

論文の内容の要旨

論文題目 発育期の環境要因が成熟後の神経内分泌ストレス応答系と
行動に及ぼす影響の解析

氏名 ベナー 聖子

発達期における行動異常の表出には、遺伝的要因および環境要因が関わることが知られているが、その関係性や機序についてこれまでに詳細は明らかにされていない。本研究では、発達期における環境要因が成熟後の行動異常につながる一因として、神経内分泌ストレス応答系（大脳皮質・辺縁系－視床下部－下垂体－副腎軸; Corticolimbic HPA 軸）に着目した。その理由は、神経内分泌ストレス応答系の形成・発達が様々な環境因子の影響を受けやすいことが疫学的に知られ、動物実験からも指示されているからである。さらに、ヒトにおいて様々な精神神経疾患がストレスと病因学的な関連性を有し、かつ病態学的にも神経内分泌ストレス応答系の異常を伴うことが臨床研究から示されているため、行動異常への関与が疑われるからである。そこで、発達期の環境要因により神経内分泌ストレス応答系の発達が影響を受け、それによる機能異常が成熟後まで引き継がれた結果として行動異常が表出すると仮説立てられる。

本研究では、発達期における環境因子が神経内分泌ストレス応答系の発達に及ぼす影響と、成熟期における行動異常発現との関係をマウス実験によるアプローチで明らかにすることを目指した。具体的には、行動異常を引き起こす発達期の化学的環境要因により神経内分泌ストレス応答系異常がみとめられるか、および神経内分泌ストレス応答系異常引き起こす社会的環境因子により行動異常が引き起こされるか、を検討するため、以下に示すふたつの研究を実施した。

1. 周産期 TCDD 曝露による神経内分泌ストレス応答系の異常について。

一つ目の研究課題では、化学的環境因子として、環境中に広く残留する有害化学物質である 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) の周産期曝露を取り上げ、神経内分泌ストレス応答機能をエンドポイントとして設定した検討を行った。周産期 TCDD マウス

は、成熟期において高次脳機能低下と社会性障害を反映する行動異常を呈することが先行研究にて示されている。しかし、神経内分泌ストレス応答機能への影響に関しては、疫学的にそのリスクが示唆されているにも関わらず、検証実験例が乏しい。そこで本研究では、先行研究で行動異常が出現した周産期 TCDD 曝露条件でマウスを作出するため、妊娠日齢 12.5 日目の C57BL/6J マウスに、0、0.6、または 3.0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 体重の用量で TCDD を単回経口投与した。以下、それぞれ Control 群、TCDD 0.6 群、TCDD 3.0 群と記す。本実験では雄の産仔のみ用い、9 週齢以降にストレス負荷による行動への影響の検討、神経内分泌ストレス応答系の機能評価、および関連する遺伝子発現の解析を実施した。

まず、本研究で作出した周産期 TCDD 曝露マウスが行動異常を呈するかどうかを確認した。この際、神経内分泌ストレス応答系の行動への関与について検討するためデキサメタゾン (DEX; 合成グルココルチコイド) 投与による行動への影響も併せて検討した。TCDD 0.6 群では、新奇な状況に置かれたときの探索行動が低下しており、この行動の違いが最も顕著であったタイムポイントにおける血中コルチコステロン分泌も Control 群に比して過剰であることが示された。この表現型は、DEX により変容したことから、神経内分泌ストレス応答系による制御を受けていることが示唆された。一方、甘味嗜好性については、Control 群と TCDD 0.6 群では DEX の影響により低下したのに対し、TCDD 3.0 群でのみ DEX の影響が消失していた。このことは、TCDD 3.0 群において神経内分泌ストレス応答系の機能が他群とは異なることを示唆した。

次に、神経内分泌ストレス応答系の活性機能を評価するため、拘束ストレス負荷試験と副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) 負荷試験を行った。いずれもストレス負荷による血漿中コルチコステロン値の経時変化を指標とした。両試験で一貫した結果として、TCDD 0.6 群ではストレス刺激に対する過剰なコルチコステロン分泌が認められたのに対し、TCDD 3.0 群ではコルチコステロン分泌の亢進時間が遅延するという特徴が認められた。神経内分泌ストレス応答系のフィードバック制御機能を検討するため、DEX / CRH 負荷試験を行った結果、TCDD 3.0 群では過剰反応が認められたことから、TCDD 3.0 群のフィードバック機能の制御障害が裏付けられた。以上より、周産期 TCDD 曝露を受けたマウスは、成熟後にストレス刺激に対する神経内分泌ストレス応答の亢進やフィードバック制御機能の低下を呈することが示唆され、曝露量によって表現型が異なることが明らかとなった。

神経内分泌ストレス応答に関連のある脳領域における遺伝子解析を行った結果、フィードバック機能の制御障害を支持する分子変化として、TCDD 3.0 群の海馬における CRH-R1 の遺伝子発現低下が認められた。CRH-R1 は、発達期におけるストレスとの相互関係やスト

レス耐性の形成に関わるとされ、成人期における精神神経疾患の予測因子のひとつとして考えられている分子である。辺縁系における CRH-R1 の発現がフィードバック制御機能に関わることは動物実験により既に報告されており、内分泌学的特徴も本研究結果と一致するものである。

以上の行動学的、神経内分泌学的特徴や脳内分子の変化は、体内に TCDD の残留がない成熟後に認められた。このことから、周産期における TCDD 曝露が神経内分泌ストレス応答系の発達に不可逆的な変化をもたらした可能性が示唆された。

2. 幼若期社会的ストレスによる社会性行動の異常について.

二つ目の研究課題では、神経内分泌ストレス応答系に障害をもたらすような社会的環境因子により、上記周産期 TCDD 曝露マウスで出現したような行動異常が顕れるかどうかを検討することを目的とした。そのような社会的環境因子としてげっ歯類において確立されている実験条件である、幼若期に母親や兄弟たちと引き離す社会的ストレスを負荷した幼若期社会的隔離 (early social deprivation; ED) および母子分離 (maternal separation; MS) を用いた。これらは先行研究により、脳機能や神経内分泌ストレス応答機能異常、不安様行動や攻撃性などの情動機能異常を発現されることが示されている。しかし、集団飼育下における社会性に着目した行動は、これまでに検討がなされていない。

本研究では、集団の中で生じる競争的状况における行動表現型 (社会的優位性) など、先行研究にて周産期 TCDD 曝露マウスで顕著な異常が認められた行動指標をエンドポイントに設定した。生後 2 週間、1 日 3 時間だけ母親と同腹兄弟から引き離した条件を幼若期社会的隔離 (ED) マウス、母親のみと引き離した条件を母子分離 (MS) マウス、とそれぞれ記す。行動試験には IntelliCage という、全自動でヒトの高次脳機能を反映するような認知機能や社会性行動の評価試験が行えるマウス用集団飼育型実験装置を用いた。

まず、情動行動の指標として新奇環境への反応を検討したところ、MS 群では異常はみとめられなかったが、ED 群で探索行動の更新がみとめられた。次に、「逆転課題」による状況変化に対する適応性 (行動柔軟性) について検討したが、いずれの幼若期社会的ストレスも、このような認知機能には影響を及ぼさないことが示された。

さらに、社会的環境下における競争劣位性を検討するために、1 日のうち水の飲める時間帯を制限し、飲水が可能になる時間帯が開始した直後に大勢が水飲み場を奪い合うといった椅子取りゲームのような社会的競争状況を発生させた。その結果、ED マウスは、競争環境下において劣位になることが示された。これは、先述の周産期 TCDD 曝露マウスの行動

表現型と同様のものである。EDマウスとその対照群を別々の行動試験装置に分けることで、より競争に優位である対照群を競争から取り除いて競争倍率を半減させると、EDマウスは対照群と全く同様の行動を示した。このような行動は、報酬に対する欲求よりも、他者との接触に伴うストレスを避けていることから生じていると解釈できる。一方、MSマウスにはこうした回避傾向はみられず、むしろ競争優位性が高まる傾向性が認められた。報酬獲得に対する過剰な積極性は、ヒトにおいてしばしば人格障害や行為障害で表出する行動と類似したものと解釈できる。主要な点として、優劣いずれの方向に逸脱するにせよ、競争優位性は発達期ストレス影響をみるために鋭敏な社会性行動指標のひとつであることが示唆された。

社会性行動に関連のある脳領域における遺伝子発現を解析した結果、顕著な競争劣位性を呈したEDマウスの海馬では、神経活動に関連のある遺伝子(c-FOS)の発現低下が認められた。一方、扁桃体のc-FOSは増加していた。これらの遺伝子発現量と、競争優位性の順位との間には相関が認められた。EDの前頭前皮質では、神経形態制御に関わるとされるMAP2が低下しており、これも競争優位性の順位と相関していた。

以上より、幼若期の生育環境上の一時的なストレスが、社会性にかかわる問題の発症や重症化の要因となり得る可能性が示された。さらに、個体ごとの競争優位性と脳領域特有的な遺伝子発現プロファイルを対応づけることで競争優位性の神経基盤の手がかりを新たに得ることができた。

以上の実験を通して、発達期における環境要因が神経内分泌ストレス応答系に作用し、成熟後の行動異常に関与する可能性についての新たな実験的証拠を提示することが出来た。