

分担研究報告書

ストレス脆弱性形成の分子機構の解明に関する研究

分担研究者 森信 繁 広島大学院医歯薬学総合研究科 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によって形成されるストレス脆弱性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初年度に引き続き本年度も、以下のような母子分離ストレスによって形成されるストレス脆弱モデルラットを用いて、脆弱性の分子メカニズムの解明を行った。1) 母子分離によって形成された成長後のラットにみられる拘束ストレス脆弱性は、海馬の拘束ストレス負荷に伴うIGFBP2, IGF1R発現の低下が密接に関与している。2) 母子分離によって不安行動や自発運動とは無関係に、成熟期の海馬を介した記憶・学習機能が低下し、良好な飼育環境の供与によって機能低下が緩和される。3) 母子分離によって形成された記憶・学習機能の低下の機序には、海馬でのIntegrin  $\beta 3$  (CD61)発現の低下の関与している可能性が明らかになった。

**A. 研究目的**

幼少時期のストレス体験、特に不遇な養育環境は成人期においてストレス関連精神障害の発症リスクを高めることが示唆されている。同様に母子分離負荷を受けて成長したラットは、成熟期にストレスの影響を受けやすくストレス脆弱性の形成されていることが行動学的・神経内分泌学的に明らかにされ、ヒト成人期ストレス脆弱性のモデルとみなされている。これまでに本研究者らは、母子分離負荷ラットが成熟期に拘束ストレスに曝露されると自発運動の顕著な減少を伴ったストレス脆弱性を示し、c-Jun N-terminal kinase-2, 94 kDa glucose-regulated protein の発現が海馬で減少することを明らかにしてきた。その一方で、良好な飼育環境は母子分離による有害な影響を緩和することが報告されている。昨年度に引き続き本年度も、以下の研究を継続して行った。1) 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明、2) 母子分離による記憶・学習障害の分子機序の解明。

**B. 方法**

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。

**B-1. 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明：**

ストレスパラダイム：妊娠ラットを購入し、出産後の雄性仔ラットを用いた。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正常飼育群とした。それぞれのラットが成長した後(生後 6 週と生後 90 日)、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。

Real-time quantitative PCR 法：生後 6 週で摘出したラットの海馬を用いた。Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R), IGF2R、IGF Binding Protein (IGFBP) 2 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 ソフトウェアで各遺伝子の定量を行った。

Western blot 法：生後 90 日で摘出したラットの海馬を用いた。海馬を

homogenization buffer 中でホモジェナイズし、1000 g で 10 分間遠心後、上清を回収した。60  $\mu$ g のタンパクを 7.5% SDS ゲルを用いて電気泳動し、PVDF メンブレンに転写した。IGF1R の 1 次抗体および 2 次抗体でインキュベーション後に、比色定量法によりバンドを検出し、デンストメーターを用いてシグナルの定量を行った。正常飼育 + 母子分離群、母子分離 + 急性拘束ストレス群で比較検討を行った。

## B-2. 母子分離による記憶・学習障害の分子機序の解明：

動物処置：妊娠ラットを購入し、出産後の雄性仔ラットを用いた。生後 2 日から 22 日目までの 21 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、誕生後通常的环境下で養育したものを非母子分離群とした。母子分離後もしくは通常の養育後に良好な环境下で飼育した群では、離乳後にケージ内に様々な玩具を設置して、自由に遊べる環境を作成した。

恐怖条件付けパラダイム：上記 4 群（非母子分離群、母子分離群、通常養育 + 良好な環境群、母子分離 + 良好な環境群）が成長後、生後 42~45 日の 4 日間で恐怖条件付けパラダイムを行った。ラットを実験用チャンバーに移し、3 分間の観察期間の後、2.8Hz、120db、20 秒の音刺激を行った。音刺激後再び 2 分間の観察期間を設け、最後に 0.8mA、4 秒の foot shock を行った。このパラダイムを 1 日 1 回連日 4 日間行い、行動の評価は一連のセッションをビデオテープに記録し、2 人の評価者によって測定した。

新規環境での自発運動量測定パラダイム：上記 4 群が 6 週齢に成長した後、メルクエスト社の Scanet MV-10 にて、新規環境曝露後最初の 5 分間の自発運動量測定を行った。高架式十字迷路：上記 4 群が 6 週齢に成長した後、恐怖条件付け実験曝露前および実験 3 日間曝露後での高架式十字迷路における 5 分間の自発運動中のオープンアーム滞在時間測定を行った。

抗体マイクロアレイ法：非母子分離群、母子分離群について、上記恐怖条件付けパラダイムの 3 日目に 3 分間の実験チャンバーへの曝露（観察期間）の直後に断頭、海馬

を抽出した。非母子分離群、母子分離群、それぞれ 6 匹のラット片側海馬をホモジェナイズしトータルタンパク質を抽出した。2 群から得られたトータルタンパク質をそれぞれ半分に分け、各々 Cy5 または Cy3 で標識し、4 種類のサンプルを調製した。タンパク質の標識後、未結合色素をクロマトグラフィー（ゲル濾過）で除去し、標識タンパク質を Antibody Microarray と共に 30 分間インキュベートした。その後、Microarray を洗浄、乾燥した後、スキャンし、結合した抗原を測定した。

Western blot 法：ラット海馬内 Intergrin  $\beta$ 3 および ApoE 蛋白発現量の測定は Western blot 法にて行った。抗体アレイの再現性をみるために、非母子分離群・母子分離群において恐怖条件付け実験 3 日目曝露後、すくみ行動に有意差を認めていない恐怖条件付け実験 4 日目曝露後、タンパク質発現に対する母子分離および恐怖条件付け実験の影響を評価するため実験曝露前の 3 つの時点で測定を行った。その後、母子分離により減弱したインテグリン  $\beta$ 3 発現に対する良好な飼育環境の影響を調べるため、恐怖条件付け実験曝露前の非母子分離群、母子分離群、非母子分離 + 良好な飼育環境群、母子分離 + 良好な飼育環境群の 4 群におけるインテグリン  $\beta$ 3 の発現を検討した。サンプルをホモジネートし得られたタンパク質 40  $\mu$ g を、Tris - glycine SDS-PAGE (ApoE : 10%、Intergrin  $\beta$ 3 : 7.5%)を用いて電気泳動した。電気泳動後、蛋白質を PVDF メンブレンに転写し各々一次抗体および二次抗体で免疫反応を行った。Blot は比色定量法により検出し、各物質に該当するバンドの濃淡をデンストメータで計測した。

免疫組織染色法：ラット海馬 Intergrin  $\beta$ 3 タンパク質発現の部位変動を検討する目的で免疫組織染色を行った。非母子分離群、母子分離群について、上記恐怖条件付けパラダイムの 3 日目に 3 分間の実験チャンバーへの曝露（観察期間）の直後に断頭、海馬を抽出し、海馬スライス (15  $\mu$ m) の脳切片を作成して、Western blot 法と同様に一次抗体・二次抗体とハイブリダイゼーション後、anti-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。

## C. 研究成果

### C-1. 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明：

6週齢ラット海馬における IGF 情報系関連遺伝子の発現について real-time quantitative PCR 法を用いて検討した。成熟期と同様に IGFBP2、IGF1R の発現が母子分離+成熟期急性拘束ストレス群で通常飼育+成熟期急性拘束ストレス群に比して有意に減少していた。IGF2R の発現に有意差は認められなかった。また、IGFBP2、IGF1R の発現は非ストレス負荷時においても母子分離群では、正常飼育群に比して有意に減少していた。

成熟期ラット海馬における IGF1R タンパク発現について Western blot 法を用いて検討した。Real-time quantitative PCR 法での結果と同様に、正常飼育+急性拘束ストレス群と比較して母子分離+急性拘束ストレス群では、IGF1R 発現に有意に低下を見た。

### C-2. 母子分離による記憶・学習障害の分子機序の解明：

恐怖条件付けパラダイム：実験 2・3 日目では母子分離群で、非母子分離群・母子分離+良好な環境群・通常飼育+良好な環境群と比較して contextual freezing 時間は有意に減少していた。実験 4 日目では 4 群間に、有意な contextual freezing 時間の差を認めなかった。

新規環境での自発運動量測定パラダイム：新規環境曝露後最初の 5 分間の自発運動量において、4 群間で有意差を認めなかった。高架式十字迷路：恐怖条件付け実験曝露前および実験 3 日間曝露後でのオープンアーム滞在時間において、4 群間で有意差を認めなかった。

抗体マイクロアレイ法：母子分離群の海馬で非母子分離群と比較して、Arginase I、Bog、ZBP-89、Intergrin  $\beta 3$ 、ApoE のタンパク質の発現が顕著に低下していた。

Western blot 法：ApoE の発現は非母子分離群・母子分離群間で有意差がなく、抗体アレイの結果と一致しなかった。一方、Intergrin  $\beta 3$  の発現は母子分離群において非母子分離群と比べて有意に減少しており、

抗体アレイの結果と一致した ( $n = 12, P < 0.05$ )。実験 4 日目における Intergrin  $\beta 3$  の発現は、3 日目同様 母子分離群において有意に減少しており ( $n = 12, P < 0.05$ )、contextual freezing の改善に伴った発現の改善は得られなかった。恐怖条件付け曝露前の Intergrin  $\beta 3$  の発現は、実験 3・4 日目同様に母子分離群において有意に減少していた ( $n = 12, P < 0.05$ )。また、母子分離群+良好な飼育環境群でのインテグリン  $\beta 3$  の発現は、非母子分離群に比べ有意に低下していた ( $n = 12, P < 0.05$ )。

免疫組織染色法：母子分離群において、非母子分離群に比べ CA1 および CA3 錐体細胞層において Intergrin  $\beta 3$  の発現は有意に低下していたが、歯状回顆粒細胞層での発現には影響しなかった。

## D. 考察

### D-1. 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明：

昨年度の研究で、正常飼育+成熟期急性拘束ストレス群に比べて母子分離+成熟期急性拘束ストレス群では、海馬での IGF1R、IGF2R mRNA 発現が有意に減少していることをマイクロアレイ法・real-time PCR 法を用いて明らかにした。本年度の実験結果からは、ラット海馬において生後早期の母子分離ストレスにより若年期・成熟期の両時点において、ストレス負荷に伴う IGF1R、IGFBP2 の発現が障害されることが明らかとなった。同時に若年期では急性拘束ストレス非負荷時においても、母子分離ストレスにより IGF1R、IGFBP2 遺伝子の発現が低下していた。このような一連の実験結果は、生後早期の母子分離ストレスによる海馬 IGF1R、IGFBP2 発現低下による IGF 情報系の機能障害は、生後早期からすでに発生して成長後も継続することを示している。IGF 情報系は神経細胞の分化・増殖を促進する作用やアポトーシス抑制作用を有しており、脳の損傷に対して保護的に作用すると予想される。またストレスにより海馬神経細胞が障害され、神経細胞新生が抑制されることが明らかとなっており、母子分離によって IGF 情報系の機能が減弱していると、成長後のストレス負荷により海馬機能が障害されやすい可能性があると思われる。今後

は、組織学的レベルで IGF 情報系の発現の変化について検討する予定である。

#### D-2. 母子分離による記憶・学習障害の分子機序の解明：

行動学実験から、自発運動や不安に影響を与えることなく母子分離により contextual freezing 時間が減少すること、良好な環境での飼育が母子分離による contextual freezing 時間の減少を緩和していることが示された。これらの結果から、母子分離は海馬依存性の空間記憶に属する contextual freezing が減弱し、良好な飼育環境はこの減弱を緩和することが示唆された。

抗体アレイおよびウエスタンブロット法による検討において、母子分離群でのインテグリンβ3 の発現が非母子分離群に比べ有意に減少していることが示され、海馬におけるインテグリンβ3 の発現の低下が母子分離による海馬依存性記憶の障害を引き起こしている可能性が示唆された。一方、母子分離によるインテグリンβ3 の減少は良好な飼育環境によっても回復しなかった。加えて、非母子分離群と母子分離群間での海馬依存性記憶に差を認めていない恐怖条件付け実験 4 日目でも、インテグリンβ3 は母子分離群で減少したままであった。以上の検討の結果から、良好な環境での飼育および恐怖条件付け実験 4 日目に認めた母子分離による機能障害の回復機構は、インテグリンβ3 ファミリーとは異なる代償的な経路を介したものであると推察された。

#### E. 結論

母子分離により形成される成長後の拘束ストレス脆弱モデルラットの海馬では、若年期・成熟期でのストレス負荷時に IGF1R, IGF2 mRNA 発現の減少がみられ、IGF 情報系の機能低下が予想された。同時に若年期ではストレス非負荷時の IGF1R, IGF2 mRNA 発現の減少がみられたことから、母子分離には若年期まで持続する IGF 機能低下を引き起こす可能性が示唆された。IGF 情報系の機能低下は、海馬機能の障害に伴うストレス脆弱性の発現機序に関与している可能性がある。

母子分離により形成される成長後の海馬依存性記憶の障害には、海馬インテグリン

β3 発現の減弱が密接に関与していることが示された。同時に母子分離後の良好な環境によって海馬依存性記憶の障害は修復されるが、この修復の分子機序にはインテグリンβ3 は関与していないこともわかった。

#### G. 研究発表

##### G-1. 論文発表

- 1) Suenaga,T., Morinobu,S., Kawano,K., Sawada,T., Yamawaki,S.: Influence of immobilization stress on the levels of CaMKII and phospho-CaMKII in the rat hippocampus. Int J Neuropsychopharmacol, 7: 299-309, 2004.
- 2) Sawada,T., Morinobu,S., Tsuji,S., Kawano,K., Watanabe,T., Sienea,T., Takahashi,S., Yamawaki,S., Nishida,A.: Reduction in levels of amphiphysin 1 mRNA in the hippocampus of aged rats subjected to repeated variable stress. Neuroscience, 126: 461-466, 2004.
- 3) Kusaka,K., Morinobu,S., Kawano,K., Yamawaki,S.: Effect of neonatal isolation on the noradrenergic transduction system in the rat hippocampal slice. Synapse, 54: 223-232, 2004.
- 4) Kurata,K., Takebayashi,M., Morinobu,S., Yamawaki,S.: b-Estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. J Pharmacol Exp Ther, 311:237-245, 2004.
- 5) Morinobu,S., Kawano,K., Yamawaki,S.: Lithium and protein phosphatases: apoptosis or neurogenesis? Clin Neurosci Res, 4: 263-269, 2004.
- 6) 高橋 淳, 森信 繁: 抗不安薬一選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI) - 医薬ジャーナル 40 巻増刊号 308-311, 2004.
- 7) 加賀谷有行, 森信 繁, 福本拓治, 末永貴美, 田中和秀, 山脇成人: 双極性障害の細胞内情報伝達系の異常. 精神科 4: 292-298, 2004.
- 8) 森信 繁: ストレス脆弱性の脳内分子

機構. 医学のあゆみ (印刷中)

## G-2. 学会発表

(シンポジウム)

- 1) Morinobu,S.: Neonatal isolation and adulthood stress vulnerability. 24th Meeting of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Paris, June, 2004.
- 2) Morinobu,S.: Neonatal isolation, gene expression, and stress vulnerability. 2004 World Federation of Societies of Biological Psychiatry, Asian-Pacific Congress, Seoul, July, 2004.
- 3) Morinobu,S.: Stress Vulnerability induced by neonatal isolation. International PTSD Symposium, Kyoto, Japan, February 2005.
- 4) 撰 香織, 森信繁, 辻 誠一, 川野樹一朗, 高橋輝道, 岩本泰行, 末永貴美, 山脇成人: 母子分離ストレスによるストレス脆弱性形成に関する海馬 IGF 情報系関連遺伝子の発現、第26回日本生物学的精神医学会、2004/7 (東京)
- 5) 高橋輝道, 森信繁, 岩本泰行, 撰 香織, 山脇成人: 母子分離ストレスが成長後の学習性無力行動に及ぼす影響、第26回日本生物学的精神医学会、2004/7 (東京)
- 6) 岩本泰行, 森信繁, 高橋輝道, 撰 香織, 山脇成人: 母子分離(NI)ラットにおける Environmental Enrichment(EE)の影響—学習性無力モデル(LH)を用いた検討、第26回日本生物学的精神医学会、2004/7 (東京)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究者報告書

ラット海馬神経新生とうつ病の病態との関連について

分担研究者 神庭重信 九州大学大学院医学研究院 教授

**研究要旨** 我々は、うつ病の病態解明に迫るべく、そのモデルとして、うつ病を誘発することで知られるサイトカイン interferon (hIFN- $\alpha$ ) 投与動物の脳内病態を調べた。hIFN- $\alpha$  によるラット海馬神経新生が抑制された。さらにその機序を調べたところ、hIFN- $\alpha$  投与により、アストログリアを介した IL-1 $\beta$  産生反応が誘発され、神経新生が減少することが推定された。これらのことから、抗うつ薬の機序からのみ推定されていた、うつ病の病態として、海馬神経新生の抑制が関与している可能性が裏付けられた。

**A. 研究目的**

海馬歯状回(DG)では成長後も神経幹細胞の増殖・分化による神経新生が持続している。この現象が記憶・学習などの脳高次機能や各種ストレスに関連して亢進・抑制することが知られており、また抗うつ薬は DG の神経新生を促進することが報告されている。我々は human interferon- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ ) 投与動物で、DG における神経新生の抑制との関連を調べた。

**B. 研究方法**

hIFN- $\alpha$  (5000IU/kg, 20000IU/kg, 50000IU/kg) 又は vehicle を 7 日間連日経静脈投与し、最終投与 24 時間前に BrdU で DNA 合成している細胞をラベルしたラットを還流固定して脳を取り出し、クリオスタット薄切して free-floating section を作成した。この切片について BrdU 免疫組織染色を行い、海馬歯状回の BrdU 陽性細胞を光学顕微鏡下でカウントした。同時に血中コルチコステロンを測定し、HPA axis との関連を見た。更にこの切片について IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  免疫組織染色を行い、脳の各部位における陽性領域の面積比を測定してサイトカイン誘導を解析した。IL-1 $\beta$  はウェスタンで定量化した。IL-1RA の前処置により、hIFN- $\alpha$  の BrdU 陽性細胞数の減少は抑制された。

**C. 研究成果**

1) DG の BrdU 陽性細胞数は、hIFN- $\alpha$  投与群すべてにおいてコントロール群に対し有意に減少しており、また hIFN- $\alpha$  投与量と正の相関を認めた。

2) hIFN- $\alpha$  投与量・BrdU 陽性細胞数と血中コルチコステロン値には関連は認められなかった。

3) IL-1 $\beta$  陽性領域については、海馬でのみ低用量(5000IU/kg)IFN- $\alpha$  群でも有意な増加を認め、TNF- $\alpha$  陽性領域は、海馬・皮質・視床下部の全部位で最高用量群(50000IU/kg)のみ有意な増加を認めた。4) IL-1RA の前処置で hIFN- $\alpha$  による BrdU 陽性細胞の減少が抑制された。

5) 人参のサポニン成分である ginseng には海馬神経新生を促進する作用があることを見いだした。

**D. 考察**

hIFN- $\alpha$  投与でヒトでは高率にうつ病を発症し、ラットでは強制水泳試験における無動時間が延長する。すなわち、hIFN- $\alpha$  投与ラットの脳病態を詳しく調べることで、うつ病の病態に迫れる可能性がある。

今回我々は hIFN- $\alpha$  によって DG の BrdU 陽性細胞数が減少することを示した。神経幹細胞の存在が抗うつ薬の作用機序に関与していることが示され、神経新生とストレス脆弱性の関連が示唆されており、本研究で示されたように、うつ病惹起物質で神経新生が減少することから、海馬の神経新生の以上がうつ病の病態と関連している可能性が高い。

さらに今回の研究結果は、海馬が他の部位と比較して IL-1 産生刺激に対して感受性が高いことを示している。また IL-1 投与による行動異常や学習障害の報告の多いことから、DG

における IL-1 産生を介する神経新生の減少が関与している可能性が高いと結論される。

また、ginseng は海馬神経新生を促進することから、抗うつ作用を表す可能性が示唆される。

#### E. 結論

hIFN- $\alpha$  投与により、海馬歯状回でアストログリアを介した IL-1 $\beta$  産生反応が誘発され、海馬神経新生が減少する。hIFN- $\alpha$  の中枢作用機序の一端が明らかにされた。このことから、うつ病の病態解明に有用な知見が得られた。

#### G. 研究発表

##### G-1. 論文発表

Qiao, C-X, Den, R., Kudo, K., Yamada, K., Takemoto, K., Wati, H., Kanba, S.: Ginseng enhances contextual fear conditioning and neurogenesis in rats. *Neuroscience Research* 51: 31-38, 2005.

##### G-2. 学会発表

Kaneko N., Kudo K., Mabuchi T., Takemoto K., Wati H., Iguchi H., Fujimaki K., Kanba S.: Role of neurogenesis in human interferon-alpha induced animal model of depression. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, Oct., 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

ストレス脆弱性形成の分子機構解の解明に関する研究

分担研究者 井ノ口 馨 三菱化学生命科学研究所 主任研究員

**研究要旨** 性的成熟期前後の脳海馬の神経新生を薬理的あるいは遺伝子操作的に抑制したラット・マウスは、成熟した後にある種の精神疾患に対応する行動異常を示した。この結果は、生後脳神経新生と精神疾患発症の相関を示唆している。

**A. 研究目的**

A-1. 性的成熟期における神経新生阻害が、大人になってからの行動異常を引き起こす可能性を検討した。

A-2. 成熟脳のシナプス可塑性に重要な役割を果たしているアクチビンが、神経新生やストレス脆弱性に関与している可能性を検討した。

**B. 研究方法**

B-1. 細胞増殖阻害剤（methylazoxymethanol acetate, MAM）を性的に未成熟な 4.5 週齢のラットに一過的に投与した。このラットを 10-11 週齢まで加齢させ、性的に成熟した時点で一般的活動性テスト・明暗選択テスト・prepulse inhibition を行った。また、このラットの神経新生を解析した。

B-2. アクチビンの特異的阻害タンパク質であるフォリスタチンを生後 3 週齢以降に前脳特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス（FSM）を作製した。FSM の行動および脳の神経新生を解析した。

**C. 研究結果**

C-1. 一般的活動性および明暗選択テストにおいては MAM 投与ラットと saline 投与ラットの間有意差はなかったが、prepulse inhibition テストでは、MAM を投与したラットにおいてマイルドな障害がみられた。また、4.5 週齢で MAM が投与されたラット海馬の神経新生を解析したところ、MAM 投与期間の直後では海馬歯状回の神経新生能が低下していたが、5 週間経過した性的成熟後では神経新

生能が回復していることが明らかとなった。すなわち、10 週齢をすぎたラットの海馬では正常な神経新生能を回復しているにもかかわらず、PPI の低下を示していた。

C-2. 5 週齢の FSM マウスの海馬歯状回において、分裂した細胞のニューロンへの分化能が低下していた。また、FSM マウスは性的成熟後の PPI 低下や一般活動性の低下、不安感の増加などの行動異常を示した。

**D. 考察**

D-1. MAM 実験の結果は、性的成熟期の神経新生の異常がストレス脆弱性の形成に関与している可能性を示している。

D-2. FSM マウスの解析結果は、アクチビン遺伝子の機能低下が生後脳の神経新生や大人になってからの行動異常を引き起こす可能性を示唆している。

**E. 結論**

以上の研究結果は、性的成熟期前後における神経新生の異常が大人になってからの精神疾患に対応する行動異常に関与している可能性を示している。

**G. 研究発表**

**G-1. 論文発表**

1) Inoue, Y., Honkura, N., Kato, A., Ogawa, S., Udo, H., Inokuchi, K. and Sugiyama, H. Activity-inducible protein Homer1a/Vesl-1S promotes redistribution of postsynaptic protein Homer1c/Vesl-1L in cultured rat



- hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, 354, 143-147 (2004).
- 2) Ehrenguber, M., Kato, A., Inokuchi, K., Hennou, S. Homer/Vesl proteins and their roles in CNS neurons. *Mol. Neurobiol.*, 29, 213-228 (2004).
  - 3) Inaba, Y., Tian, Q.B., Okano, A., Zhang, J., Sakagami, H., Miyazawa, S., Li, W., Komiyama, A., Inokuchi, K., Kondo, H. and Suzuki, T. Brain-specific novel guanine nucleotide exchange factor for Arf, synArfGEF, is localized to postsynaptic density. *J. Neurochem.*, 89, 1347-1357 (2004).
  - 4) Sugiyama, K., Niki, T., Inokuchi, K., Teranishi, Y., Ueda, M. and Tanaka, A. Hetrologous expression of metabotropic glutamate receptor subtype 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 64, 531-536 (2004).
  - 5) Inoue, K., Fukazawa, Y., Ogura, A. and Inokuchi, K. Two-dimensional neural activity mapping of the entire population of hippocampal CA1 pyramidal cells responding to fear conditioning. *Neurosci. Res.*, 51, 417-425 (2005).
  - 6) 井ノ口馨、斎藤喜人、スパインアクチンの動態とシナプス形態の可塑性、蛋白質核酸 酵素、49, 282-286, 2004
- Activin is involved in anxiety-related brain function The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, October, 2004.
- 4) Y. Shoji-Kasai, H. Ageta, Y. Hasegawa, K. Hirai, K. Tsuchida, H. Sugino, F. Ozawa and K. Inokuchi. Activin, a TGF-b superfamily protein, modulates dendritic spine morphology. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, October, 2004.
  - 5) Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Inokuchi, K., Molor, E., Shigemoto, R. Quantitative analysis of AMPA receptors after LTP induction in the dentate gyrus in vivo. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, October, 2004.
  - 6) Sakagami, Y., Yamamoto, K., Sugiura, S., Inokuchi, K., Hayashi, T., Kato, N. Reduction of pyramidal cell excitability by Homer-1a/Vesl-1S injection or by electroconvulsive shock (ECS) that is presumed to induce Homer-1a/Vesl-1S. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, October, 2004.
  - 7) Yamamoto, K., Sakagami, Y., Sugiura, S., Inokuchi, K., Shimohama, S., Kato, N. Homer-1a enhances action potential-induced calcium entry through L-type calcium channels and decreases threshold for evoking calcium spikes. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, October, 2004.
  - 8) Tanaka, M., Marunouchi, T., Inokuchi, K., Koulen, P. Vesl/Homer proteins modulate functions of intracellular calcium channels. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, October, 2004.
  - 9) K. Inokuchi. Alternative poly(A) site selection confers neural activity-dependent regulation of RNA splicing of vesl-1/homer-1. Symposium of the 27th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Osaka, September, 2004.
  - 10) Y.Shoji-Kasai, S. Ikegami, K. Inokuchi.
- G-2. 学会発表
- 1) Inokuchi, K. Spine actin remodeling and LTP maintenance. The first International Symposium on "Formation, maintenance, and remodeling of CNS synapses", Tokyo Medical and dental University 21<sup>st</sup> Century Program, Tokyo, August, 2004.
  - 2) N. Ohkawa, K. Fujitani, R. Migishima, T. Hino, M. Takabe, M. Yokoyama, K. Inokuchi. Stathmin regulates dendritic microtubule stability of Purkinje cells that might be important for the olivocerebellar synapse elimination during cerebellar development. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, October, 2004.
  - 3) H. Ageta, R. Migishima, S. Kida, K. Tsuchida, M. Yokoyama, K. Inokuchi.

- Activin, a TGF- $\beta$  superfamily protein, regulates maintenance of hippocampal LTP through modulating the dendritic spine morphology. Symposium of the 27th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Osaka, September, 2004.
- 11) Osumi, N., Maekawa, M., Takashima, N., Ikegami, S., and Inokuchi, K. A potential link between impaired neurogenesis and behavior abnormalities. Symposium of the 27th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Osaka, September, 2004.
  - 12) 岡田大助、小澤史子、井ノ口馨、PGK は Ves1-1S-EGFP 融合タンパク質の樹状突起スパインへの取り込みを制御する、Neuro 2004, 第27回日本神経科学大会、大阪、9月、2004.
  - 13) 新堀洋介、井ノ口馨、ves1-1 mRNA polyadenylation は細胞外刺激により制御される、Neuro 2004, 第27回日本神経科学大会、大阪、9月、2004.
  - 14) 上田洋司、右島理可、茂手木淑子、日野俊昭、高部美穂、喜田聡、杉野弘、土田邦博、横山峯介、井ノ口馨、不安情動行動におけるアクチビンの役割、Neuro 2004, 第27回日本神経科学大会、大阪、9月、2004.
  - 15) 大川宜昭、右島理可、日野俊昭、高部美穂、横山峯介、井ノ口馨、Stathmin によるプルキンエ細胞樹状突起内微少管の制御と登上線維・プルキンエ細胞 間シナプス除去への関与の可能性、Neuro 2004, 第27回日本神経科学大会、大阪、9月、2004.
  - 16) 深澤有吾、斎藤喜人、井ノ口馨、E. Molnar, 重本隆一、凍結切断レプリカ標識法による海馬歯状回 LTP 誘導後の AMPA 型グルタミン酸受容体の定量的解析、Neuro 2004, 第27回日本神経科学大会、大阪、9月、2004.
  - 17) 阪上優、山本兼司、杉浦重樹、井ノ口馨、林拓二、加藤伸郎、治療的電撃けいれん (ECS) は Homer 1a 発現を介して新皮質錐体細胞を過分極させる、Neuro 2004, 第27回日本神経科学大会、大阪、9月、2004.
  - 18) 山本兼司、阪上優、下浜俊、杉浦重樹、

井ノ口馨、加藤伸郎、Homer 1a/Ves1-1S は L 型チャンネルを通るスパイク誘発性カルシウム流入を増強する、Neuro 2004, 第27回日本神経科学大会、大阪、9月、2004.

- 19) 井ノ口馨、アクチビンによるスパイン形態とナプス可塑性の制御、生理学研究所研究会「神経回路の機能の成り立ちに関する学際的研究」、岡崎、12月、2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

ストレス暴露による神経形態変化の分子機構に関する研究

分担研究者 尾藤晴彦 東京大学大学院医学系研究科 助教授

**研究要旨** ストレス暴露時において興奮性神経細胞の樹状突起スパイン形態変化に関与する分子機構について探索するため、カルシウム上昇とアクチン動態の同時可視化を進めた。興奮性神経細胞のスパイン形態を制御する候補分子として、新たに、カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼCLICK-III/ CaMKI $\gamma$ 、ならびにPSD-95を同定した。

**A. 研究目的**

分担研究者らは、培養海馬錐体細胞系を用い、興奮性神経細胞のアクチン細胞骨格がNMDA受容体刺激により、スパイン特異的に再編成することを初めて可視化した。一方、ストレス暴露時の過剰神経活動後にはスパイン形態に異変が起こることがすでに示されていることから、本研究では、ストレス暴露様シナプス活動後のスパイン形態変化に関与するシグナル経路の同定に力を注ぐ。

特に、1)海馬興奮性神経細胞における活動依存的アクチン再編成の分子機構の解明、ならび2)興奮性神経細胞におけるアクチン制御分子の探索を行う。

**B. 方法**

**B-1. 活動依存的アクチン再編成の分子機構の解明**

本年度は、種々のカルシウム依存性蛍光プローブを開発した。海馬スライス培養系に遺伝子銃等を用いた遺伝子導入法により、mRFP-actinを海馬錐体細胞に共発現させ、神経刺激下でのカルシウム上昇とアクチン細胞骨格再編成をスパインで同時に可視化するシステムを構築中である。

**B-2. 興奮性神経細胞におけるアクチン制御分子の探索**

興奮性神経細胞のアクチン細胞骨格制御機構を明らかにするため、1)スパインに局在化するアクチン制御機構の探索、2)低分子量G蛋白を活性化するカルシウム依存

性経路の同定を試みた。

（倫理面への配慮）

DNA組換え実験ならびに動物実験に関しては、東京大学医学部の該当の委員会に申請を行い、認められたプロトコールに基づいて実験を行った。

**C. 研究成果**

本年度の実験により、スライス培養系において、グルタミン酸の単一シナプス投与と連動した局所カルシウム上昇が可能となり、これと連携して、局所アクチン細胞骨格再編成を共可視化するための課題がほぼ解決されつつある(Fujii et al., unpublished data)。これに平行し、GFP-actin imagingを個体レベルで行う試みを継続している。

スパインに局在化するシナプス後肥厚部(PSD)分子のアクチン制御能を探索する過程で、PSDに局在するPSD-95にスパイン形態制御能があることを突き止めた(Nonaka et al., submitted)

前年度に単離した新規CaMキナーゼCLICK-IIIが、カルシウム-アクチンカップリングに関与するかをPC-12細胞で検証したところ、低分子量G蛋白質の上流に位置し、活動依存的に突起新生を正に制御する活性を有していることを明らかにした(Ishihara et al., in preparation)。本キナーゼのノックアウトマウス作成は、キメラ産生まで成功しており、今後ヘテロマウス、ホモマウスの産出を予定している(Takemoto-Kimura et al., unpublished data)。

## D. 考察

本研究は、ストレス脆弱の分子機構の一端を担う、シナプス近傍のアクチン細胞骨格再編成の基盤を明らかにすることを大きな目標の一つとしている。

近年の研究により、ストレス脆弱性の最も高い脳部位である海馬において、ストレス暴露時において樹状突起スパインの著しい形態変化が生じることが報告された。我々は、培養初代神経細胞を用い、その一部を再現し、刺激中のアクチン動態を可視化できる *in vitro* 実験系を確立した (Furuyashiki et al., PNAS 2002)。昨年度、今年度と続けて、この実験系をさらに改良し、現在、神経回路網や個体レベルでの実験を可能にする一歩手前までたどり着いてきた。また今年度は、シナプス近傍アクチンを動員する候補分子として、1) カルシウム依存的キナーゼ CLICK-III/CaMKI $\gamma$  (Takemoto-Kimura et al., JBC, 2003)、2) 並びにシナプス局在分子 PSD-95 (Nonaka et al., 投稿中) を同定した。各々について、特異的活性化機構により神経細胞局所の形態を変化させる機能が明らかになった。今後、RNAi などの新技術を導入し、これら分子のストレス時における役割を明らかにしていく所存である。

## E. 結論

活動依存的アクチン集積のストレス暴露時における役割を明らかにするための実験系を完成させ、さらに具体的な興奮性神経細胞において、カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ CLICK-III/ CaMKI $\gamma$  や PSD-95 による神経形態制御の実態を初めて解明した。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

- 1) Nemoto T, Kojima T, Oshima A, Bito H, Kasai H.: Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J. Biol. Chem.*, 279: 37544-37550, 2004.
- 2) 奥野浩行, 竹本-木村さやか, 大前彰吾, 岡村理子, 石原奈津実, 尾藤晴彦, : シナプス活動による遺伝子発現

制御 蛋白質核酸酵素 49: 411-418, 2004. (蛋白質核酸酵素 増刊号)

- 3) 尾藤晴彦: ROCK インヒビター: 神経再生ならびに神経変性防止におけるあらたな創薬標的 医学のあゆみ 208: 469-473, 2004

### G-2. 学会発表

- 1) Nonaka M., Tanaka A, Doi T, Fujiyoshi Y, Takemoto-Kimura S, Bito H: The ligand dependent synaptic clustering of PSD-95 and its role in neuronal function. *Neurochem. Res.* 29: ,1598, 2004. (2004年神経化学会)
- 2) Bito H, Arakawa Y, Narumiya S.: Control of axon formation and outgrowth by Rho signaling. *J. Pharmacol. Sci.* 92: in press, 2004. 大阪. シンポジウム発表.
- 3) Bito H, Takemoto-Kimura S, Okuno H.: Analysis of synaptic activity-induced changes in neuronal properties using imaging techniques. *Jpn.J.Physiol.* 54 Suppl. S16, S08-3, 2004. 第81回日本生理学会大会 (札幌)、6.2-4, 2004. シンポジウム発表.
- 4) 尾藤晴彦: シナプス活動によるアクチンダイナミクスの制御 2004 未来いせんい展イベント展シンポジウム要旨集 pp.205-208, 2004 (7.13-14, 2004 東京) シンポジウム発表.
- 5) Bito H, Furuyashiki T, Takemoto-Kimura S, Ishihara N, Fujii H, Okamura M, Okuno H.: Activity-driven changes in neuronal actin cytoskeleton. *Neurosci. Res.* 50 Suppl., S8, SY03, 2004. 2004年神経科学学会シンポジウム発表.
- 6) Okuno H, Chowdhury S, Worley P, Bito H: Interaction between Arc and CaMKII monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Neurosci. Res.* 50 Suppl. S128, P2-081. 2004. 2004年神経科学学会ポスター発表.
- 7) Bito H: Studies on signaling mechanisms regulating plasticity of neuronal morphology. *Seikagaku* 76, S-EP4, 2004. 第77回日本生化学会 10.13-16, 2004, 横浜. 2004年日本生化学会奨励賞受賞講演
- 8) Bito H: Molecular mechanisms regulating

- axon formation and outgrowth. Seikagaku 76, S14-2, 734, 2004. 第77回日本生化学会 10.13-16, 2004, 横浜. シンポジウム発表.
- 9) Takemoto-Kimura S, Ishihara N, Bito H. : Multiple lipid modifications in a membrane-anchored  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), CLICK-III/CaMKI $\gamma$ . Seikagaku 76, 3P136(W35-11), 900, 2004. 第77回日本生化学会 10.13-16, 2004, 横浜. 口頭発表.
- 10) Okuno H, Chowdhury S, Worley P, Bito H.: Imaging of Arc-CaMKII interaction by fluorescence resonance energy transfer in neurons. 14th Neuropharmacology Conference "The cytoskeleton and synaptic function" (San Diego, Oct. 20-22, 2004) abstract book P5, 69, 2004. poster 発表.
- 11) Okuno H, Chowdhury S, Worley P, Bito H.: Interaction between Arc and CaMKII in dendrites monitored by fluorescence resonance energy transfer. Soc. Neurosci. Abstr. 30: 164.16, 2004. 第34回北米神経科学学会, San Diego, Oct.23-27, 2004. poster 発表.
- 12) Takemoto-Kimura S, Ishihara N, Bito H.: Multiple lipid modifications in a membrane-anchored  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), CLICK-III/CaMKI $\gamma$ . Soc. Neurosci. Abstr. 30: 498.9, 2004. 第34回北米神経科学学会, San Diego, Oct.23-27, 2004. poster 発表.
- 13) Doi T, Nonaka M., Fujiyoshi Y; Takemoto-Kimura S, Bito H.: Ligand binding-dependent synaptic clustering of PSD-95 and its roles in neuronal function. Soc. Neurosci. Abstr. 30: 969.15, 2004. 第34回北米神経科学学会, San Diego, Oct.23-27, 2004. poster 発表.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

ストレス性精神障害の病態に関する脳機能画像解析研究

分担研究者 岡本泰昌 広島大学院医歯薬学総合研究科 講師

**研究要旨** 今回、われわれはストレスへの脳内認知機構の解明として、身体イメージに関する不快な情報（ストレス）を処理する神経基盤が男女で異なる可能性を想定し、その神経基盤の性差について検討した。さらにストレスへの適応強化のための心理機制として、将来の報酬予測に着目し、その脳機能局在についてうつ病者において検討を行った。その結果、若年の健常成人において、身体イメージに関する不快な情報を処理する神経基盤が男女で明らかに異なる可能性が考えられた。うつ病の患者では将来の報酬を予測していく機能が障害されているため、「将来の報酬への見通し」立たず、じっとしていること（行動抑制）や短絡的な行動（自殺、衝動行為）を最適な行動として選択している可能性が推定された。今回得られた所見は、ストレス事象に対する適応を理解し、ストレス適応を強化するための方策を検討していく上で、基礎となるものと考えられた。

**A. 研究目的**

多くの精神障害の発症、症状形成や持続にストレスが関与している。特にストレス関連障害においては脳内のストレス適応機構の破綻した状態と考えられ、適応の脳内機構に関する検討は、精神障害の発症機序・治癒過程の解明につながると思われる。このような観点から、われわれはストレスの適応破綻の脳内メカニズムを明らかにするために、機能的磁気共鳴画像法（functional Magnetic Resonance Imaging: fMRI）と脳磁場計測法（Magnetoencephalography: MEG）といった脳機能画像解析手法を用いて検討を行ってきた。昨年度はストレスへの適応強化のための心理機制として、予期と心像生成（Imagery）に着目し、その脳機能局在について検討を行った。その結果、健常者では快刺激の予期と左前頭前野の活動、不快刺激の予期と右前頭前野の活動が関連していることが示唆されたが、これに対してうつ病患者では左前頭前野の活動低下、右前頭前野・帯状回前部腹側領域を含む活動亢進が示唆された。また、アレキシサイミアでは未来の楽しい心像を生成する際に後帯状回の活動低下しており、感情を伴うエピソード

記憶の利用が乏しい可能性を指摘した。

引き続き今年度は、身体イメージに関する不快な情報（ストレス）を処理する神経基盤が男女で異なる可能性を想定し、その神経基盤の性差について検討した。さらにストレスへの適応強化のための心理機制として、将来の報酬予測に着目し、その脳機能局在について検討を行った。

**B. 方法**

検討-1（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の性差に関するfMRIを用いた検討）

平均年齢25歳の右利きの健常な男女各13例に、情動決定課題と対照課題を遂行してもらい、その間の脳活動を fMRI を用いて測定した。情動決定課題では、被験者に対し 5.4 秒ごとに不快な身体イメージに関連した単語 3 語（例えば‘太る’‘脂肪’‘ぜい肉’など）を 1 セットにした単語刺激を MRI 装置に入った被験者に見せ、その都度 3 語のなかで最も不快に感じる単語を選んでその単語に対応するボタンを MRI 装置内で押してもらった。対照課題では、同様に情動的に中性な単語 3 語（例えば‘種類’‘時間’‘述べる’など）を 1 セットとし

た刺激を 5 セット呈示し、その都度 3 語のなかで最も情動的に中性と感じる単語を選んでボタンを押してもらった。各被験者には機能的 MRI の撮像終了後、情動決定課題と対照課題で使用された全 60 語の単語それぞれについて、「快さ」と「親しみやすさ」を 7 点満点で評価してもらった。併せて、摂食障害調査表という質問用紙にて、食行動や身体イメージの障害など、摂食障害の症状と関連のある心理学的・行動学的特徴の評価も行った。

検討-2 (健常者およびうつ病者を対象とした将来の報酬予測の機能局在に関する fMRI を用いた検討)

うつ病患者 12 例と年齢、性をマッチングさせた健常者 12 例を対象に、1.5T の MRI 装置を用い、時間軸を含まず金額のみ異なる条件(immediate condition ; 左右どちらのボタンを押しても、1 回○が出れば選択した報酬がもらえる)と時間軸と金額の異なる条件 (immediate vs.delayed condition ; 左ボタン (immediate) を選ぶと○が 1 回であれば 10 円もらえるが、右ボタン (delayed) を選ぶと○が一回出ただけでは報酬がもらえず、3 回連続で○が出れば 50 円がもらえる。) で構成された課題を遂行中の fMRI を撮像した。

(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

検討-1 男性では、身体イメージに関連した不快な単語を使用した情動決定課題遂行中には対照課題遂行中と比較して左内側前頭皮質、左紡錘回、左上側頭回、左海馬などの脳部位で有意な信号上昇が認められ、女性では扁桃体を含む左海馬傍回、左視床、右尾状核にて有意な信号上昇が認められた。このときの男性の脳活動から女性の脳活動をサブトラクションすると、男性では女性と比較して左内側前頭皮質の先端部の信号上昇が有意に高く、また女性ではこの領域の脳活動が低い被験者ほど、摂食障害調査

表の合計点が高値であった。

検討-2 immediate vs.delayed condition において control condition と比較して、基底核および、帯状回前部、左小脳、右前頭前野、右頭頂葉などにおいて優位な活性化が見られたことから、これらの部位がこの時間的スケールを持った報酬の選択に関与しているものと考えられた。これに対して、うつ病では、これらの領域の活性化が見られなかった。

### D. 考察

検討-1 の結果から、男性と女性では身体イメージに関連した不快な単語の認知に異なる脳部位が関与していることが示された。女性では認められた扁桃体の活動上昇が男性ではみられなかったが、扁桃体はこれまでの研究から恐怖の条件付け、恐怖の表情の認知、脅威となる刺激の検出などの役割をもつことが知られており、男性は身体イメージに関連した不快な単語刺激を恐怖に関連した情報として処理していない可能性を示唆された。さらに男性では左内側前頭前皮質で有意な活動上昇がみられ、左内側前頭皮質先端部の活動上昇は女性より有意に高かったが、内側前頭前皮質はさまざまな情動の想起や自己の情動への気づきに関与したり、扁桃体を含む大脳辺縁系と連絡して辺縁系で生じる情動反応に影響を及ぼしたり、情動の評価や同定など情動処理の認知的側面に関与したりすることが先行研究で明らかにされている。これらのことから身体イメージに関連した不快な単語刺激を用いた情動決定課題を男性はより認知的・理性的に処理し、女性はより感情的・直感的に処理していると考えられた。また、身体イメージに対する神経的認知スタイルの差異が摂食障害発症率の性差に関与している可能性も示唆された。さらに女性と比較して男性で高い信号上昇が認められた左内側前頭皮質先端部に関して、女性では摂食障害調査票にて摂食障害の症状に関連した心理学的・行動学的特徴が強いと評価された被験者ほどこの部位の脳活動が低いことが示されたことから、左内側前頭皮質先端部の機能低下が摂食障害の病態生理に関与している可能性が示唆された。

検討-2の結果から、うつ病者においては、右前頭前野、帯状回前部、右頭頂葉を含む脳内ネットワークの機能低下により、報酬に関連した反応抑制機能および意志決定機能に障害がみられると考えられる。特に右前頭前野の腹外側部の機能低下は、すぐ得られる小さな報酬に対する反応を抑制せず、将来得られる大きな報酬を選択しないなどの高い衝動性と関連している可能性が想定される。また視床、左小脳を含む脳内ネットワークの機能低下により、将来の報酬情報に基づき決定された行動の出力過程に何らかの障害がある可能性が考えられた。

## E. 結論

摂食障害は、体型や体重への強いこだわりがみられ、拒食や過食・自己誘発性嘔吐などの症状をみとめるストレス関連の精神疾患であるが、その発症率は男性よりも女性のほうが約 10 倍高いといわれる。今回の検討から、発症率にこれほど大きな性差がみられる要因のひとつとして、身体イメージに関する不快な情報を処理する神経基盤が男女で異なる可能性が考えられた。

さらに、将来の報酬の予測は希望につながり、重要なストレス適応強化の方策として考えられるが、今回の検討から、うつ病の患者では将来の報酬を予測していく機能が障害されているため、「将来の報酬への見通し」立たず、じっとしていること（行動抑制）や短絡的な行動（自殺、衝動行為）を最適な行動として選択している可能性が推定された。

以上のように、今回、得られた所見は、ストレス事象に対する適応を理解し、ストレス適応を強化するための方策を検討していく上で、基礎となるものと考えられた。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

- 1) 岡本泰昌, 山下英尚, 上田一貴, 白尾直子, 山脇成人: ストレス適応破綻の脳内メカニズム: fMRI と MEG を用いた脳機能画像解析、心身医学 44: 185-192, 2004
- 2) 岡本泰昌, 白尾直子, 上田一貴, 世木田幹, 山下英尚, 山脇成人: ストレス

の適応の脳内メカニズム、精神神経医学雑誌 106:365-371,2004

- 3) 木下亜紀子, 鈴木伸一, 松永美希, 尾形明子, 上田一貴, 岡本泰昌: うつ病に対する認知行動療法、カレントセラピー23: 49-53, 2005
- 4) 岡本泰昌, 岡田剛, 上田一貴, 旭修司, 志々田一宏, 木下亜紀子, 萬谷智之, 山下英尚, 山脇成人, 田中沙織, 銅谷賢治: 情動・行動の脳内機構に関する fMRI 研究-うつ病の病態解明に向けて-, 心身医学 (印刷中)
- 5) Asahi,S., Okamoto,Y., Okada,G., Yamawaki,S., Yokota,N.: Negative correlation between right prefrontal activity during response inhibition and impulsiveness:a fMRI study. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 254:245-51, 2004.
- 6) Tanaka,SC., Doya,K., Okada,G., Ueda,K., Okamoto,Y., Yamawaki,S.: Prediction of immediate and future rewards differentially recruits cortico-basal ganglia loops. Nature Neurosci.7 :887-93, 2004.
- 7) Yamashita,H., Mori,K., Nagao,M., Okamoto,Y., Morinobu,S., Yamawaki,S.: Effects of Changing From Typical to Atypical Antipsychotic Drugs on Subjective Sleep Quality in Patients With Schizophrenia in a Japanese Population. J Clin Psychiatry 65:1525-1530, 2004.
- 8) Shirao,N., Okamoto,Y., Mantani,T., Okamoto,Y., Yamawaki,S.: Gender differences in brain activity toward unpleasant word stimuli concerning body image: an fMRI study. British Journal of Psychiatry 186:48-53,2005.
- 9) Yamashita,H., Okamoto,Y., Morinobu,S., Yamawaki,S., Kahkonen,S.: Visual emotional stimuli modulate auditory sensory gating studied by magnetic P50 suppression. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience (in press).
- 10) Shirao,N., Okamoto,Y., Okada,G., Ueda,K., Yamawaki,S.: Gender differences in brain activity toward



unpleasant linguistic stimuli concerning interpersonal relationships: an fMRI study  
European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience (in press).

- 11) Mantani,T., Okamoto,Y., Shirao,N., Okada,G., Yamawaki,S.: Reduced activation of posterior cingulate cortex during imagery in subjects with high degrees of alexithymia: A functional magnetic resonance imaging study. Biological Psychiatry (in press).

#### G-2. 学会発表

- 1) 岡本泰昌：情動・行動の脳内機構に関する fMRI 研究-うつ病の病態解明に向けて-、情動・行動の脳内機序に関する研究の進展、第 45 回日本心身医学会総会、2004 年 6 月 4-5 日、東京
- 2) Okamoto,Y.: VALPROATE IN THE TREATMENT OF BIPOLAR DISORDER FROM CLINICAL TO BASIC RESEARCH.2004 WFSBP Asia Pacific Congress July 9-11, 2004, Seoul, Korea
- 3) 岡本泰昌：ストレスを感じる前頭前野-ストレス適応破綻の脳内機構- . 第 7 回若手研究者のための生命科学セミナー、ストレス-そのとき脳はどう働くか?、2004 年 10 月 22 日、東京
- 4) 岡本泰昌：情動・ストレスに関する脳機能画像研究-うつ病の病態解明に向けて-ヒューマンストレス産業技術研究会第 5 回講演会「ストレスと脳計測」、2005 年 1 月 25 日、大阪

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

乳幼児の認知・情動発達に関する神経心理学的研究

分担研究者 利島 保 広島大学教育学研究科 教授

**研究要旨** 多感覚的な母子相互作用を通じて発達する、情動の制御中枢である前頭前野の働きを、近赤外分光法脳機能イメージングを通じて可視化し、母子間愛着形成の客観的検討を行った。嗅覚については、健常新生児を対象とした検討から、母乳よりも人工乳を頻繁に経験することで、母乳に対する前頭前野の活性化が弱まることがわかった。また視覚については、虐待経験を持つ施設乳児で、親近性の高い施設従事者の笑顔に対して活性化するが、真顔に対して脱活性化した。しかし、施設生活を3ヶ月続けると、真顔に対しても活性化するようになるという結果を得た。こうした結果から、乳幼児の愛着を可視化する可能性を示した。

**A. 研究目的**

ストレス脆弱性に関わる乳幼児期の要因として、母子間の愛着、絆の不全が古くから指摘されている。母子の相互作用を通じて生まれる母子の絆（mother-infant-bond）は単一の感覚モダリティによるものではない。母親の顔、声、表情、匂い、肌触りといった多感覚的な情報が、母子の相互作用を通じて統合され、絆と呼ばれる情動表象になっていくと考えられる。こうしたマルチモーダルな情報の統合や、母子の相互作用に関わる情動調節機能は、いずれも前頭前皮質が深い関わりを持つといわれる。しかし、乳幼児においてマルチモーダルな情報が前頭前皮質でどのように処理されているのかは、これまで乳幼児の脳活動を非侵襲に測定する方法がなかったため、あまり良く知られていない。我々は最新の脳機能イメージング法を用い、各種モダリティを乳幼児に提示した時の前頭前皮質の活動について検討する。

**B. 研究方法**

近年わが国で開発され、乳幼児にも適用可能であるとして期待が寄せられている近赤外線分光法(near-infrared spectroscopy, NIRS)による脳機能イメージング法を用い、脳血流量の変化を測定することで、乳幼児の前頭前野皮質の活動を調べた。（倫理面の配慮）すべての研究の実施に際して、広島大学医歯薬学総合研究科、広島大学教育

学研究科それぞれに設置された倫理審査委員会に諮り、許可を受けてから行った。

**C. 研究結果と考察**

嗅覚は出生後の視覚機能がまだ十分に利用可能でない早期の段階から、愛着の表象となると考えられる。嗅覚の高次中枢もまた、前頭前領域（眼窩前頭領域 orbitofrontal cortex, OFC）にあると言われるが、この領域に嗅覚表象がどのように表現されているのかについては先行研究でも一貫した結果が得られておらず、未だ不明の部分が多い。そのため乳幼児においても、無臭刺激（蒸留水）には無反応でも、母乳やバニラなどの刺激提示によって OFC が活性化する現象が報告されているが、そうした活性化が母乳に対する乳幼児の選好を示しているのかについては疑わしい。単なる嗅覚刺激の強度に関連した反応であったことも考えられるためである

OFC の活性化動態については、成人を対象とした我々のいくつかの研究から、嗅覚以外の随伴する手がかりが存在する場合、OFC の血流増加の度合いが少なくなること、手がかりが存在しない場合には、OFC では嗅覚刺激強度に比例した血流量の増加が見られることや、嗅覚刺激に対する快・不快の主観的評価に対応して、それぞれ OFC で血流が増加・減少することがわかった。

これら基礎的検討を踏まえ、出生直後の乳幼児を対象に、乳児にとっての母乳の特

殊性を調べる実験を行った。比較対照として、母乳よりも強い刺激強度を持つ人工乳と蒸留水を用いた。その結果、母乳しか経験していなかった乳児（母乳群）や、母乳も人工乳も経験していない乳児（未経験群）は、人工乳に対する活性化は見られなかったが、母乳の経験もあるが、人工乳を経験した乳児（人工乳経験群）は母乳に対して活性化せず、人工乳だけに強い活性化を示すようになった。こうした結果からは、母乳だけに長期間暴露されなかった場合、嗅覚を介した母子の絆の成立における困難へとつながる可能性を示唆している。

嗅覚だけでなく、視覚についても、見知らぬ他人を認識するとき、乳児の頭頂一側頭の視覚的対象認知に関わる領域で母親を認識するときよりも強い活性化が生じることがわかった。また OFC と視覚認知に関しては、現在のところ、虐待経験を持つ施設乳児で、親近性の高い施設従事者の笑顔に対して活性化するが、真顔に対して脱活性化した。しかし、施設生活を 3 ヶ月続けると、真顔に対しても活性化するようになるという結果を得た。今後はこうした結果を乳幼児の脆弱性に関わる気質を調べる質問紙の結果や、愛着状態についての詳細な観察と対応付け、真顔に対する OFC 活性化の変化から養育者への愛着状態を可視化する可能性を検討することにつなげていく必要がある。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

- 1) 近藤武夫・斎藤由里・利島 保：高次認知機能における個人差の発生に関わる愛着の機能 — 神経心理学的研究とその展望 — 広島大学大学院教育学研究科紀要第三部（教育人間科学関連領域），231-236，2004.
- 2) 斎藤由里・近藤武夫・利島 保：乳児のストレス脆弱性と大脳半球の左右差について 広島大学大学院教育学研究科紀要第三部（教育人間科学関連領域），259-266，2004.
- 3) 斎藤由里・利島 保・近藤武夫・鈴木伸一・兒玉憲一・岡本裕子・島津明人・中村菜々子：乳幼児における表情の違いに対する脳血流反応 — 乳児院在籍

の 0 歳児の月齢変化 — 広島大学大学院附属心理臨床教育研究センター紀要，第 3 巻，60-66，2005

- 4) Hashimoto Y., Toshima, T.: Learning performance on the discrimination-shift task in patients with cortical and subcortical lesions, *Applied Neuropsychology*, 2004 in press.

### G-2. 学会発表

- 1) Kondou T., Aoyama S., Toshima, T.: The effects of olfactory stimulus intensity and preceding cue on hemodynamics in orbitofrontal region: a near-infrared spectroscopy study. First international workshop on Evolutionary Cognitive Science: Exploring Social Brain, 13, 2004.
- 2) Kondou, T., Saito, Y., Aoyama, S., Toshima, T.: Individual differences in prefrontal and occipital cortex activations while executing the spatial span task: a multi-channel near-infrared spectroscopy study. International Conference on Working Memory, 10, 2004.
- 3) Fukumoto ,R., Kondo ,T., Saito ,Y., Aoyama, S., Toshima, T.: Activations in Broca's area for face and finger imitation: a NIRS imaging study. *New Perspectives in Affective Science*, 39,(2005).
- 4) Kondou, T., Toshima, T., Hashimoto, Y.: Different infant's brain activation for mother and stranger in strange situation: a near-infrared spectroscopy study. *Brain Impairment*, 5, 156, 2005.
- 5) Kondo, T. Aoyama, S., Fukumoto, R., Saito, Y., Toshima, T.: Cue availability alters odor intensity processing in orbitofrontal cortex: a near-infrared spectroscopy study. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 2005. in press.
- 6) Hashimoto, Y., Kondo, T., Toshima, T.: Reversal Learning with Different Type of Stimuli in Patients with Unilateral Hemisphere Damage. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 2005. in press.
- 7) 青山志緒里・近藤武夫・斎藤由里・橋

本優花里・利島 保：ニオイ刺激に対する快・不快反応の神経心理学的研究。  
日本心理学会第 68 回大会発表論文集，  
917, 2004.

- 8) 橋本優花里・齊藤由里・青山志緒里・  
近藤武夫・利島 保：前頭葉における  
再生と再認－NIRO による検討－日本  
心理学会第 68 回大会発表論文集，681，  
2004.
- 9) 青山志緒里・齊藤由里・福本理恵・近  
藤武夫・利島 保：母子の絆形成にお  
ける嗅覚刺激と血行動態反応の関連に  
ついて 日本発達心理学会第 16 回大会，  
2005. 印刷中.
- 10) 齊藤由里・青山志緒里・福本理恵・近  
藤武夫・利島 保：乳児のストレス脆  
弱性における気質と脳機能の関連につ  
いて —0 歳児の月齢に伴う脳血流反  
応の観点から—日本発達心理学会第 16  
回大会，2005. 印刷中.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし