

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790756

研究課題名（和文）慢性ストレス形成過程における中枢神経系の機能変化と低血圧発症の関係

研究課題名（英文）Relationship between functional changes of the central nervous system and hypotension onset in chronic stress formation process

研究代表者

船上 仁範（FUNAKAMI YOSHINORI）

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：70449833

研究成果の概要（和文）：

様々な病気の発症に関与する慢性ストレスの形成過程について、SART ストレスマウスを用いて中枢神経系の機能変化を検討した。

慢性ストレス形成過程において視床下部の室傍核（PVN）、背内側核（DMH）及び延髄の淡蒼縫線核（RPa）の神経活動が段階的に低下することが明らかとなった。また、慢性ストレスでは PVN における CRF 作動性神経も神経活動が低下していることを認めた。さらに、抗不安薬ジアゼパムはこれらの変化を改善することが認められた。

PVN、DMH 及び RPa は自律神経系や内分泌系に関与することから、慢性ストレス形成過程では自律神経系や内分泌系を介した恒常性が破綻していることが示唆された。また、DMH は血圧調節に関与しており、SART ストレスによる DMH の神経活動低下は低血圧の一要因となりうることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

I examined functional changes of the central nervous system (CNS) using SART-stressed mice in the formation process of chronic stress related to the onset of illness.

Chronic stress reduced the neural activity of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) and the Pallidal raphe nucleus (RPa) gradually. It was observed that chronic stress decreased the neural activity of the CRF neuron in PVN. These abnormalities were improved by the anti-anxiety drug diazepam.

In SART-stressed mice, it was suggested that the chronic stress-induced abnormality of the neural activity of PVN, DMH and RPa, which is involved in the autonomic nervous system and endocrine system, is broken homeostasis. It was thought that the SART stress-induced decrease of neural activity in DMH is related to blood pressure regulation and could be one factor in hypotension onset.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）

キーワード：慢性ストレス、SART ストレス、視床下部、自律神経、CRF 作動性神経、低血圧

1. 研究開始当初の背景

現代社会はストレス社会であり、ストレスへの関心も急速に高まってきている。ストレ

スは精神的のみならず身体的にも大きな影響を及ぼすことは周知の事実である。

ストレスには急性ストレスと慢性ストレ

スがあり、各々のストレスで発症する症状も大きく異なる。また、慢性ストレスの治療には薬物療法、精神療法などが必要な場合が多く、急性ストレスと違い治療も容易ではない。このような慢性ストレスによる身体症状は精神系、神経系、循環器系、呼吸器系、消化器系、免疫系など全身に及ぶ。ストレスとの因果関係を認める疾患が心身症であり、自律神経の失調状態などを引き起こし、全身に様々な不定愁訴を生じる。様々な身体症状の発症にストレスが深く関与していることは最近の研究で明らかになりつつあり、精神系では、気分障害や不安障害、循環器系では本態性高血圧症、本態性低血圧症、起立性低血圧、冠動脈疾患や心臓神経症など、消化器系では、最近話題の過敏性腸症候群などと多岐にわたる。

ストレスによって発症するこれらの症状は、ストレス社会で生活していく上で QOL の改善に重要な研究課題であると考えられる。

2. 研究の目的

慢性的及び間歇的ストレスである SART ストレスを負荷された動物は、副交感神経緊張亢進型の自律神経失調症のモデル動物である。この動物は不安、痛覚過敏、低血圧や起立性低血圧、過敏性腸症候群などの様々な身体症状を発現する。慢性ストレスの形成過程における脳内神経活動を解明することが、中枢から自律神経系を介して、末梢で起こる低血圧症状の発症メカニズム解明の糸口につながり、さらには治療薬の開発に有用であると考えられる。

これらのストレス病の発症機序に起因していると考えられる慢性ストレス形成過程における脳内神経活動の変化が自律神経系に与える影響、さらにはその脳内変化と慢性ストレスによって発症する身体症状発現、特にストレスと低血圧の関係を動物実験で解明し、治療薬開発にもつなげ、基礎実験を臨床への架け橋となりうる研究に発展させたい。

3. 研究の方法

1. 実験動物

実験動物として、体重約 20-30g (約 4 週齢) の ddY 系雄性マウスを使用した。マウスの通常飼育は室温 24±1℃、12 時間毎の明暗サイクル (午前 8 時から午後 8 時、点灯) 下で行い、8 匹/1 ゲージとした。飼料及び水は自由に摂取させた。

2. SART ストレスの負荷方法

ストレスの負荷は Hata らの方法に準じて行った。即ち、室温 24℃ の飼育室と庫内温度 4℃ の動物飼育用チャンバーの両方にマウス飼育用ケージを用意し、毎日 9 時から 16 時

までの間は 1 時間ごとにマウスを両ケージ間に移し替え、16 時から翌朝 9 時までは 4℃ のチャンバー内で飼育するという環境温度変化に 7 日間曝すことにより負荷した。実験当日の朝 11 時まで SART ストレスの負荷方法に従って入れ替えを行い、室温に戻して 30 分以上経た後、実験に使用した。これを SART ストレスマウスとした。(Fig.1)

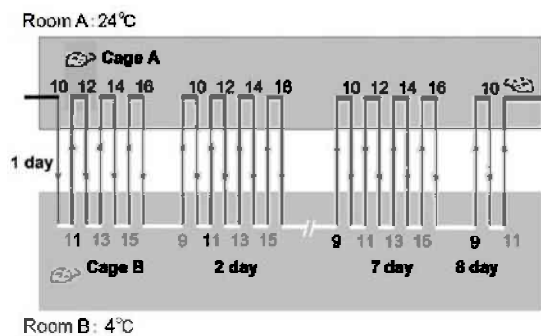


Fig. 1 SART ストレスの負荷スケジュール

3. 薬物投与方法

Diazepam は、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 水溶液に懸濁させ、用時調整した。SART ストレス負荷期間中、非ストレスマウス及び SART ストレスマウスに Diazepam 及びその対照として 0.5%CMC-Na を 1 日 1 回、ストレス負荷終了日の前日まで連日経口投与した。

4. 慢性 (SART) ストレス形成過程におけるサンプルの採取

脳は、ストレス負荷 1 日目 (12:00)、3 日目 (12:00) 及び 8 日目 (12:00) に採取した。麻酔下、マウスの左心室より 0.9%NaCl 溶液、次いで 4% paraformaldehyde 溶液を注入し、急速灌流固定した後、全脳を摘出した。全脳は同様の固定液を用いて一晩 4℃ で後固定し、30%スクロース溶液に換え、1~3 日間 4℃ で冷蔵保存した。

5. 免疫染色

c-Fos タンパク質及び CRF は組織免疫染色法により検出した。脳をクリオスタットで厚さ 30µm の連続した組織切片を作製し、免疫染色後、封入し組織標本を作製した。

6. c-Fos 陽性核細胞の計測

組織の命名と核の境界は、Franklin & Paxinos の脳図譜 (THE MOUSE BRAIN instereotaxic coordinates) を用いて定義した。脳中の特定部位における c-Fos 陽性核細胞は、顕微鏡にカメラとモニターを接続することにより計測した。脳の特定領域の境界はチオニン染色を施した隣接する切片を用いて確認した。計測は視床下部室傍核 (Paraventricular hypothalamic nucleus ; PVN,

Bregma から 0.82mm 後方) , 視床下部背内側核 (Dorsomedial hypothalamic nucleus ; DMH, Bregma から 2.18mm 後方) 及び延髄の淡蒼線核 (Pallidal raphe nucleus ; RPa, Bregma から 6.24mm 後方の 3 領域に関して行った。それぞれの領域における c-Fos 陽性核細胞の数は, マウス 1 匹につき 2 枚の連続切片を選び, 目的の特定領域を 40,000 μ m² に区切り, その面積中に発現している c-Fos 陽性核細胞を計測し, それらを平均した数値を使用した。

4. 研究成果

1. 急性ストレスによる c-Fos 発現部位とその変化

4°C, 1 時間寒冷刺激を用いた急性ストレスでは, 視床下部の室傍核 (PVN) , 背内側核 (DMH) 及び延髄の淡蒼線核 (RPa) に特徴的な c-Fos 発現がみられ, 神経活性の亢進が認められた。 (Fig.2)

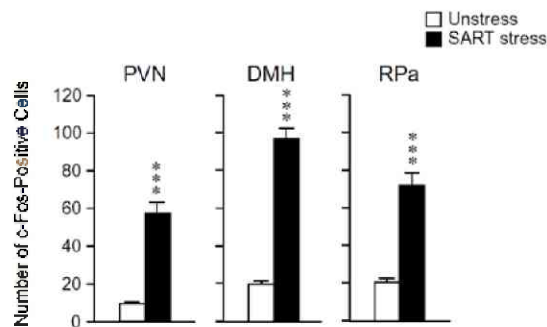


Fig.2 急性ストレスによる各領域における神経活性の変化

2. SART ストレス負荷 1, 3 及び 8 日目における c-Fos 発現の変化

Figure 3 に, SART ストレス負荷過程 1 日目の, PVN (Fig.3A) , DMH (Fig.3B) 及び RPa (Fig.3C) における c-Fos 陽性核細胞数の経日的変化を示す。

PVN と RPa において, 負荷過程 1 日目の SART 及び Cold ストレス群は, 非ストレス群と比較して有意に c-Fos 陽性核細胞数が増加した。しかし, 3 日及び 8 日目には両ストレス群ともに c-Fos 陽性核細胞数の有意な増加が認められなかった。また, c-Fos 陽性核細胞数の減少は非ストレス群の c-Fos 陽性核細胞数と同程度であった。

DMH は, PVN と RPa と同様の傾向を示したものの, 3 日及び 8 日目における Cold ストレス群の c-Fos 陽性核細胞数は, 非ストレス群と比較してその数が有意に増加していた。

血清 CORT 濃度は, SART ストレス及び非ストレスマウスともに変化が認められなかった。

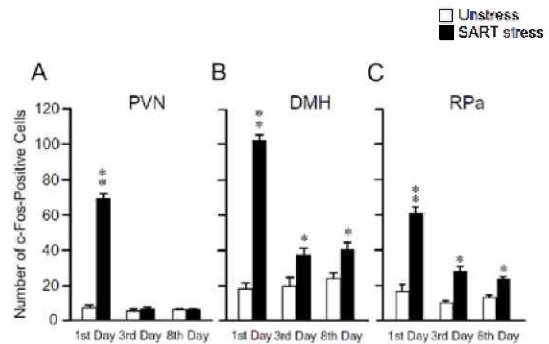


Fig.3 SART ストレス負荷期間における各領域の神経活性の変化

3. SART ストレス誘発 c-Fos 発現における Diazepam の効果

Figure 4 は, SART ストレスマウスにおいて 1 時間寒冷刺激を与えた場合の PVN (Fig.4A) , DMH (Fig.4B) 及び RPa (Fig.4C) における, c-Fos 陽性核細胞数に対する Diazepam の効果を示している。両部位ともに SART ストレスマウスに認められる c-Fos 陽性核細胞数の減少は Diazepam により有意に増加したが, 非ストレスマウスレベルにまでは改善しなかった。非ストレスマウスの Diazepam 群及び Vehicle 群間では, c-Fos 陽性核細胞数にほとんど差は認められなかった。

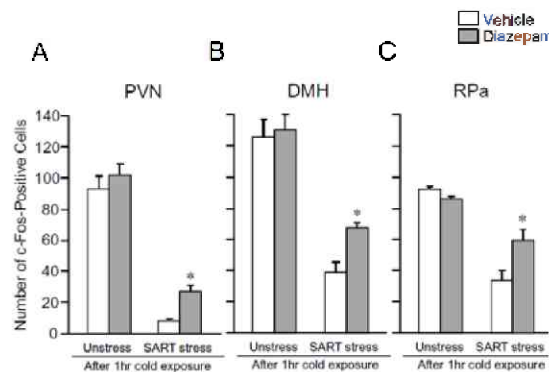


Fig.4 SART ストレス誘発 c-Fos 発現における Diazepam の効果

以上の結果から, SART ストレスマウスでは, PVN, DMH および RPa の神経活動は非ストレスマウスに比べ有意に低下していたが, CORT はいずれのマウスにおいても変化が認められなかった。また, PVN においては CRF 作動性神経の神経活動に有意な低下が認められた。つまり, DMH や RPa は交感神経活性に関与していることから, SART ストレス動物は交感神経緊張低下状態に DMH や RPa が関与していることが示唆された。

ジアゼパム投与により, これらストレス応答関連の 3 領域 PVN, DMH および RPa の神経活動は非ストレスマウスでは変化せず, SART ストレスマウスで有意に上昇した。すなわち, ジアゼパムは視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系や視床下部-交感神経-副

腎髄質 (SAM) 系に關与する PVN, SAM 系に關与する DMH および RPa における SART ストレスによる神経活動の低下を回復させることで, HPA 系や SAM 系の正常化を促し, SART ストレスによる種々の症状を改善することが示唆された。

このように慢性ストレス形成過程で, PVN, DMH 及び RPa を介したストレス応答に重要な HPA 系及び SAM 系の機能低下を引き起こし, 恒常性の破綻を引き起こしていることが推察された。また, DMH は血圧調節に關与する部位でもあり, SART ストレスによる DMH の神経活動低下は低血圧の一要因となっていることが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 船上仁範, 宮本朋佳, 飯田拓真, 他. 老化と慢性ストレス状態の脳内ストレス応答関連領域における神経活動. 第36回日本神経科学大会, 2013年06月20日～2013年06月22日(京都).
- ② 阪井邦正, 船上仁範, 宮本朋佳, 他. 慢性ストレスによるHPA系の機能低下—PVNの神経活動とホルモン分泌—. 第36回日本神経科学大会, 2013年06月20日～2013年06月22日(京都).
- ③ 阪井邦正, 船上仁範, 岸本茉希, 他. SART ストレスマウスにおける血清アンチエイジングおよびストレスホルモンの変化—コルチコステロンとデヒドロエピアンドロステロン—. 日本薬学会第133年会(横浜) 2013年03月27日～2013年03月30日(横浜).
- ④ 船上仁範, 飯田拓真, 宮本朋佳, 他. SART ストレスによる視床下部のc-Fos発現に対するDiazepamの効果. 第35回日本神経科学大会, 2012年09月18日～2012年09月21日(名古屋).
- ⑤ 船上仁範, 宮本朋佳, 飯田拓真, 他. 環境ストレスによって引き起こされるマウス橋・延髄領域のc-Fos発現の分布及びその変化. 日本薬学会第132年会, 2012年3月28日～2012年3月31日(札幌).
- ⑥ 飯田拓真, 船上仁範, 黒川建吾, 他. マウスの視床下部におけるSART ストレスが引き起こすc-Fos発現の変化. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日～9月17日(横浜).
- ⑦ 若木千幸, 船上仁範, 中尾真理子, 他. 環境ストレスは、自然免疫において重要な役割を示す肺胞マクロファージの機能を減少させる. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日～9月17日(横浜).

6. 研究組織

(1)研究代表者

船上仁範 (FUNAKAMI YOSHINORI)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：70449833