

厚生労働科学研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 脇 成 人

平成15年(2003年)3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
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
山脇 成人	
II. 分担研究報告	
1. ストレスによる遺伝子発現機構研究……………	12
森信 繁	
2. ストレスの適応破綻に関する臨床的研究-Sensory gating system-……………	17
岡本 泰昌	
3. MEG による脳機能研究とその画像解析に関する研究……………	20
西谷 信之	
4. 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……………	28
IV. 研究成果の刊行物・別刷……………	30

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 広島大学大学院医歯薬学総合研究科（精神神経医科学）教授

**研究要旨** ストレスに対する適応形成やその破綻の脳内メカニズムを明らかとする目的で、平成 14 年度は以下のような研究を試みた。1) 母子分離によって成熟期でのストレス脆弱性が形成され、脆弱ラット海馬ではストレス負荷によってストレス適応や細胞保護に密接に関与している C-Jun N-terminal kinase 2, 94 kDa-glucose regulated protein, insulin-like growth factor receptor binding protein 2, apuaporin 1 の発現が有意に低下していた。2) 急性ストレスによるカルシウム依存性の細胞内情報伝達物質である calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) のリン酸化亢進には、AMPA 受容体を介した細胞内カルシウム濃度の増大が密接に関与している。3) 母子分離ストレスによって、海馬歯状回領域の noradrenaline, glutamate 刺激性細胞内カルシウム動員が低下している。4) 海馬スライスカルチャーに GFP-actin 複合体を導入して、シナプスを含む樹状突起スパイン内のアクチン細胞骨格の動態が、NMDA 受容体を介したカルシウム流入によってダイナミックに制御されることが明らかとなった。5) ストレスによってストレスに対する予測機能の低下が起り、うつ病では前頭前野の機能低下から快適な予測に関する機能の減弱がみられる。6) ヒト脳は課題の難易度に対応した応答をすることでストレス性負荷を分散し、ストレス適応破綻を回避している。

このような結果はストレス負荷に伴って大脳皮質前頭葉や海馬を主とした活動性の亢進が引き起こされ、その分子メカニズムには細胞内カルシウム濃度亢進を契機に引き起こされるカルシウム依存性キナーゼ・ファオスファターゼの機能亢進や、アクチン細胞骨格の動態の変化が関与していると考えられる。同時にストレスに対する適応の形成には、ストレス刺激に伴う CREBなどを介したカルシウムホメオスターシスの維持に関与する情報伝達系の遺伝子発現変化が重要であり、脆弱性形成には JNK2, GRP-94 といった分子の発現・機能障害が密接に関与していると考えられる。ストレス適応破綻の予防にはストレス予測による感覚入力の抑制や、ストレス難易度に応じた反応性の変化によるストレス負荷の分散が寄与している可能性が示唆されており、今後ストレス関連性精神障害症例でのこのような機能の検討が必要と思われる。

分担研究者

森信繁

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・  
助教授

岡本泰昌

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・  
講師

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

東京大学大学院医学系研究科・  
助教授

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大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：森信繁）・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) 脳磁図（MEG）・機能的磁気共鳴画像法（fMRI）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) 脳磁図（MEG）・磁気共鳴分光法（MRS）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ーシスが障害され、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神機能の

3年度になる平成14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：**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ストレス脆弱ラット海馬を用いたマクロアレイ・マイクロアレイ法による、ストレス脆弱性形成に関する遺伝子の検索を行った。

**A-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究：**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関する、細胞内情報伝達系のストレスや抗うつ薬による変動を検討した。昨年度までに、1) protein phosphatase2A, 2B の発現や機能に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響・2) calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II のリン酸化への急性および慢性ストレスの影響、を検討してきた。このため本年度はストレスのおよぼす情報伝達系への影響を一層明らかとする目的で、急性ストレスに伴う CaMK II リン酸化のメカニズムや、海馬スライスを用いた細胞内カルシウム動態の変化に関する検討を行った。

**A-3. ストレスによる神経機能形態研究：**

ストレスが持続化すると、生体恒常性の破綻を来し、様々な疾患罹患のリスクを著しく増悪させることが知られている。現代の高齢化社会においては、ストレスが引き起こす健康障害の増悪化の阻止ということは緊急課題である。ストレスにさらされた個体の脳内部では、様々なシグナル伝達経路が活性化され、神経伝達・神経回路の機能を修飾すると考えられている。しかしながら、そのような分子修飾の詳細については、ほとんど解明されていない。

ストレス負荷が強すぎると、海馬を中心とした領域で非可逆的な神経細胞死に至る前病変として、可逆的な神経細胞形態、とくに樹状突起の平坦化が顕著に引き起こされるとの報告がある。我々は、このような細胞レベルでの可逆的なストレス病変の分子機構を探索することにより、不可逆性の病変への進行を阻止できる可能性が見いだされるのではないかと考え、ストレス負荷時の神経細胞アクチン再構成に関する研究を行うことにした。

すでに今までの知見により、GFP-actin分子を用いて、樹状突起内アクチン細胞骨格を可視化できることが明らかになっている。そこで以下の2つの実験システムを構築することとした。

1) 初代海馬神経培養系における過剰な神経興奮負荷時に樹状突起アクチン細胞骨格がどのような挙動をとるのかを観察し、その詳細な分子機序を解析する。

2) トランスジェニックマウスに GFP-actin を神経細胞特異的に強制発現させ、ストレス病態モデルにおける樹状突起アクチン細胞骨格病変形成機構について探索できるモデル動物を作出する。

両システムを通して得られた知見を元に、樹状突起病変の進行を阻止する治療法の開発が期待される。

**A-4. MEG, fMRI を用いたストレスによる脳機能変動の研究：**Sensory gating system とは生体にとってあまり重要でない感覚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) 脳の前注意的な情報処理過程である。この情報処理過程は電気生理学的には P50 suppression (gating out に対応)、mismatch negativity (MMN : gating in に対応) などの複数の事象関連電位によって構成されており、ストレスに対する適応機構として重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、一つめの検討としてストレスに対する適応機構としての sensory gating system に着目し、健康者およびうつ病患者において急性ストレス負荷の影響を検討した。次に、われわれはストレス事象の予測が、感覚入力に与える影響を検討するために、快・不快などの情動刺激を用いた予期的反応時間課題を行い、機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いて課題遂行時の脳活動を検討した。さらに情動的ストレスとなる単語がいかなる場所で認知されるかを明らかにするために emotional decision 課題遂行時の脳活動を fMRI を用いて検討した。

**A-5. MEG による脳機能研究とその画像診断：**3年次における本分担研究では、脳磁場計測 (MEG)、ダイナミック磁気共鳴分光法 (dynamic MRS) を用いて、ヒト生体脳におけるストレス性負荷に対する、大脳皮質の処理メカニズムを非侵襲的に解明することを目的とした。

**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**

実験には、全て雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、12時間毎に明暗期を保ち飼育し

た。

ストレスパラダイム：誕生後 2~9 日目までの 8 日間、毎日午前中 1 時間母子分離を行ったものを母子分離群とした。誕生後通常的环境下で飼育したものを対照群とした。それぞれのラットが成長した後(約 300g)、拘束ストレス 2 時間を施行し、直後に断頭、海馬を摘出した。同時に、採血も行った。拘束ストレスに伴うコルチコステロン分泌亢進を抑制する目的で、拘束ストレス 2 時間前に metyrapone 75 mg/kg をラット腹腔内に注射した。

マクロアレイ法：200 個の cDNA を含む Rat Stress Array を用いた。母子分離+成熟期急性拘束ストレス群および対照群（成熟期急性拘束ストレス負荷のみ）、それぞれ 5 匹のラットの海馬から抽出した mRNA を混合して、プローブ作成に用いた。抽出した mRNA を Dnase I 処理後に、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  存在下で逆転写酵素を用いて single strand cDNA に逆転写した。これをプローブとしてアレイにハイブリダイズさせ、各 cDNA spot に結合しているプローブの放射活性を Fuji Film BAS2000 にて計測した。

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。マクロアレイを用いた実験と同様に、各群それぞれ 5 匹のラット海馬から抽出した mRNA を混合してプローブ作成に用いた。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。

Real-time quantitative PCR：マクロアレイ・マイクロアレイ法にて発現に顕著な違いが認められた各遺伝子の coding sequence を Gene Bank より検索し、これをデータに Primer Express ソフトウェアにて forward, reverse primer と Taq Man probe の塩基配列を設計し、各 primer や蛍光標識 Taq Man probe の合成を行った。このようにして作成したプライマーセットを使い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS)を用いて PCR 反応を行い蛍光強度を計測後、SDS ソフトウェアで解析した。

Western blot 法：ラット海馬内 JNK2 蛋白発現量およびリン酸化の測定は Western blot 法にて行った。サンプルはサイトゾール分画を取り出し、10% SDS ゲルで泳動し、ナイロン膜に転写した。次に、JNK2 あるいは phospho-JNK2 の 1 次抗体および 2 次

抗体 (HRP-linked) でインキュベーション後に、各物質に該当するバンドの濃淡をデンストメーターで測定した。

## B-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究

### 1) CaMKII 活性の測定

急性(単回)処置群では 45 分間の拘束ストレスを与えた。LY235959 (NMDA 受容体阻害薬)処置群はストレス開始 20 分前に 5.0mg/kg を、NBQX (AMPA 受容体阻害薬)処置群はストレス開始 20 分前に 11.95 mg/kg を、nimodipine (L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel 阻害薬)処置群はストレス開始 45 分前に 5.0mg/kg をそれぞれ腹腔内注入後 45 分間の拘束ストレスを与えた。拘束ストレス終了直後に断頭し、全脳より海馬を摘出した。海馬に、homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM sodium phosphate, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  soybean trypsin inhibitor, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 2 mM DTT, 25 mM benzamide, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (in 100 % ethanol))を加えて氷上でホモジェナイズし、350 g で 5 分間遠心後、上清を回収した。phospho-CaMKII の発現量は、Anti-ACTIVE CaMKII pAb, (pT<sup>286</sup>)および Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) secondary antibody を用い、CaMKII の発現量は、Anti-CaMKinase II, alpha subunit および Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody を用いて Western Blot 法を用いて検出した。

### 2) 急性拘束ストレス後の細胞内カルシウム動態の検討

急性拘束 (6 時間) 負荷後と対照群のラット海馬歯状回領域での、glutamate, noradrenaline 刺激に伴う細胞内カルシウムの濃度変化を計測した。細胞内カルシウム濃度変化は、スライス内の細胞に取り込まれた fra-2 AM の発色を、CCD カメラ付き (浜松フォトニクス社製 C-2000) 蛍光顕微鏡でモニターし、浜松フォトニクス社製 Argus 50 を用いて蛍光度からカルシウム濃度に換算した。このような実験過程のため、細胞内カルシウム濃度計測は、拘束ストレス終了後 3 時間の時点での結果であった。

## B-3. ストレスによる神経機能形態研究

### 1) 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

マウス海馬錐体細胞の初代培養系において、GFP-actin 発現アデノウィルスを感染させ、種々の電気活動を負荷した時に、神経アクチン細胞骨格にどのような動態変化を及ぼすかをレーザー共焦点顕微鏡システムを用いタイムラプス計測した。電気刺激は以前尾藤らが開発したフィールド電極刺

激法を用い、観測されたアクチンダイナミクスの時定数と高 K 刺激や NMDA 刺激時に認められた時定数を比較した。また、電気刺激にてどの細胞部位でアクチン動態変化が引き起こされるを同定した。カルシウムイメージングは、冷却 CCD カメラを搭載したアクアコスモスシステムを使用した。

2) 神経細胞特異的 GFP-actin 発現マウスの作成

Columbia 大学医学部 Eric R. Kandel 教授より forebrain-selective な発現を可能にする CaMKII promoter を供与していただき、同プロモータ下流に GFP-actin を結合したコンストラクトを作成し、常法により C57BL/6 受精卵へ核内注入を行った。これを仮妊娠した親の子宮へ戻し、生まれた仔におけるトランスジーンの有無、またその子孫における germline transmission を Southern blot 法ならびに PCR 法によって確認した。2 系統のマウスを樹立し、各々をホモ化した。

#### B-4. MEG, fMRI を用いたストレスによる脳機能変動の研究

1) 健常者およびうつ病者を対象とした急性物理的ストレスの Sensory gating system に及ぼす影響

健常対照者 8 例及びうつ病患者 8 例を対象として寒冷刺激負荷前後に P50 suppression および MMN を 204 channel 脳磁計を用いて測定した。P50 suppression は 500 ms 間隔で呈示される一対のクリック音 (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>) を 8 秒間隔で提示し、クリック音に対する反応の強度の比 (2<sup>nd</sup> / 1<sup>st</sup> : t/c ratio) で評価した (t/c ratio が小さいほど gating out の能力が高い)。MMN は 500 ms 間隔で連続して呈示される標準刺激の中に 20% の割合で逸脱刺激を提示し、逸脱刺激に対する加算波形から標準刺激に対する加算波形を引いた波形から MMN 反応を求めた。

2) 健常者を対象としたストレス予期の機能局在に関する fMRI を用いた検討

健常者 15 名を対象に、1.5T の MRI 装置 (島津 Marconi 社製) を用い、予期的反応時間課題遂行時の fMRI を撮像した。課題は、二つ 1 組の刺激 (予告刺激 S1 と標的刺激 S2) を一定の刺激間隔 (4sec) でモニターに呈示し、S2 後にボタン押し反応をさせた。S1 刺激として、○, △, □ の幾何学図形を呈示した (100msec)。S2 刺激として、異なる情動価 (快/不快/中性; 各 30 枚) を持つスライドを呈示した (2sec)。被験者は、○-快、△-不快、□-中性のように S1-S2 の組み合わせを固定した条件 (予期可能条件) と、S1-S2 の組み合わせがランダムな条件 (予期不可能条件) を交互に行った。解析は SPM99

を用い、予期可能条件と予期不可能条件の時の脳活動領域を比較検討した。

3) 健常者を対象とした情動的ストレス単語の認知の機能局在に関する fMRI を用いた検討

健常女性 12 名を対象に、検討 2 と同じ装置を用い、emotional decision 課題遂行時の fMRI を撮像した。課題は、3 語 1 組の負の身体イメージに関連した単語あるいは負の情動に関連した単語の中から最も不快な単語を選ぶ条件と、3 語 1 組の情動的負荷を持たない中性の単語の中から最も中性な単語を選ぶ条件を交互に 3 回ずつ、計 6 ブロック繰り返した。1 ブロック=30 秒間に 5 組の単語セットを呈示する。被験者は各単語セットに対してボタン押しにて解答した。解析は SPM99 を用い、負の身体イメージに関連した単語呈示時と中性の単語呈示時、負の情動に関連した単語呈示時と中性の単語呈示時の脳活動領域を比較検討した。課題終了後、各被験者は課題に使用した単語の主観的な不快さを点数評価した。

#### B-5. MEG・MRS による脳機能研究とその画像診断

1) ストレス性刺激におけるヒト大脳皮質活動の変化

脳磁場計測による研究

10 名の健常成人 (男性: 4 名、女性: 6 名、年齢: 平均 24 歳、全員右利き)、および 8 名 (男性: 6 名、女性: 2 名、年齢: 平均 29 歳、7 名右利き、1 名両利き) のコミュニケーション障害、模倣障害を有するアスペルガー症候群の患者を対象に、ストレス性負荷に対する大脳皮質の活動を評価した。

刺激は、研究分担者の顔写真で口唇の形状を変えた写真を用いた。口唇形状は、(1) 「あ」・「い」・「う」の語音の形状と、(2) 語音への変換が不可能な形状とした (図 1)。

また (3) 対照として口唇形状の変形のない写真を用いた (図 1 中央)。刺激写真は、遮蔽室外に設置した液晶プロジェクター VistaGRAPHX2500 (ELECTROHOME 社製 ELECTRONICS, Canada) 介して、実験室内の被験者の 1m 前方の黒背景のスクリーン上に投影した。刺激呈示間隔を 3.0—6.0 秒、呈示時間 0.15 秒で、それぞれの写真組みにおいて、無秩序な順で被験者に呈示した。刺激制御は、遮蔽室外のパーソナルコンピュータ (NEC 製、PC-98) 上のプログラム Multi Stimu (メディカルトライシステムズ社製) にて行った。

被験者への課題として、(1) 口唇形状の観察、(2) 口唇形状の模倣、および (3) 被験者自ら口唇形状作成するものとした。

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。組写真の呈示順、課題順は、被験者間で偏りのないよう平均化した。

脳磁場記録は、306チャンネル全頭型MEG (Neuromag社製、Helsinki, Finland) を用いて、静穏な磁気遮蔽室内で実施し、各記録時間は5分間とした。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。口輪筋活動をモニターするために、口輪筋周囲に2個の、ま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Ag/AgCl皿電極を接着した。通過周波数帯域を、脳磁場・口輪筋運動・眼球運動に対して0.03-260 Hz、標本周波数を1001Hzとした。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。

解析は、観察・模倣課題においては、刺激呈示開始時を、また自ら作成する課題では、口輪筋からの筋電図の立ちあがり起点にし、刺激前1.0秒から刺激後1.0秒間で、脳磁場波形をOff-lineにて加算平均した。振幅は刺激前1.0—0.8秒を基準とした。加算平均した波形の再現性を確認し、等価電流双極子モデルによる多電流源モデル

(Hamalainen et al., 1993; Nishitani et al., 1998, 1999, 2000) を用いて、活動源の推定を行い、各被験者の頭部MRIに重畳した。

## 2) ダイナミック磁気共鳴分光法による研究

初年度より開発してきた刺激呈示を起点とし記録を行うダイナミックMRSを、1.5 T、<sup>1</sup>H-MRI (TR 1500, TE 135)において継続して行なった。被験者は、脳磁場計測に参加した10名の健常成人である。

刺激として、脳磁場計測と同様に動きを示唆する静止写真を用いた。(1) 言語への変換の容易な手指の形状、(2) 日本手話の手形より採用した、言語への変換が困難な手指の形状、そして対象として(3) 手指を閉じた「グ」の手指の写真とした(図2)。

刺激呈示間隔、呈示時間は脳磁場計測と同様にし、パーソナルコンピューター上のSTIM (Neuroscan, El Paso, USA) で制御し、液晶プロジェクター (Sony) を介してスクリーン上に、それぞれの写真組みにおいて、無秩序な順で被験者に呈示した。被験者にはHead Coil 上に設置した鏡を通して、刺激写真の手指形状の(1) 観察、(2) 模倣、および(3) 被験者自ら形状

を作成するものとした。

記録は、被験者頭部画像の撮像を、通常のT1-weighted image で最初に行った。これを基に、1x2x1センチ立方の関心領域を左側後部ブローカ野 (BA44 & 45) に設定した。水抑制後、傾斜磁場調整を行い、Shimming Level を6-10 Hzに調整した。1回の検査における刺激呈示回数は150回とした(記録時間5分)。撮像を開始は、水抑制に要する時間と、頭皮上脳波や脳磁場における応答潜時 (Nishitani et al., 2000, 2002) を考慮し、刺激呈示開始時から100ミリ秒毎に遅延時間を設定し記録した。

求められたMRSに対して、残存する水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った上で高速フーリエ変換ならびにGaussian変換した後に、各スペクトルの積分値を算出した。その後に安静時のCho、Cr、NAAの各物質の値に対する課題負荷時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

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

マクロアレイ法による検索結果：一昨年・昨年度の検討結果から、c-Jun N-terminal kinase-2 (JNK-2) mRNA, 蛋白発現の減少やglucose regulated protein-94 mRNA 発現の減少が、母子分離によるストレス脆弱ラット海馬ではみられていた。本年度はまずJNK-2 発現が海馬のどの領域で減少しているのかを免疫組織染色法にて検討した結果、特にCA3 錐体細胞層で減少していることが明らかになった。

単回拘束ストレス (2時間) によるJNK-2 発現の低下の機序を解明する目的で、以下の実験を試みた。母子分離成熟後に単回拘束ストレス (30分間) を負荷して、JNK-2 mRNA 発現をreal-time quantitative PCR法で検討したが、正常飼育+単回拘束ストレス群と比べて有意な発現の差はみられなかった。この時点での血清コルチコステロン濃度にも、有意な差はみられなかった。Metyrapone 前処置後に単回拘束ストレスに伴うJNK-2 発現をreal-time quantitative PCR法を用いて、母子分離群と正常飼育群で検

討した結果、特に有意な差はみられなかった。

マイクロアレイ法による検索結果：昨年度に引き続き、母子分離+成熟期急性拘束ストレス群の海馬で対照群（成熟期急性拘束ストレスのみ）と比較してマイクロアレイで著しく発現の低下している遺伝子を対象に、それらの遺伝子の発現の検証を real-time quantitative PCR 法を用いて行った。その結果、insulin-like growth factor binding protein2 (ILGFBP2)および aquaporin-1 の発現が、母子分離+成熟期拘束ストレス群で正常飼育+成熟期拘束ストレス群に比して有意に減少していた。またこの 2 遺伝子の発現に関して母子分離のみによる影響を除外する目的で、母子分離のみで拘束ストレス未処置の状態での発現を検討したが、正常飼育群との間に有意な差はみられなかった。

## C-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究

### 1) ストレスのおよぼす CaMKII リン酸化への影響

ラットの海馬において 45 分間の急性ストレスにより phospho-CaMKII の有意な亢進がみられた。大脳皮質前頭部においても同様の傾向であった。それぞれの部位において CaMKII 発現量は変化が認められなかった。phospho-CaMKII 発現の有意な亢進は、急性ストレス解放 60 分後およびストレスの慢性処置後に消失した。

ラットの海馬において、LY235959 前投与+拘束ストレス（45 分間）処置群では、拘束ストレスによる phospho-CaMKII 発現の有意な亢進が抑制され、拘束ストレス未処置群（生理食塩水の前投与あり）および拘束ストレス負荷群（生理食塩水の前投与あり）との間に有意な差はみられなかった。同じく NBQX 前投与+拘束ストレス処置群では、拘束ストレスによる phospho-CaMKII 発現の有意な亢進が抑制され、拘束ストレス未処置群および拘束ストレス負荷群との間に有意な差はみられなかった。しかしながら nimodipine 前投与+拘束ストレス群では、拘束ストレスによる phospho-CaMKII 発現の亢進は抑制されなかった。すべての薬物前投与群で、海馬内 phospho-CaMKII・CaMKII 発現は影響されなかった。同じくすべての阻害薬前投与+拘束ストレス群でも、海馬内 CaMKII 発現に、有意な変化はみられなかった。

### 2) ストレスのおよぼす海馬細胞内カルシウム動態への影響

ストレス未処置のラット海馬歯状回の顆粒球細胞層を中心とした領域での、グルタミン酸刺激では 1 mM - 10 mM の範囲で濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の亢進が

みられた。同様にノルアドレナリン刺激では、1 mM - 1 mM の範囲で濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の亢進がみられた。このためストレス負荷後の細胞内カルシウム動態を検討する実験では、グルタミン酸 10 mM・ノルアドレナリン 100 nM を用いて刺激した。急性拘束ストレス 6 時間では、グルタミン酸刺激およびノルアドレナリン刺激に伴う細胞内カルシウム濃度亢進は、ストレス未処置群に比して有意に抑制されていた。

## C-3. ストレスによる神経機能形態研究

### 1) 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

Adex-CMV-GFP-actin を初代培養海馬錐体細胞に感染させ、GFP-イメージングを行った。フィールド電極刺激により、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行い、樹状突起スパインにおける GFP-actin の点状構造が一部増強されるとき、NMDA 受容体刺激を介した  $Ca^{2+}$  流入が必須であることを証明した。また、カルシウムイメージングを同時に行い、NMDA 刺激時にシナプス局所でカルシウム動員を起こすことが、アクチン集積の引き金になることが明らかになった。

本成果は PNAS 誌に 2002 年掲載された。

初代培養海馬錐体細胞における GFP-actin のダイナミクスが本質的であることを確認する目的で、GFP-actin ウィルスを海馬スライスカルチャー系に感染させ、上記と同様の手法で、樹状突起スパインのアクチン動態を観察したところ、スパインにおけるアクチンが活動依存的に重合していることを示唆するデータを得た。

### 2) 神経細胞特異的 GFP-actin 発現マウスの作成

昨年まで、独立した 2 つの系統において、トランスジーンのエントグレーションを確認し、それぞれとも、海馬錐体細胞ならびに歯状回顆粒細胞において、強い発現をしていることを確認できた。各々について、トランスジーンを両アレルに発現するマウスラインの作成を行い、一ラインのホモ化を確認した。今後、同ラインを用い、in vivo ストレスパラダイムにおける細胞骨格変化を確認する予定である。

## C-4. MEG, fMRI を用いたストレスによる脳機能変動の研究

### 1) 健常者およびうつ病者を対象とした急性物理的ストレスの Sensory gating system に及ぼす影響

健常者において cold pressor test は t/c ratio を増加させ、MMN 反応を増大させたのに



対し、うつ病患者において t/c ratio は増加させたが、MMN 反応に対しては影響を与えなかった。

## 2) 健常者を対象としたストレス予期の機能局在に関する fMRI を用いた検討

予期可能条件では予期不可能条件と比較して、前頭前野の領域(内側前頭前野、下前頭前野、背外側前頭前野)で有意な活動上昇を認めた。また、不快刺激を予期する時に後頭部の活動上昇が認められた。快刺激を予期している時では、左背外側前頭前野、左内側前頭前野、右小脳の活動が認められた。一方で、不快刺激を予期している時では、右下前頭前野、右内側前頭前野、右扁桃核、左前帯状回、および両側の視覚野(左右後頭葉、右嗅部、左舌状回)の活動がみられた。

## 3) 健常者を対象とした情動的ストレス単語の認知の機能局在に関する fMRI を用いた検討

中性の単語呈示時と比較して、負の身体イメージと負の情動に関連した単語呈示時には左海馬傍回が共通して賦活され、その活動は負の情動よりも負の身体イメージに関連した単語呈示時のほうが大きかった。負の身体イメージに関連した単語では左海馬傍回に加えて右海馬傍回、左右中側頭回、視床も併せて賦活され、また負の情動に関連した単語では左右尾状核、左小脳、右紡錘回などが併せて賦活された。

## C-5. MEG による脳機能研究とその画像診断

### 1) ストレス性刺激におけるヒト大脳皮質活動の変化

健常者において、観察、模倣の課題において、両側半球の後頭部視覚野(Brodmann: BA18)、上側頭溝(BA22)、下頭頂部(BA40)、後下前頭部(BA44/45)、一次運動野(BA4)の順に活動が認められた。一方自ら形状を作成する課題(実行)では、後下前頭部(BA44/45)、一次運動野(BA4)のみに活動が認められた(図3)。

それぞれの領域の活動は、観察、模倣課題において、上側頭溝(BA22)が最大であったが、両者において有意差は認められなかった。一方後下前頭部(BA44/45)、一次運動野(BA4)は、模倣時に最も活動し、観察、実行課題間には有意差なく同等な活動であった。この関係は左右半球において同様に認められた。一方、有意差は認めなかったものの、課題に関係なく、左後下前頭部では言語変換容易な刺激に対する応答が、右後下前頭部では言語変換困難な刺激に対する応答が優位であった。

次にソーシャル・コミュニケーション障害・模倣障害を有するアスペルガー症候群

の患者における両側半球の後頭部視覚野(Brodmann: BA18)、上側頭溝(BA22)、下頭頂部(BA40)の活動は、健常者と同様であったが、

特に右半球の後下前頭部(BA44/45)および一次運動野(BA4)において、応答時間の遅延と活動強度の低下が認められた。

## 2) ダイナミック磁気共鳴分光法による研究

左後下頭頂部(ブローカ野)の BA44 と BA45 に計測領域を設定した(図4左)。そのいずれの領域においても、Cho、Cr、NAAのスペクトラムは、それぞれ 3.20、3.00、2.01ppm に認められた(図4右)。

図5は、それぞれの領域の、安静時(Control)に対する各課題時における Cho と Cr の相対比を示している。BA44 および BA45 のいずれにおいても、言語変換可能・不可能のいずれの手指の模倣課題遂行時においても Cho と Cr が最大であり、観察、実行課題においては同等レベルに増加していた。さらにいずれの課題においても、BA44 では両手指形状に対して有意差は認められなかったが、BA45 においては言語変換可能な手指形状に対する課題において、有意に Cho と Cr の代謝が増加していた。

## D. 考察

### D-1. ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明

昨年度までの研究成果と本年度新たに得た結果から、母子分離ストレスを経験して成長したストレス脆弱ラットは、成熟期ストレス負荷に伴う海馬 JNK2, GRP-94 発現の低下と ILGFBP-2, aquaporin-1 の発現減少がみられることが明らかとなった。特に新規環境への馴化に関与すると予想されるストレスによる JNK-2 発現減少のメカニズムを検討したところ、母子分離から形成されるストレス負荷時の高コルチコステロン状態が有意な減少に関連していることが明らかになった。

### D-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究

昨年度までの研究によって、急性拘束ストレス負荷直後は 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、protein phosphatase (PP) 2A, 2B の活性亢進の優位になることが示された。本年度のストレスによる CaMKII リン酸化メカニズムの研究から、AMPA・NMDA 受容体活性化を介したストレス性の細胞内カルシウム濃度亢進がリン酸化に密接に関与していることが示された。このような結果をまとめ

ると、ストレスに伴う遺伝子発現変化にはグルタミン酸-AMPA・NMDA 受容体-CaMKII を介した系の活性化が関与していると考えられる。同時に本年度行った急性拘束後の海馬スライスを用いた細胞内カルシウム動態変化の研究結果は、ストレス負荷後には AMPA-NMDA 受容体あるいは 1 アドレナリン受容体を介した細胞内へのカルシウム動員系が脱感作されていることを示している。このような結果は、急性ストレス曝露中に細胞内のカルシウム濃度が顕著に亢進して、受容体を介した情報系への何らかの抑制機構が発揮された結果を考えられる。このようなストレスに伴う細胞内情報伝達機能変化からみた研究成果をまとめると、ストレス適応破綻には細胞内カルシウム濃度亢進を起点に転写因子リン酸化を促進するプロテインキナーゼ系の亢進が、適応には PP 系の活性化に由来する脱リン酸化を介した受容体-細胞内情報系の脱感作がそれぞれ関与していると考えられる。

#### D-3. ストレスによる神経機能形態研究

本研究によって、全くあらたな、神経細胞内樹状突起のアクチン細胞骨格可視化法を開発し、樹状突起スパインが過剰刺激により形態変化する一つのメカニズムを明らかにした。GFP-actin を用いることにより、初代培養細胞レベルでは、確かに異なるカルシウム流入の過剰負荷が、樹状突起の形態変化を引き起こすことが証明された。また、ストレス等にみられる過剰神経活動などにおいて、NMDA 受容体を介したカルシウム流入と、過剰な流入が生じた際の電位依存性カルシウムチャンネルの作用とが、細胞骨格再構築において異なる結果をもたらす可能性を示唆した。GFP-actin を神経細胞に発現するトランスジェニックマウスを用いることにより、このような発見がさらに *in vivo* のストレスモデル実験によっても実証できるよう今後実験を計画していく予定である。

#### D-4. MEG, fMRI を用いたストレスによる脳機能変動の研究

健常者およびうつ病者を対象とした急性物理的ストレスの Sensory gating system に及ぼす影響の研究結果から、急性の物理的ストレスは健常者の gating out を減少させ、gating in を増加させた。急性のストレス状況下では外界のすべての情報に対して注意を払うことは理に適っており、これらの反応は急性ストレスに対する正常な適応反応であると考えられる。うつ病患者における物理的ストレスに対する反応の低下は健常者に認められたストレスに対する正常な適応反応が低下した状態、すなわちストレス

に対する不適応状態を有する可能性が示唆された。また、情動的ストレス、特に negative な情動刺激は P50 suppression の t/c ratio を増加させ、物理的ストレスだけでなく、情動的ストレスも sensory gating system に対して影響を与えうることが明らかとなった。

健常者を対象としたストレス予期の機能局在に関する fMRI を用いた検討の結果から、将来の情動刺激予期における前頭前野の役割が示唆された。また、左前頭前野の活動は快刺激の予期と関連し、一方で、右前頭前野の活動は不快刺激の予期と関連していることが示唆された。さらに、扁桃体および前帯状回が、不快刺激の予期に重要な役割を果たしており、視覚野におけるネガティブな情報の入力を調節していると考えられた。

健常者を対象とした情動的ストレス単語の認知の機能局在に関する fMRI を用いた検討の結果から、不快な単語刺激の認知における左海馬傍回の役割が示唆された。また、この領域の活動の強さは刺激の主観的な不快さの程度ではなく、刺激の種類に応じて変化している可能性が示唆された。

#### D-5. MEG による脳機能研究とその画像診断

2 年次に示唆した海馬-辺縁系-大脳皮質間の機能的投射経路の関りの結果から、ストレス性負荷（言語変換可能・不可能な刺激、観察・模倣・実行の課題）の程度（刺激と課題の難易度）に対する、ヒト大脳皮質、特に後下前頭部 BA44/45 の活動変化を、健常者ならびにアスペルガー症候群の患者において、MEG、ダイナミック MRS を用いて、神経生理学的、神経化学的に非侵襲的に明らかにした。

MEG による活動強度の上昇は、興奮性シナプス後電位の上昇を反映しており、この変化は、ダイナミック MRS により示されたシナプスにおける神経伝達物質アセチルコリンの代謝と、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の亢進により説明される。このことから、本研究で得られた MEG とダイナミック MRS の結果は、相補的にストレス性負荷の程度（刺激と課題の心的難易度）に対する、左右大脳半球間、大脳皮質間(BA44 vs. BA45) の応答変化・応答の分化を示している。またアスペルガー症候群において右半球の機能障害が強く示唆されたが、この結果はこれまで示唆されてきたものに合致する。健常者においては、実行課題よりも心因的にも容易と判断され、脳活動も上昇していた模倣課題においても、アスペルガー症候群では後下前頭部(BA44/45)および一次運動野(BA4)の活動が遅延・低下していた結果は、アスペルガー

症候群の成因を示唆するのみならず、ストレス性負荷による特定の脳部位の機能破綻を示唆するものと考えられる。

## E. 結論

### E-1. ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明

母子分離ストレスおよび成熟期急性拘束ストレスに伴う、海馬遺伝子発現の検討の結果から、ストレス脆弱群では JNK2, GRP-94, ILGF2, aquaporin-1 遺伝子発現の低下のみられることが明らかとなった。JNK2 は細胞外刺激に対する適応の獲得に、重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子である。その一方で GRP-94, ILGF2 は細胞ストレスに対して、細胞保護作用を発揮する遺伝子である。従ってこのような遺伝子の発現低下は、個体のストレス脆弱性に密接に関与していると思われる。

### E-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究

急性拘束ストレス負荷に伴って、AMPA-NMDA 受容体を介した細胞内カルシウム濃度亢進が引き起こされ、CaMKII, PP2A, PP2B の活性の亢進の引き起こされることが明らかにされた。同時にストレス負荷終了後に CREB リン酸化の低下が一過性にみられることや、AMPA-NMDA および  $\alpha 1$  アドレナリン受容体情報系の脱感作状態が引き起こされることから、ストレス負荷後には細胞外刺激に対する保護的機構が活性化していることも示唆された。

### E-3. ストレスによる神経機能形態研究

我々の実験データにより、シナプス活動が過剰におこるとき、シナプスを含む樹状突起スパイン内のアクチン細胞骨格の動態が、NMDA 受容体を介したカルシウム流入によってダイナミックに制御されていることが示した。さらに上記成果を、スライスカルチャーの系で確認した。今後は GFP-actin 発現トランスジェニックマウスを用い、実際にストレス性樹状突起病変が引き起こされる際の分子基盤にさらに迫っていきたい。

### E-4. MEG, fMRI を用いたストレスによる脳機能変動の研究

今回の sensory gating system に関する所見は、うつ病を始めとするストレス関連疾患の病態生理との関連だけでなく、健康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関する感覚入力を抑制している可能性もあり、ストレス事象に対する適応を考えていく上で興味深いものと考えられ

た。さらにストレスの種類や快・不快といった刺激の種類によって反応する脳の laterality が異なることが推定され、ストレスに関連した脳機能局在を考えていく上で重要な所見が得られた。

### E-5. MEG による脳機能研究とその画像診断

ストレス性負荷・刺激によるヒト脳活動の変化を、MEG、ダイナミック MRS により非侵襲的に評価した。大脳皮質のストレス性負荷に対する機能解明研究の結果から、ヒト脳は課題の難易度に対応した応答をすることでストレス性負荷を分散し、ストレス適応破綻を回避していることが示唆された。本研究に用いた手法により、ストレス性疾患におけるヒト生体脳の活動の、非侵襲的臨床評価を可能にし、生体脳におけるストレス適応破綻機序の神経薬理的解明と疾患予防・治療とその評価に道を開くものである。

## 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) Tanaka K, Takahashi J, Morinobu S, Fujimaki K, Tsuji S, Kato K, Ohkawa M, Yamawaki S, Kato N: Imipramine, but not lithium, induces the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin without affecting its mRNA expression in the rat brain. *Psychopharmacol* 162: 339-344, 2002.
- 2) Tamura T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S: The effects of antidepressants drug treatments on activator protein-1 binding activity in the rat brain. *Prog Neuro-psychopharmacol & Biol Psychiat* 26: 375-381, 2002.
- 3) Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Yamawaki S, Takahashi J, Tanaka K, Fujimaki K: Lithium and signal transduction. In *Catecholamine Research: from molecular insights to clinical medicine*. ed. by Nabeshima T. Kluwer Academic Plenum Publishers, pp 435-437, 2002.
- 4) Furuyashiki T, Arakawa Y, Takemoto-Kimura S, Bito H, Narumiya S: Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated  $Ca^{2+}$ -channels. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 144: 58-14463, 2002.
- 5) Bito H, Furuyashiki T, Arakawa Y, Narumiya S: Control of axon outgrowth by Rho effectors. *NeuroSignals*, in press.

- 6) Bito H, Takemoto-Kimura S: Ca2+/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in press.
- 7) Ueda K, Okamoto Y, Okada G, Yamashita H, Hori T, Yamawaki S: Brain activity during expectancy of emotional stimuli: An fMRI study. *NeuroReport*, 14, 51-55.
- 8) Okada G, Okamoto Y, Morinobu S, Yamawaki S, Yokota N: Attenuated Left Prefrontal Activation during a Verbal Fluency Task in Patients with Depression. *Neuropsychobiology* (in press)
- 9) Nishitani N, Hari R.: Viewing lip forms: cortical dynamics. *Neuron* 36:1211-1220, 2002.
- 10) Nishitani N: Diagnosis of higher brain dysfunction by MEG. *SoGo Rehabilitation*. 11:1019-1024, 2002.
- 11) Nishitani N: Role of Broca area studied by MEG. *Advances in Neurological Sciences*. 247: 891-896, 2002.

## G-2. 学会発表

### シンポジウム

- 1) Morinobu S: Stress vulnerability: Disturbance of CREB phosphorylation-dephosphorylation reactions. The XXIII CINP Congress (Montreal) 2002. 6.
- 2) 森信 繁: ストレス脆弱性形成に関与する遺伝子の検索、第18回日本ストレス学会、東京、2002年11月。

### 一般発表

- 1) Suenaga T, Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Sawada T, Kawano K, Yamawaki S: The influence of restraint stress on the activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II(CaMKII) in the rat hippocampus and frontal cortex. The XXIII CINP Congress (Montreal) 2002. 6.
- 2) Tsuji S, Morinobu S, Sawada T, Kawano K, Suenaga T, Okamoto Y, Yamawaki S, Nishida A: Stress Vulnerability in adult rats with neonatal isolation stress. The XXIII CINP (Montreal) 2002. 6.
- 3) 末永貴美 森信 繁 辻 誠一 川野樹一朗 澤田卓哉 山脇成人. ラット脳内 Calcium/calmodulin dependent protein kinase II に対するストレスの影響」、第24回日本生物学的精神医学会(大宮)2002年4月。
- 4) 辻 誠一、森信 繁、澤田卓哉、福本拓治、末永貴美、川野樹一朗、山脇成人「母子分離ストレスを用いたストレス脆弱性に関与する遺伝子の研究-Microarrayを用いて-」、第24回日本生物学的精神医学会(大宮)2002年4月。
- 5) 川野樹一朗、辻 誠一、澤田卓哉、末永貴美、森信 繁、山脇成人「母子分離ストレスを用いたストレス脆弱性に関与する遺伝子の研究-マイクロアレイ法を用いて-」、第24回日本生物学的精神医学会(大宮)2002年4月。
- 6) 末永貴美、森信 繁、辻 誠一、渡辺隆之、川野樹一朗、澤田卓哉、山脇成人「ストレスによるラット脳内 Calcium/calmodulin dependent protein kinase II のリン酸化および発現量に関する検討」、第32回日本神経精神薬理学会年会(前橋)2002年10月。
- 7) 森信 繁、澤田卓哉、辻 誠一、川野樹一朗、末永貴美、山脇成人、西田 朗. 老齡期うつ病の発祥機序に関する分子生物学的研究」、第32回日本神経精神薬理学会年会(前橋)2002年10月。
- 8) Yamashita H, Okada G, Okamoto Y, Ueda K, Morinobu S, Yamawaki S: Modulation of P50 suppression by emotional visual stimuli. 2002 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Montreal Canada, June 23-27, 2002.
- 9) Kamiryo N, Okamoto Y, Okada G, Kurosaki M, Morinobu S, Yamawaki S: Emotional Color Stroop Including Negative Body Image and Negative Emotion Words: Functional MRI Study. 2002 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Montreal Canada, June 23-27, 2002.
- 10) Ueda K, Okamoto Y, Okada G, Yamashita H, Morinobu S, Hori T, Yamawaki S: Emotional expectancy and activation of the prefrontal cortex: A functional magnetic resonance imaging study. 2002 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Montreal Canada, June 23-27, 2002.
- 11) Okada G, Okamoto Y, Ueda K, Yamashita H, Morinobu S, Yamawaki S, Yokota N, Doya K: Brain Activity during Selection between Small, Immediate Rewards and Large, Delayed Rewards in prediction of future reward: A Functional Magnetic Resonance Imaging study. 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, Sendai JAPAN, June 2 - 6, 2002.
- 12) Ueda K, Okamoto Y, Okada G, Yamashita H, Morinobu S, Hori T, S Yamawaki S: Expectancy of pleasant, unpleasant, and neutral visual stimuli: A Functional Magnetic Resonance Imaging study. 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain,

- Sendai JAPAN, June 2 - 6, 2002.
- 13) Kamiryo N, Okamoto Y, Okada G, Kurosaki M, Morinobu S, Yamawaki S: Emotional stroop including body image and emotion words: fMRI study. WPA World Congress 2002, Yokohama Japan, August 25-30, 2002
  - 14) Asahi S, Okamoto Y, Okada G, Morinobu S, Yamawaki S, Doya K: Relationship between brain activation during GO/NOGOTask and impulsiveness: A fMRI study. Neuroscience 2002 ,Orlando USA, November 3-7, 2002.
  - 15) Bito H. Dynamic and activity-dependent control of neuronal and synaptic morphology in the mammalian CNS. Neurosci.Res. Suppl. 26, S13-4, 2002 (第 25 回神経科学学会大会、東京、7.7-9, 2002) 口頭.
  - 16) Takemoto-Kimura S, Ohmae S, Furuyashiki T, Arakawa Y, Kikumura S, Narumiya S, Bito H: Molecular cloning and analysis of CLICK-III, a novel  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent CREB kinase. Neurosci.Res. Suppl. 26, I-B-068, 2002 (第 25 回神経科学学会大会、東京、7.7-9, 2002) ポスター.
  - 17) Furuyashiki T, Arakawa Y, Takemoto-Kimura S, Bito H, Narumiya S:  $Ca^{2+}$  dynamics regulates activity-dependent actin reorganization in hippocampal neurons. Neurosci.Res. Suppl. 26, II-A-009, 2002 (第 25 回神経科学学会大会、東京、7.7-9, 2002) ポスター.
  - 18) Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Ishizaki T, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S: A critical role for a RhoGTPase effector, mDia1, in directing axon outgrowth and elongation in mammalian CNS neurons. Neurosci.Res. Suppl. 26, II-C-107 , 2002 (第 25 回神経科学学会大会、東京、7.7-9, 2002) ポスター.
  - 19) Takemoto-Kimura S, Ohmae S, Furuyashiki T, Arakawa Y, Kikumura S, Narumiya S, Bito H: CLICK-III is a novel  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent CREB kinase expressed in the CNS. Soc. Neurosci. 抄録 28, 143.3, 2002 (第 32 回北米神経科学学会年会, Orlando, 11.2-7, 2002) Poster
  - 20) Furuyashiki T, Arakawa Y, Takemoto-Kimura S, Narumiya S, Bito H: Spatiotemporal dynamics of calcium mobilization determines activity-dependent actin reorganization in the hippocampal neurons. Soc. Neurosci. 抄録 28, 153.4, 2002 (第 32 回北米神経科学学会年会, Orlando, 11.2-7, 2002) Poster
  - 21) Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Ishizaki T, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S: A critical role for a RhoGTPase effector, mDia1, in directing axon outgrowth and elongation in mammalian CNS neurons. Soc. Neurosci. 抄録. 28, 528.12, 2002 (第 32 回北米神経科学学会年会, Orlando, 11.2-7, 2002) Poster
  - 22) 古屋敷智之、松岡陽子、山田清文、尾藤晴彦、溝口明、鍋島俊隆、成宮周：プロスタグランジン E 受容体 EP1 による情動ストレス及びドパミン系制御。生化学 74, 627, 2S12-5, 2002. (第 75 回日本生化学会、10.14-17, 2002)
  - 23) 尾藤晴彦、竹本-木村さやか、大前彰吾、成宮周：シナプスから核へのシグナルリングの解析：CaMK による CREB 活性化制御。生化学 74, 686, 4S64-1, 2002. (第 75 回日本生化学会、10.14-17, 2002)
  - 24) 竹本-木村さやか、大前彰吾、古屋敷智之、荒川芳輝、喜久村祥子、成宮周、尾藤晴彦。生化学 74, 813, 2P-651, 2002. (第 75 回日本生化学会、10.14-17, 2002)
  - 25) 大前彰吾、竹本-木村さやか、古屋敷智之、丹治正大、喜久村祥子、荒川芳輝、成宮周、尾藤晴彦。生化学 74, 813, 2P-652, 2002. (第 75 回日本生化学会、10.14-17, 2002)
  - 26) Nishitani N, Maeno M: Neurochemical Dynamics in Human Hippocampus. 8<sup>th</sup> Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping. (June, 2002 in Sendai).
- H. 知的財産の出願・登録状況  
該当事項なし。

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 広島大学大学院医歯薬学総合研究科（精神神経医科学）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考えられる。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の変化を明らかとした。1) ストレス不適応状態でのラット海馬CaMKIIのリン酸化の亢進には、AMPA・NMDA受容体を介した細胞内カルシウム流入が密接に関与している。2) 急性拘束ストレス負荷後の海馬歯状回では、グルタミン酸・ノルアドレナリン刺激に伴う、細胞内カルシウム濃度の亢進が抑制される。3) 母子分離によって形成されたストレス脆弱ラット海馬では、成熟期急性拘束ストレス負荷に伴うJNK-2, phospho-JNK発現が低下しており、発現低下の機序には拘束ストレスに伴うコルチコステロン分泌亢進が密接に関与している。

**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曝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療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曝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、神経可塑性の一つの形である long-term potentiation の形成にも重要な因子と考えられている。これまで本研究者は、CREB のリン酸化-脱リン酸化反応に関与する、1) protein phosphatase2A, 2B の発現や機能に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響・2) calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II のリン酸化への急性および慢性ストレスの影響、を検討してきた。このため本年度はストレスのおよぼす情報伝達系への影響を一層明らかとする目的で、急性ストレスに伴う CaMK II リン酸化のメカニズムや、海馬スライスを用いた細胞内カルシウム動態の変化に関する検討を行った。

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ストレス脆弱ラット海馬を用いたマクロアレイ・マイクロアレイ法による、ストレス脆弱性形成に関与する遺伝子の探索を、昨年度に引き続き行った。

**B. 研究方法**

**B-1. CaMKII 活性の測定**

急性(単回)処置群では 45 分間の拘束ストレスを与えた。LY235959 (NMDA 受容体阻害薬)処置群はストレス開始 20 分前に 5.0mg/kg を、NBQX (AMPA 受容体阻害薬)処置群はストレス開始 20 分前に 11.95 mg/kg を、nimodipine (L-type Ca<sup>2+</sup> channel 阻害薬)処置群はストレス開始 45 分前に 5.0mg/kg をそれぞれ腹腔内注入

後 45 分間の拘束ストレスを与えた。拘束ストレス終了直後に断頭し、全脳より海馬を摘出した。

海馬に、homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM sodium phosphate, 25  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM DTT, 25 mM benzamidine, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (in 100 % ethanol))を加えて氷上でホモジェナイズし、350 g で5分間遠心後、上清を回収した。phospho-CaMKII の発現量は、Anti-ACTIVE CaMKII pAb, (pT<sup>286</sup>) および Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) secondary antibody を用い、CaMKII の発現量は、Anti-CaMKinase II, alpha subunit および Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody を用いて Western Blot 法を用いて検出した。

### B-2. 急性拘束ストレス後の細胞内カルシウム動態の検討

急性拘束 (6 時間) 負荷後と対照群のラット海馬歯状回領域での、glutamate, noradrenaline 刺激に伴う細胞内カルシウムの濃度変化を計測した。細胞内カルシウム濃度変化は、スライス内の細胞に取り込まれた fra-2 AM の発色を、CCD カメラ付き (浜松フotonクス社製 C-2000) 蛍光顕微鏡でモニターし、浜松フotonクス社製 Argus 50 を用いて蛍光度からカルシウム濃度に換算した。このような実験過程のため、細胞内カルシウム濃度計測は、拘束ストレス終了後 3 時間の時点での結果であった。

### 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

実験には、全て雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、12 時間毎に明暗期を保ち飼育した。ストレスパラダイム：誕生後 2~9 日目までの 8 日間、毎日午前中 1 時間母子分離を行ったものを母子分離群とした。誕生後通常的环境下で飼育したものを対照群とした。それぞれのラットが成長した後(約 300g)、拘束ストレス 2 時間を施行し、直後に断頭、海馬を摘出した。同時に、採血も行った。拘束ストレスに伴うコルチコステロン分泌亢進を抑制する目的で、拘束ストレス 2 時間前に metyrapone 75 mg/kg をラット腹腔内に注射した。

マクロアレイ法:200 個の cDNA を含む Rat Stress Array を用いた。母子分離+成熟期急性拘束ストレス群および対照群 (成熟期急性拘束ストレス負荷のみ)、それぞれ 5 匹のラットの海馬から抽出した mRNA を混合して、プローブ作成に用いた。抽出した mRNA を Dnase I 処理後に、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 存在下で逆転写酵素を用いて

single strand cDNA に逆転写した。これをプローブとしてアレイにハイブリダイズさせ、各 cDNA spot に結合しているプローブの放射活性を Fuji Film BAS2000 にて計測した。

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。マクロアレイを用いた実験と同様に、各群それぞれ 5 匹のラット海馬から抽出した mRNA を混合してプローブ作成に用いた。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。

Real-time quantitative PCR:マクロアレイ・マイクロアレイ法にて発現に顕著な違いが認められた各遺伝子の coding sequence を Gene Bank より検索し、これをデータに Primer Express ソフトウェアにて forward, reverse primer と Taq Man probe の塩基配列を設計し、各 primer や蛍光標識 Taq Man probe の合成を行った。このようにして作成したプライマーセットを使い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS)を用いて PCR 反応を行い蛍光強度を計測後、SDS ソフトウェアで解析した。

Western blot 法:ラット海馬内 JNK2 蛋白発現量およびリン酸化の測定は Western blot 法にて行った。サンプルはサイトゾール分画を取り出し、10% SDS ゲルで泳動し、ナイロン膜に転写した。次に、JNK2 あるいは phospho-JNK2 の 1 次抗体および 2 次抗体 (HRP-linked) でインキュベーション後に、各物質に該当するバンドの濃淡をデンストメーターで測定した。

免疫組織染色法:ラット海馬内 JNK2 蛋白発現の部位の変動を検討する目的で、海馬スライス (20  $\mu$ M)を作成して免疫組織染色を行った。Western blot 同様に一次抗体・二次抗体とハイブリダオゼーション後、avidin-biotin-peroxidase system で陽性細胞を検出し、ビデオイメージ解析装置にて画像を得た。

#### (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. ストレスのおよぼす CaMKII リン酸化への影響

ラットの海馬において 45 分間の急性ス



トレスにより phospho-CaMKII の有意な亢進がみられた。大脳皮質前頭部においても同様の傾向であった。それぞれの部位において CaMKII 発現量は変化が認められなかった。phospho-CaMKII 発現の有意な亢進は、急性ストレス解放 60 分後およびストレスの慢性処置後に消失した。

ラットの海馬において、LY235959 前投与+拘束ストレス (45 分間) 処置群では、拘束ストレスによる phospho-CaMKII 発現の有意な亢進が抑制され、拘束ストレス未処置群 (生理食塩水の前投与あり) および拘束ストレス負荷群 (生理食塩水の前投与あり) との間に有意な差はみられなかった。同じく NBQX 前投与+拘束ストレス処置群では、拘束ストレスによる phospho-CaMKII 発現の有意な亢進が抑制され、拘束ストレス未処置群および拘束ストレス負荷群との間に有意な差はみられなかった。しかしながら nimodipine 前投与+拘束ストレス群では、拘束ストレスによる phospho-CaMKII 発現の亢進は抑制されなかった。すべての薬物前投与群で、海馬内 phospho-CaMKII・CaMKII 発現は影響されなかった。同じくすべての阻害薬前投与+拘束ストレス群でも、海馬内 CaMKII 発現に、有意な変化はみられなかった。

### C-2. ストレスのおよぼす海馬細胞内カルシウム動態への影響

ストレス未処置のラット海馬歯状回の顆粒球細胞層を中心とした領域での、グルタミン酸刺激では  $1 \mu\text{M} - 10 \mu\text{M}$  の範囲で濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の亢進がみられた。同様にノルアドレナリン刺激では、 $1 \mu\text{M} - 1 \text{mM}$  の範囲で濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の亢進がみられた。このためストレス負荷後の細胞内カルシウム動態を検討する実験では、グルタミン酸  $10 \mu\text{M}$ ・ノルアドレナリン  $100 \mu\text{M}$  を用いて刺激した。急性拘束ストレス 6 時間では、グルタミン酸刺激およびノルアドレナリン刺激に伴う細胞内カルシウム濃度亢進は、ストレス未処置群に比して有意に抑制されていた。

### C-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

マクロアレイ法による検索結果：一昨年・昨年度の検討結果から、c-Jun N-terminal kinase-2 (JNK-2) mRNA, 蛋白発現の減少や glucose regulated protein-94 mRNA 発現の減少が、母子分離によるストレス脆弱ラット海馬ではみられていた。本年度はまず JNK-2 発現が海馬のどの領域で減少しているのかを免疫組織染色法にて検討した結果、特に CA3 錐体細胞層で減少していることが明らかになった。

単回拘束ストレス (2 時間) による JNK-2 発現の低下の機序を解明する目的で、以下

の実験を試みた。母子分離成熟後に単回拘束ストレス (30 分間) を負荷して、JNK-2 mRNA 発現を real-time quantitative PCR 法で検討したが、正常飼育+単回拘束ストレス群と比べて有意な発現の差はみられなかった。この時点での血清コルチコステロン濃度にも、有意な差はみられなかった。Metyrapone 前処置後に単回拘束ストレスに伴う JNK-2 発現を real-time quantitative PCR 法を用いて、母子分離群と正常飼育群で検討した結果、特に有意な差はみられなかった。

マイクロアレイ法による検索結果：昨年度に引き続き、母子分離+成熟期急性拘束ストレス群の海馬で対照群 (成熟期急性拘束ストレスのみ) と比較してマイクロアレイで著しく発現の低下している遺伝子を対象に、それらの遺伝子の発現の検証を real-time quantitative PCR 法を用いて行った。その結果、insulin-like growth factor binding protein2 (ILGF2) および aquaporin-1 の発現が、母子分離+成熟期拘束ストレス群で正常飼育+成熟期拘束ストレス群に比して有意に減少していた。またこの 2 遺伝子の発現に関して母子分離のみによる影響を除外する目的で、母子分離のみで拘束ストレス未処置の状態での発現を検討したが、正常飼育群との間に有意な差はみられなかった。

### D. 考察

昨年度までの研究によって、急性拘束ストレス負荷直後は 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、protein phosphatase (PP) 2A, 2B の活性亢進の優位になることが示された。本年度のストレスによる CaMKII リン酸化メカニズムの研究から、AMPA・NMDA 受容体活性化を介したストレス性の細胞内カルシウム濃度亢進がリン酸化に密接に関与していることが示された。このような結果をまとめると、ストレスに伴う遺伝子発現変化にはグルタミン酸-AMPA・NMDA 受容体-CaMKII を介した系の活性化が関与していると考えられる。同時に本年度行った急性拘束後の海馬スライスを用いた細胞内カルシウム動態変化の研究結果は、ストレス負荷後には AMPA-NMDA 受容体あるいは  $\alpha 1$  アドレナリン受容体を介した細胞内へのカルシウム動員系が脱感作されていることを示している。このような結果は、急性ストレス曝露中に細胞内のカルシウム濃度が顕著に亢進して、受容体を介した情報系への何らかの抑制機構が発揮された結果を考えられる。このようなストレスに伴う細胞内情報伝達機能変化からみた研究成果をまとめると、ストレス適応破綻には細胞内カルシウム濃度亢進を起点に転写因子リン酸化を促進するプロテインキナーゼ系



の亢進が、適応には PP 系の活性化に由来する脱リン酸化を介した受容体-細胞内情報系の脱感作がそれぞれ関与していると考えられる。

昨年度までの研究成果と本年度新たに得た結果から、母子分離ストレスを経験して成長したストレス脆弱ラットは、成熟期ストレス負荷に伴う海馬 JNK2, GRP-94 発現の低下と ILGFBP-2, aquaporin-1 の発現減少がみられることが明らかとなった。特に新規環境への馴化に関与すると予想されるストレスによる JNK-2 発現減少のメカニズムを検討したところ、母子分離から形成されるストレス負荷時の高コルチコステロン状態が有意な減少に関連していることが明らかになった。

## E. 結論

本分担研究者らの初・2・3 年度の研究成果から、以下のことが明らかとなった。急性拘束ストレス負荷に伴って、AMPA-NMDA 受容体を介した細胞内カルシウム濃度亢進が引き起こされ、CaMKII, PP2A, PP2B の活性の亢進の引き起こされことが明らかにされた。同時にストレス負荷終了後に CREB リン酸化の低下が一過性にみられることや、AMPA-NMDA および  $\alpha 1$  アドレナリン受容体情報系の脱感作状態が引き起こされることから、ストレス負荷後には細胞外刺激に対する保護的機構が活性化していることも示唆された。

母子分離ストレスおよび成熟期急性拘束ストレスに伴う、海馬遺伝子発現の検討の結果から、ストレス脆弱群では JNK2, GRP-94, ILGFBP-2, aquaporin-1 遺伝子発現の低下のみられることが明らかとなった。JNK2 は細胞外刺激に対する適応の獲得に、重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子である。その一方で GRP-94, ILGFBP-2 は細胞ストレスに対して、細胞保護作用を発揮する遺伝子である。従ってこのような遺伝子の発現低下は、個体のストレス脆弱性に密接に関与していると思われる。

## 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) Tanaka K, Takahashi J, Morinobu S, Fujimaki K, Tsuji S, Kato K, Ohkawa M, Yamawaki S, Kato N: Imipramine, but not lithium, induces the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin without affecting its mRNA expression in the rat brain. *Psychopharmacol* 162: 339-344, 2002.
- 2) Tamura T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S: The effects of antidepressants drug treatments on activator

protein-1 binding activity in the rat brain. *Prog Neuro-psychopharmacol & Biol Psychiat* 26: 375-381, 2002.

- 3) Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Yamawaki S, Takahashi J, Tanaka K, Fujimaki K: Lithium and signal transduction. In *Catecholamine Research: molecular insights to clinical medicine*. ed. by Nabeshima T. *Academic Plenum Publishers*, pp 435-437, 2002.

### G-2. 学会発表

シンポジウム

- 1) Morinobu S: Stress vulnerability: Disturbance of CREB phosphorylation-dephosphorylation reactions. The XXIII CINP Congress (Montreal) 2002. 6.
- 2) 森信 繁: ストレス脆弱性形成に関与する遺伝子の検索、第 18 回日本ストレス学会、東京、2002 年 11 月。一般発表
- 1) Suenaga T, Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Sawada T, Kawano K and Yamawaki S: The influence of restraint stress on the activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in the rat hippocampus and frontal cortex. The XXIII CINP Congress (Montreal) 2002. 6.
- 2) Tsuji S, Morinobu S, Sawada T, Kawano K, Suenaga T, Okamoto Y, Yamawaki S, Nishida A: Stress Vulnerability in adult rats with neonatal isolation stress. The XXIII CINP (Montreal) 2002. 6.
- 3) 末永貴美 森信 繁 辻 誠一 川野樹一朗 澤田卓哉 山脇成人 「ラット脳内 Calcium/calmodulin dependent protein kinase II に対するストレスの影響」第 24 回日本生物学的精神医学会 (大宮) 2002 年 4 月。
- 4) 辻 誠一、森信 繁、澤田卓哉、福本拓治、末永貴美、川野樹一朗、山脇成人「母子分離ストレスを用いたストレス脆弱性に関与する遺伝子の研究-Microarray を用いて-」、第 24 回日本生物学的精神医学会 (大宮) 2002 年 4 月。
- 5) 川野樹一朗、辻 誠一、澤田卓哉、末永貴美、森信 繁、山脇成人「母子分離ストレスを用いたストレス脆弱性に関与する遺伝子の研究-マイクロアレイ法を用いて-」、第 24 回日本生物学的精神医学会 (大宮) 2002 年 4 月。
- 6) 末永貴美、森信 繁、辻 誠一、渡辺隆之、川野樹一朗、澤田卓哉、山脇成人 「ストレスによるラット脳内 Calcium/calmodulin dependent protein kinase II のリン酸化および発現量に関する検討」、第 32 回日本神経精神薬理学会年会 (前橋) 2002 年 10 月。
- 7) 森信 繁、澤田卓哉、辻 誠一、川野樹

一朗、末永貴美、山脇成人、西田 朗  
「老齡期うつ病の発祥機序に関する分子生  
物学的研究」、第 32 回日本神経精神  
薬理学会年会（前橋）2002 年 10 月。

**H. 知的財産の出願・登録状況**

該当事項なし。

ストレスの適応破綻に関する臨床的研究-Sensory gating system-

分担研究者 岡本泰昌 広島大学大学院医歯薬学総合研究科（精神神経医科学） 講師

## 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、様々な急性のストレスにより gating system の適応的变化が生じること、ストレス関連疾患ではこの変化がみられないことが明らかになった。また、ストレスの種類や快・不快といった刺激の種類によって反応する脳の laterality が異なることが推定された。

### A. 研究目的

Sensory gating system とは生体にとってあまり重要でない感覚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）脳の前注意的な情報処理過程である。この情報処理過程は電気生理学的には P50 suppression（gating out に対応）、mismatch negativity（MMN：gating in に対応）などの複数の事象関連電位によって構成されており、ストレスに対する適応機構として重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、一つめの検討としてストレスに対する適応機構としての sensory gating system に着目し、健常者およびうつ病患者において急性ストレス負荷の影響を検討した。次に、われわれはストレス事象の予測が、感覚入力に与える影響を検討するために、快・不快などの情動刺激を用いた予期的反応時間課題を行い、機能的磁気共鳴画像法（fMRI）を用いて課題遂行時の脳活動を検討した。さらに情動的ストレスとなる単語がいかなる場所で認知されるかを明らかにするために emotional decision 課題遂行時の脳活動を fMRI を用いて検討した。

### B. 研究方法

検討-1(健常者およびうつ病患者を対象とした急性物理的ストレスの Sensory gating system に及ぼす影響)

健常対照者 8 例及びうつ病患者 8 例を対象として寒冷刺激負荷前後に P50 suppression および MMN を 204 channel 脳磁計を用いて測定した。P50 suppression は 500 ms 間隔で提示される一対のクリック音（1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>）を 8 秒間隔で提示し、クリック音に対する反応の強度の比（2<sup>nd</sup> / 1<sup>st</sup> : t/c ratio）で評価した（t/c ratio が小さいほど gating out の能力が高い）。MMN は 500 ms 間隔で連続して提示される標準刺激の中に 20% の割合で逸脱刺激を提示し、逸脱刺激に対する加算波形から標準刺激に対する加算波形を引いた波形から MMN 反応を求めた。

検討-2(健常者を対象としたストレス予期の機能局在に関する fMRI を用いた検討)

健常者 15 名を対象に、1.5 T の MRI 装置（島津 Marconi 社製）を用い、予期的反応時間課題遂行時の fMRI を撮像した。課題は、二つ 1 組の刺激（予告刺激 S1 と標的刺激 S2）を一定の刺激間隔（4sec）でモニターに提示し、S2 後にボタン押し反応をさせた。S1 刺激として、○、△、□の幾何学図形を提示した（100msec）。S2 刺激として、異なる情動価（快/不快/中性；各 30 枚）を持つスライドを呈示

した（2sec）。被験者は、○-快、△-不快、□-中性のように S1-S2 の組み合わせを固定した条件（予期可能条件）と、S1-S2 の組み合わせがランダムな条件（予期不可能条件）を交互に行った。解析は SPM99 を用い、予期可能条件と予期不可能条件の時の脳活動領域を比較検討した。

検討-3(健常者を対象とした情動的ストレス単語の認知の機能局在に関する fMRI を用いた検討)

健常女性 12 名を対象に、検討 2 と同じ装置を用い、emotional decision 課題遂行時の fMRI を撮像した。課題は、3 語 1 組の負の身体イメージに関連した単語あるいは負の情動に関連した単語の中から最も不快な単語を選ぶ条件と、3 語 1 組の情動的負荷を持たない中性の単語の中から最も中性な単語を選ぶ条件を交互に 3 回ずつ、計 6 ブロック繰り返した。1 ブロック=30 秒間に 5 組の単語セットを呈示する。被験者は各単語セットに対してボタン押しにて解答した。解析は SPM99 を用い、負の身体イメージに関連した単語呈示時と中性の単語呈示時、負の情動に関連した単語呈示時と中性の単語呈示時の脳活動領域を比較検討した。課題終了後、各被験者は課題に使用した単語の主観的な不快さを点数評価した。

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. 研究成果

1. 健常者において cold pressor test は t/c ratio を増加させ、MMN 反応を増大させたのに対し、うつ病患者において t/c ratio は増加させたが、MMN 反応に対しては影響を与えなかった。

2. 予期可能条件では予期不可能条件と比較して、前頭前野の領域（内側前頭前野、下前頭前野、背外側前頭前野）で有意な活動上昇を認めた。また、不快刺激を予期する時に後頭部の活動上昇が認められた。快刺激を予期している時では、左背外側前頭前野、左内側前頭前野、右小脳の活動が認められた。一方で、不快刺激を予期している時では、右下前頭前野、右内側前頭前野、右扁桃核、左前帯状回、および両側の視覚野（左右後頭葉、右嗅部、左舌状回）の活動がみられた。

3. 中性の単語呈示時と比較して、負の身体イメージと負の情動に関連した単語呈示時には左海馬傍回が共通して賦活され、その活動は負の情動よりも負の身体イメージに関連した単語呈示時のほうが大きかった。負の身体イメージに関連した単語

では左海馬傍回に加えて右海馬傍回、左右中側頭回、視床も併せて賦活され、また負の情動に関連した単語では左右尾状核、左小脳、右紡錘回などが併せて賦活された。

#### D. 考察

検討1の結果から、急性の物理的ストレスは健常者の gating out を減少させ、gating in を増加させた。急性のストレス状況下では外界のすべての情報に対して注意を払うことは理に適っており、これらの反応は急性ストレスに対する正常な適応反応であると考えられる。うつ病患者における物理的ストレスに対する反応の低下は健常者に認められたストレスに対する正常な適応反応が低下した状態、すなわちストレスに対する不適応状態を有する可能性が示唆された。また、情動的ストレス、特に negative な情動刺激は P50 suppression の t/c ratio を増加させ、物理的ストレスだけでなく、情動的ストレスも sensory gating system に対して影響を与えうることが明らかとなった。

検討2の結果から、将来の情動刺激予期における前頭前野の役割が示唆された。また、左前頭前野の活動は快刺激の予期と関連し、一方で、右前頭前野の活動は不快刺激の予期と関連していることが示唆された。さらに、扁桃体および前帯状回が、不快刺激の予期に重要な役割を果たしており、視覚野におけるネガティブな情報の入力を調節していると考えられた。

検討3の結果から、不快な単語刺激の認知における左海馬傍回の役割が示唆された。また、この領域の活動の強さは刺激の主観的な不快さの程度ではなく、刺激の種類に応じて変化している可能性が示唆された。

#### E. 結論

今回の sensory gating system に関する所見は、うつ病を始めとするストレス関連疾患の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関する感覚入力を抑制している可能性もあり、ストレス事象に対する適応を考えていく上で興味深いものと考えられた。さらにストレスの種類や快・不快といった刺激の種類によって反応する脳の laterality が異なることが推定され、ストレスに関連した脳機能局在を考えていく上で重要な所見が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### G-1 論文発表

- 1) 山下英尚, 岡本泰昌, 岡田剛, 上田一貴, 森信繁, 山脇成人: 脳磁図(MEG)を用いたストレス適応破綻の脳内機構に関する研究。Sensory gating system に焦点を当てた検討。精神薬療研究年報 34号 Page273-278, 2002
- 2) 上田一貴, 岡本泰昌, 岡田剛, 山下英尚, 森信繁, 山脇成人: うつ病患者における前頭葉課題遂行中の脳機能評価-fMRI を用いて-。分子精神医学, 2002 2(3)83-84.
- 3) Ueda K, Okamoto Y, Okada G, Yamashita H, Hori T, Yamawaki S: Brain activity during

expectancy of emotional stimuli: An fMRI study. NeuroReport, 2003 14, 51-55.

- 4) Okada G, Okamoto Y, Morinobu S, Yamawaki S, Yokota N: Attenuated Left Prefrontal Activation during a Verbal Fluency Task in Patients with Depression. Neuropsychobiology (in press)
- 5) Okada G, Okamoto Y, Ueda K, Yamawaki S, Doya K: Selection between small, immediate rewards and large, delayed rewards in prediction of future reward: An fMRI Study (in submission)
- 6) Yamashita H, Okamoto Y, Morinobu S, Yamawaki S, Seppo Kahkonen: Visual emotional stimuli modulate auditory sensory gating studied by magnetic P50 suppression (in submission)

##### G-2 学会発表

- 1) Yamashita H, Okada G, Okamoto Y, Ueda K, Morinobu S, Yamawaki S: Modulation of P50 suppression by emotional visual stimuli. 2002 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Montreal Canada, June 23-27, 2002.
- 2) Kamiryo N, Okamoto Y, Okada G, Kurosaki M, Morinobu S, Yamawaki S: Emotional Color Stroop Including Negative Body Image and Negative Emotion Words: Functional MRI Study. 2002 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Montreal Canada, June 23-27, 2002.
- 3) Ueda K, Okamoto Y, Okada G, Yamashita H, Morinobu S, Hori T, Yamawaki S: Emotional expectancy and activation of the prefrontal cortex: A functional magnetic resonance imaging study. 2002 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Montreal Canada, June 23-27, 2002.
- 4) Okada G, Okamoto Y, Ueda K, Yamashita H, Morinobu S, Yamawaki S, Yokota N, Doya K: Brain Activity during Selection between Small, Immediate Rewards and Large, Delayed Rewards in prediction of future reward: A Functional Magnetic Resonance Imaging study. 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, Sendai JAPAN, June 2 - 6, 2002.
- 5) Ueda K, Okamoto Y, Okada G, Yamashita H, Morinobu S, Hori T, Yamawaki S: Expectancy of pleasant, unpleasant, and neutral visual stimuli: A Functional Magnetic Resonance Imaging study. 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, Sendai JAPAN, June 2 - 6, 2002.
- 6) Kamiryo N, Okamoto Y, Okada G, Kurosaki M, Morinobu S, Yamawaki S: Emotional stroop including body image and emotion words: fMRI study. WPA World Congress 2002, Yokohama Japan, August 25-30, 2002
- 7) Asahi S, Okamoto Y, Okada G, Morinobu S,