聴覚性の事象関連電位P50でみられる同質の刺激が続くと減衰する現象に (P50 habituation) 着目し、健常人において各種の急性のストレスが P50 habituationにどのような影響を及ぼすかを検討した。次に、われわれは快・不快などの情緒的重さをもつ情動視覚刺激を用いた予期的反応時間課題を行い、視覚誘発反応で認められるSensory gating systemが、ストレスの予期に関連しているかを明らかにするための検討を行った。

#### B. 研究方法

脳磁場の測定は頭部全体をカバーするニューロマグ社製 204channel 脳磁計を用いておこなった。

##### 検討-1(急性ストレスの gating out に及ぼす影響)

500ms 間隔で呈示されるクリック音 (70dBHL) の対 (condition 刺激、test 刺激) を 7~8 秒間隔で呈示、刺激提示前 50ms から刺激提示後 450ms までを計測区間とし、各刺激に対する反応を 50 回測定したところで測定を終了した。加算平均波形に対して刺激提示後 40~80ms の間で同定される P50m の等価電流源(ECD)を左右半球別々に同定し、

ECD の位置、潜時、強度を求めた。P50 habituation の程度は、condition 刺激の ECD の強度と test 刺激の ECD の強度の比 (Mt / Mc) で評価した。

ストレスは身体的ストレスとしてセ氏 0~2 度の氷水に 30 秒間左手を浸す cold-pressor test、情動的ストレスとして International Affective Picture System (IAPS) (Lang et al. 1988) の 2 種類を用いた。身体的ストレス負荷条件ではストレス負荷の前後に、情動的ストレス負荷条件ではストレスを負荷しながら測定をおこなった。IAPS は Lang によって開発された視覚刺激 (スライド) で、スライド毎に惹起される情動 (陰性、陽性、強度など) が標準化されており、今回の研究ではその中から陽性の情動を惹起する刺激、陰性の情動を惹起する刺激を選択して陽性情動刺激条件、陰性情動刺激条件として用いた。

##### 検討-2(ストレス予期反応と gating out の関連性)

予期的反応時間課題は、二つ 1 組の刺激 (予告刺激 S1 とターゲット刺激 S2) を一定の刺激間隔 (2sec) でモニターに呈示し、S2 後にボタン押し反応をさせた。刺激は、予告刺激 (S1) として、○, △, □ の幾何学図形を各刺激 50msec 呈示した。ターゲット刺激 (S2) として、IAPS から異なる情動価 (pleasant/unpleasant/neutral ; 各 30 枚) を持つスライドを選定した (呈示時間 2sec)。○-pleasant、△-unpleasant、□-neutral のように S1-S2 の組み合わせを固定した。したがって被験者は S1 により S2 の情動価が予測可能であった。分析は、ボタン押し反応時間を情動価毎 (pleasant/unpleasant/neutral) に算出した。脳磁場データは情動価毎に S1 呈示前 500msec から S2 呈示後 1000msec を off-line で加算平均した。算出した波

形から 204channel の等磁場線図を作成し、磁場の湧き出しと吸い込みのピークを同定し、ピーク時点において電流双極子モデルを適用し、脳内信号源（位置および強度）の推定を行った。

#### 倫理面への配慮

被験者に対しては研究内容について十分な説明を行い文章にて同意を得た。本研究は広島大学医学部倫理委員会にて承認を受けている研究計画に基づいて実施した。

#### C. 研究結果

##### 検討-1(急性ストレスの gating out に及ぼす影響)

身体的ストレス負荷条件には 5 名の被験者が参加した。P50 habituation はストレス負荷前には  $0.57 \pm 0.12$  であったものが、ストレス負荷後には  $0.92 \pm 0.29$  となった。情動的ストレス負荷条件には 1 名の被験者が参加した。P50 habituation は対照条件では 0.30、陽性情動刺激条件では 0.26、陰性情動刺激条件では 0.58 であった。P50 の潜時はいずれの条件（ストレス負荷の有無、condition 刺激、test 刺激など）でも変化がなかった。ECD の位置はシルビウス裂付近の側頭葉上面に推定された。

##### 検討-2(ストレス予期反応と gating out の関連性)

ボタン押し反応時間は、unpleasant 刺激に対して最も早く、ついで pleasant 刺激、neutral 刺激の順であった。いずれの情動刺激においても予期的反応が、刺激呈示前約 300msec 付近で、前頭前野に信号源が認められた。信号源の強度は、pleasant 刺激と比較して、unpleasant 刺激で大きかった。一方で、情動刺激に対する視覚誘発反応は、pleasant 刺激と比較すると、unpleasant 刺激で小さかった。

また、予期的反応の強度と視覚誘発反応の強度の間に負の相関の可能性が認められた。

#### D. 考察

以上の結果から、健常人において急性のストレスは gating out の異常を引き起こすことが明らかになった。またこの gating out の異常は、ストレスの予期に関連している可能性が推定された。

#### E. 結論

これらの gating out の異常に関する所見は、ストレス関連疾患における病態生理との関連だけでなく、健常人においてもストレス負荷時には認知機能の低下

を引き起こしやすいことの生理学的な一面を説明している。またストレスの予測がストレスに対する適応を強化している可能性もあり、ストレスに対する対応を考えていく上で興味深いものと考えられた。

#### 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

特記すべき事項なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

ストレスの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究

分担研究者 西谷 信之 国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所

感覚機能系障害研究部感覚認知障害研究室長

**研究要旨** 初年度において、ストレス負荷に対する脳活動の変化を明らかにする事を目的として、頭皮上脳波、脳磁場および磁気共鳴分光法による非侵襲的手法を用いて行った。ストレス負荷時並びにその前後における大脳基礎律動の変化、および刺激内容の差異による海馬機能の変化を明らかにした。その結果、長時間のストレス負荷後では、ストレス暴露が解除された後も、大脳基礎律動（ $\alpha$ 波）の抑制が残存することが明らかになった。一方、海馬では不快刺激の認知課題において、海馬神経細胞のエネルギー代謝の亢進、ならびに海馬における基礎律動の抑制が認められた。以上の結果から、大脳皮質および海馬機能がストレス負荷により影響されることが示され、海馬から大脳皮質へのニューラルネットワークの関わりが示唆された。

**A. 研究目的**

複雑化する社会構造の中で益々社会問題化してきている、ストレスに起因する適応障害、うつ病、心身症などの多くの疾患の発症機序は明らかにされていない。そこで、初年度における本分担研究では、ストレス負荷に対して、どのような脳活動の変化が生じるかを、非侵襲的に明らかにすることを目的とした。

**B. 研究方法**

**1. ストレス負荷時におけるヒト大脳の基礎律動の変化**

**(1) 頭皮上脳波記録**

10名の健常成人（男性：5名、女性：5名、年齢：平均24.3歳、全員右利き）から、頭皮上脳波ならびに脳磁場記録を行った。

ストレス負荷として、頭皮上脳波、脳磁場記録のいずれに対しても、以下の課題を用いた。記録開始時より5分間安静閉眼状態を、引き続き20分間は瞬目を抑制し1.5メートルの眼前に記された標的を固視する開眼状態を、更に再び5分間閉眼状態を維持するように、被験者に指示した。

頭皮上自発脳波記録は、静穏な電氣的遮蔽室内にて実施し、被験者は安楽椅子に座位状態を保持した。国際10-20システムに従い、頭皮上 Fp1、Fp2、F7、F3、Fz、F4、F8、T3、C3、Cz、C4、T4、T5、P3、Pz、P4、T6、O1、Oz、O2 に20個の銀/塩化銀皿電極を置き、コロジオンにて電極頭皮間抵抗が5 k $\Omega$ 以下になるように接着した。眼球運動と瞬目を監視するために、右眼裂外側部と下部に2個の

銀/塩化銀皿電極を接着した。更にこれらの電極に対する基準電極を両耳朶に設置した。また通過低周波数帯域を120 Hz、標本周波数を500 Hz とし記録した。

## (2) 脳磁場計測

自発脳磁場計測は、122チャンネル全頭型一次微分平面型脳磁場計測装置を用いて、静穏な磁気遮蔽室内で実施した。被験者は計測装置直下で座位を保持し、頭部を計測機器に密着し固定した。頭部の機器に対する位置を、頭皮上に装着した頭部位置指示コイルからの信号を各記録開始時に計測し統一した。脳磁場計測時にも、眼球運動と瞬目を監視するために、右眼裂外側部と下部に2個の銀/塩化銀皿電極を接着した。通過周波数帯域を、脳磁場に対して0.03—100 Hz、眼球運動に対して0.01—100 Hz とし、標本周波数を403 Hz とした。頭皮上脳波ならびに脳磁場計測中、瞬目と被験者の意識レベルの監視のために、各チャンネルの波形をモニターし、瞬目過多や意識レベル低下時にはインターフォンにて被験者に注意を喚起した。得られた随意背景脳活動波形は、解析処理のためにデータをMO disk に保管した。

記録した頭皮上自発脳波および脳磁場の全チャンネルで、記録開始後1（閉眼）、6、11、21（開眼）、そして26（閉眼）分からそれぞれ1分間ずつを、1.7秒毎の高速フーリエ変換処理により、周波数解析を行った。次に求められた結果より、頭皮上脳波に対して、C3、C4、Oz、脳磁場に対してはC3、C4、Ozに相当する両側前中部ならびに後方部のチャンネ

ルを選択し、基礎律動の変化を計測した。統計処理には、記録開始1分後（閉眼時）からの1分間の周波数強度を基準にし、Repeated measured Two-way ANOVA にて相互を比較した。

## 2. 刺激内容の差異によるヒト海馬の活動の変化

### (1) 脳磁場計測

10名の健常成人（男性：5名、女性：5名、年齢：平均24.7歳、全員右利き）から、脳磁場ならびに事象関連磁気共鳴分光法による記録を行った。

刺激は、International Affective Picture System (IAPS, Lang et al., 1997)より選択した、動物ならびに乳幼児の快・不快写真（合計4写真）を使用した。

脳磁場計測では、動物同士もしくは乳幼児同士で、それぞれ快・不快写真を組にし、遮蔽室外に設置したプロジェクターを介して、磁気遮蔽室内の被験者の眼前1.5mに設置されたスクリーン上に投影し、刺激呈示間隔を平均2.0秒（1.8—2.2秒）、呈示時間0.3秒で、各記録につき計100回ずつ、無秩序な順で被験者に呈示した。刺激制御は、画像制御プログラムを搭載したパーソナルコンピューターにて行った。快・不快写真の刺激呈示確率は、20または80%とし、いずれかを標的とした。組写真の呈示順は、被験者間で偏りのないように平均化した。被験者には、標的写真の呈示回数を数えるよう、また記録中、体動・瞬目を可能な限り抑制するよう指示した。