

# 情動ストレスによるラット脳内転写調節因子発現と リン酸化グルタミン酸受容体との関連：新規こう 鬱薬とアンチセンス法を用いた形態学的研究

研究代表者	橋口 浩志
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/1965">http://hdl.handle.net/10458/1965</a>

情動ストレスによるラット脳内転写調節因子発現と  
リン酸化グルタミン酸受容体との関連  
－新規抗うつ薬とアンチセンス法を用いた形態学的研究－

(課題番号: 15591234)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))  
研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者: 橋口浩志  
(宮崎大学医学部精神医学講座・講師)

## 目次

はしがき	1
課題番号	1
研究課題	1
研究組織	1
研究経費	2
研究発表	2
研究成果	6
主要論文集	

## はしがき

本報告書は文部科学省研究費補助金基盤研究（C）（2）の助成のもとに行った「情動ストレスによるラット脳内転写調節因子発現とリン酸化グルタミン酸受容体との関連－新規抗うつ薬とアンチセンス法を用いた形態学的研究－」の研究成果をとりまとめたものである。本研究期間とともに外来などの臨床業務の増加もあり、当初の計画の達成にはほど遠い結果におわった。しかしながら、これまでの知見と研究分担者からの結果を考察しながら新たな展開を模索している状態である。報告書をまとめるにあたり、各専門の研究者各位にご批判頂くと共に、2年間にわたりご指導・ご支援頂いた関係各位の方々に心から御礼申し上げます。

課題番号：15591234

研究課題：情動ストレスによるラット脳内転写調節因子発現とリン酸化グルタミン酸受容体との関連－新規抗うつ薬とアンチセンス法を用いた形態学的研究－

## 研究組織

研究代表者：橋口浩志（宮崎大学医学部講師）

研究分担者：石田康（宮崎大学医学部教授）

研究分担者：武田龍一郎（宮崎大学医学部助手）

研究分担者：安部博史（宮崎大学医学部助手）

研究分担者：西森利數（宮崎大学医学部教授）

## 研究経費

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	2000	0	2000
平成16年度	1500	0	1500
総計	3500	0	3500

## 研究発表

### （1）学会誌等

ISHIDA, Y., HASHIGUCHI, H., TAKEDA, R., ISHIZUKA, Y., MITSUYAMA, Y., KANNAN, H., NISHIMORI, T. AND NAKAHARA, D.: Conditioned-fear stress increases Fos expression in brainstem monoaminergic and GABAergic neurons of the locus coeruleus and dorsal raphe nuclei. *Synapse* 45 (1): 46-51 (2002)

橋口浩志, 石田康, 武田龍一郎, 安部博史, 石塚雄太, 河南洋, 西森利數, 中原大一郎: 情動ストレスによるラット視床下部室傍核のFos蛋白発現. *脳と精神の医学* 14: 331-337 (2003).

HASHIGUCHI H, ISHIDA Y, TAKEDA R, NISHIMORI T, NAKAMURA M, NAKAHARA D, NIKI H: Immunohistochemical characterization of Fos immunopositive cells in the inferior and superior colliculi following audiogenic seizures in rats. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 57: S32 (2003)

ISHIZUKA Y, HASHIGUCHI H, ISHIDA Y, KANNAN H: GABAA receptors in the medial prefrontal cortex modulating interleukin-1 $\alpha$ -induced nitric oxide releases in the hypothalamic paraventricular nucleus in conscious rats. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 57: S59 (2003)

TAKEDA R, ABE H, HASHIGUCHI H, ISHIDA Y, IKEDA T, NISHIMORI T: Effects of unilateral lesion of mesencephalic dopaminergic pathway on behavior response by mechanical stimulus to the rat hindpaw. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 57: S68 (2003)

ISHIDA Y, KAWAI K, MAGATA Y, TAKEDA R, HASHIGUCHI H, ABE H, MUKAI T, SAJI H: Changes in Dopamine D2 Receptors and 6-[<sup>18</sup>F]Fluoro-L-3,4-Dihydroxyphenylalanine Uptake in the Brain of 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rats. *Neurodegenerative Disease* 1: 109-112 (2004).

TAKEDA R, ABE H, HASHIGUCHI H, IKEDA T, ISHIDA Y, NISHIMORI T: Effect of systemic milnacipran administration in rats with neuropathic pain. *Neuroscience Research* 50: S115 (2004)

石塚雄太, 石田 康, 橋口浩志, 武田龍一郎, 中原大一郎, 西森利數, 河南 洋: ストレス負荷時の視床下部室傍核・内側前頭前野における一酸化窒素動態と機能の解析. *精神薬療研究年報*, 第36集, pp. 196-202, 2004.

TAKEDA R, IKEDA T, TSUDA F, ABE H, HASHIGUCHI H, ISHIDA Y, NISHIMORI T:  
Unilateral lesions of mesostriatal dopaminergic pathway alters the  
withdrawal response of the rat hindpaw to mechanical stimulation.  
Neuroscience Research 52 (1):31-6 (2005).

(学会発表)

[国内学会]

橋口浩志, 石田康, 武田龍一郎, 石塚雄太, 河南洋, 西森利數, 中原大一郎:  
情動ストレスに伴うラット視床下部室傍核 Fos 蛋白発現  
第 25 回日本神経科学大会 (2002)

武田龍一郎, 橋口浩志, 石田 康, 池田哲也, 西森利數: パーキンソン病  
モデルラットにおける痛覚過敏についての研究 (第 2 報)  
第 25 回日本生物学的精神医学会 (2003)

石塚雄太, 橋口浩志, 石田康, 河南洋: ストレス負荷時における視床下部室傍  
核の一酸化窒素動態に対する内側前頭前野の GABA の影響  
第 25 回日本生物学的精神医学会 (2003)

武田龍一郎, 池田哲也, 津田文子, 橋口浩志, 石田 康, 西森利數: ヘ  
ミ・パーキンソン病モデル動物における痛覚過敏

第 26 回日本神経科学大会 (2003)

石田 康, 石塚雄太, 橋口浩志, 武田龍一郎, 中原大一郎, 西森利數,  
河南 洋: ストレス負荷時の視床下部室傍核・内側前頭前野における一酸化窒  
素動態と機能の解析. 第 36 回精神神経系薬物治療研究報告会 (2003)

武田龍一郎, 安部博史, 橋口浩志, 池田哲也, 石田康, 西森利數: 神経因性疼  
痛モデル動物に対するミルナシプランの疼痛軽減効果

第27回日本神経科学大会 (2004)

武田龍一郎, 池田哲也, 安部博史, 橋口浩志, 石田康, 西森利數: 慢性疼痛モ  
デル動物に対するミルナシプランの疼痛軽減効果

第26回日本生物学的精神医学会 (2004)

[国際学会]

なし



## 研究成果

本研究では、ストレスを経験したラットを再度その環境に暴露することで起こると考えられる情動ストレスについて中枢神経系の各部位での神経活動を細胞内転写調節因子である Fos 蛋白を指標として免疫組織化学法を用いて観察し、情動やストレスに関与すると考えられている部位のグルタミン酸受容体のサブユニットやリン酸化の変化を観察した。これらの結果を比較・統合することにより、ストレス負荷による脳内各部位における神経活動の様式が細胞レベルで明らかとなり、それに並行して変化する可能性があるグルタミン酸受容体のサブユニットの変化やリン酸化をダイナミックに観察することが出来る。グルタミン酸受容体のリン酸化は、*c-fos* 等の細胞内転写因子発現と同様、脳内の細胞間刺激伝達において重要な役割を担っている事象であり、神経系の可塑性や機能発現も明らかになる。

1) 条件付けには電撃ストレスを用いる。ショック箱にて電撃ショックを負荷し、負荷後3日目にショックを与えた箱内にラットを移動することで情動ストレスとする。動物の情動ストレスの指標にすくみ行動や脱糞等の行動観察を行う。

2) 免疫組織化学法を用い、Fos 蛋白の発現を形態学的に観察した。Fos 発現は、電撃ストレス及び情動ストレスにより前頭前野 (PFC)、視床下部室傍核 (PVN)、背側縫線核 (DR)、脚橋被蓋核 (PPTg)、橋背外側被蓋核 (LDTg)、青斑核 (LC) において対照群に比べ有意に増加したが、側坐核 (NAC)、扁桃核 (AMY)、腹側被蓋野 (VTA)、黒質 (SN) では対照群との有意差を認めなかった。

3) 電撃ストレス負荷により PFC、PVN、DR、PPTg、LC において、Fos 陽性細胞の約 40~50%の GABA 及び NMDA 受容体サブタイプ 1 陽性細胞が活性化されており、抑制系神経細胞の活性化及びグルタミン酸作動性神経投射による機能修飾の可能性が考えられた。

4) 神経性一酸化窒素合成酵素 (nNOS+) / Fos+陽性細胞の活性化は、脳内各部位においてばらつきが認められた。その程度は PVN において比較的高く認められ、ストレス負荷時の自律神経系の関与も考えられた。

5) ドーパミン神経核である VTA、SN において Fos 発現が非常に少なく、比較的多くの Fos 発現が認められたノルアドレナリン神経核 (LC)、セロトニン神経核 (DR) との分布差が明らかとなった。これらはラットの系統による発現の差異があり、ストレス実験に用いるラットの系統の選択も重要と考えられた。

6) オキシトシン、バソプレッシン陽性細胞は、共に PVN において約 40~50%が活性化されていた。

7) アセチルコリン神経核である PPTg、LDTg においては、コリンアセチルトランスフェラーゼ陽性細胞の約 5%が活性化されていた。

8) 種々のグルタミン酸受容体、リン酸化グルタミン酸受容体の各部位におけるタンパク量を Western blotting 法を用いて解析した (継続中)。ストレス負荷後 30 分におけるグルタミン酸受容体のサブユニットの変化は各群間で変化を認めなかった。経時的な変化に関しては今後の検討課題であり、現在、1 時間、2 時間、24 時間後、48 時間後などを設定し、サブユニットのタンパク量の変化を検討したいと考えている。リン酸化に関しては検出も出来ず、抗体や免疫沈降法などの手技的な検討を行っており、引き続き研究を継続中である。