

幼若期ストレスと不安障害

北海道大学大学院・医学研究科・情報薬理学講座・神経薬理学分野
吉岡充弘

● はじめに

ストレスは侵襲的刺激に対する生体機構の「ゆがみ」と捉えられる。生体はこの「ゆがみ」を矯正し、恒常性を維持するため、さまざまなストレス応答機構を有している。過度の、あるいは長期間にわたるストレス曝露はストレスに対する適応反応の破綻や機能不全を招来し、抑うつ、不安、心的外傷後ストレス障害(posttraumatic stress disorder: PTSD)などのストレス関連性精神疾患の誘因となる可能性が指摘されている(1,2)。(図1)

ストレスにより生じた内分泌および免疫系を介する適応反応は、脳によって統合・処理され、自律神経機能や情動変化として表出される。視床下部-下垂体-副腎系(hypothalamic pituitary adrenal axis: HPA系)は、最も重要なストレス応答機構であり、その活性化に伴い遊離される副腎皮質刺激ホルモン放出因子(corticotropin releasing factor: CRF)やグルココルチコイドは、ス

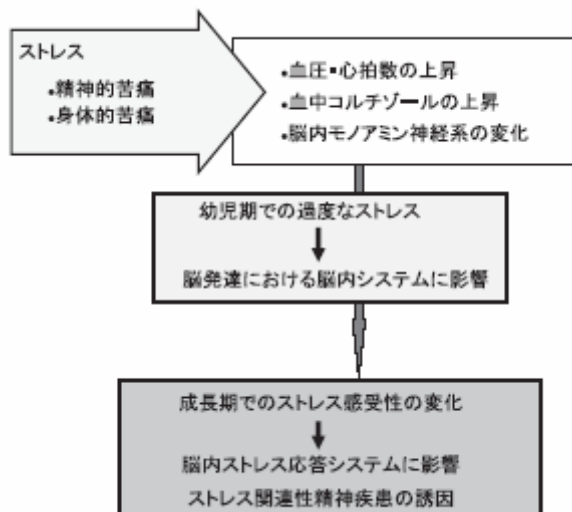


図1 幼若期ストレスと成長後のストレス応答性

ストレスを受けると神経-内分泌および免疫系を介する適応反応は、自律神経機能や情動の変化として表出される。幼若期に受けた過度のストレスは、神経回路網の形成過程に影響を与え、成長後のストレス感受性を変化させ、情動ストレスに対する脆弱性あるいは応答性の変化が生じる可能性が考えられる。

トレスに対処する重要な生体防御因子と考えられる。脳内においては、神経成長因子、神経ステロイド、生理活性アミンのセロトニン(5-HT)やノルアドレナリン(NE)が重要な役割を果たしている。またストレスによって生じる海馬神経の細胞形態変化(3)は、ステロイド合成阻害薬(4)あるいは抗うつ薬である5-HT再取り込み阻害薬(Selective 5-HT reuptake inhibitor: SSRI)反復投与によって回復する(5,6)。この機構は、神経栄養因子であるbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)発現変化を伴う核内遺伝子の関与が推察される。

ストレス応答に関わる脳内システムは、発達過程に応じて動的に形成される(7,8)。したがって、胎生期あるいは幼若期におけるストレス曝露は、神経回路網の形成過程に影響を与え、成長

後のストレス応答性や認知機能などの脳機能に様々な変化が生じると推察される。幼若期のストレスが、海馬の体積を減少させ(9)、成熟後の情動表出や認知機能に影響を及ぼすことが示されている(10)。またストレスの持続時間や強度、あるいはストレスの種類によって、海馬の形態や機能発達が異なることが報告されている(11,12)。これらの事実は、ストレス応答に関わる脳内システムの発達形成過程には、ストレスの影響を受けやすい時期、すなわち“臨界期”が存在す

ることを示唆している。

本研究は、幼児期の一定期間に過度のストレスを負荷すると、脳内神経回路に機能的異常が生じるとの仮説に基づき、幼若期におけるストレス負荷と脳機能発達および障害との関連性を、臨界期という視点から追究した。また脳内ストレス応答機構に關与する内因性物質としての 5-HT に着目し、脳機能形成過程における 5-HT 神経の調節的役割を探索した。生後 2~3 週間の時期に皮質における 5-HT 受容体の機能に劇的な変化が生じ、5-HT による応答が脱分極から過分極へ変容することが報告されている(28)ことから、この時期に焦点を当てた。

● 幼若期ストレス負荷と行動学的応答性

ラット幼若期の異なった時期に負荷した嫌悪刺激、足蹠電撃ショック(Footshock: FS) が、成熟後の情動表出にどのように影響を与えるか、行動学的応答性を指標とし追究した。実験には自家繁殖した Wistar 系雄性ラットを用いた。

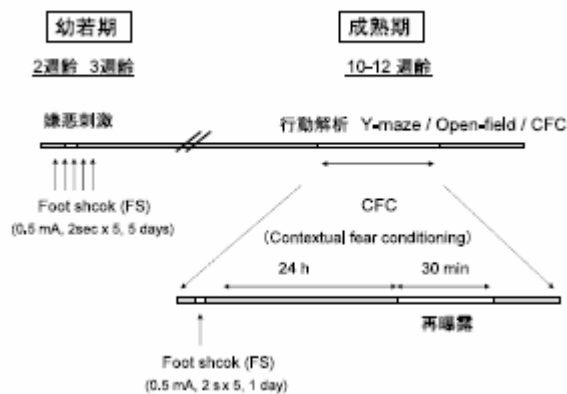


図2 実験プロトコル

生後 2 週齢(14 日齢)および 3 週齢(21 日齢)時に、足蹠に FS (刺激強度; 0.5mA, 刺激時間; 2 秒間, 刺激間隔; 30 秒)を、1 日 5 回 5 日間負荷した。対照群として、FS-box に入れる処置のみを負荷した同腹の FS 非負荷(FS (-)群)ラットを用いる。成熟後(10~12 週齢時)の行動学的評価は、Open field 試験および文脈的恐怖条件付け(Contextual fear conditioning: CFC)試験を用いた。

本研究で用いた行動学的評価のプロトコルの概要を図 2 に示す(図 2)。幼若期ストレスは、生後 2 週齢(14 日齢)および 3 週齢(21 日齢)時に、足蹠に FS を負荷した(以下、2WFS 群、3WFS 群とする)。FS 負荷 5 分前に FS-box にラットを入れ、自由に探索させた後(pre-FS)、FS (刺激強度; 0.5mA, 刺激時間; 2 秒間, 刺激間隔; 30 秒毎)を 1 日 5 回、各週齢時に 5 日間負荷した。ラットは FS 負荷後 5 分間、FS-box に放置し(post-FS)、その間の行動を観察した。対照群として、FS-box に入れる処置のみを負荷した同腹の FS 非負荷(FS (-)群)ラットを用いた。成熟後(10~12 週齢時)の行動学的評価は、Open field 試験あるいは文脈的恐怖条件付

け(Contextual fear conditioning: CFC)試験を用いた。

1) 新奇環境ストレスに対する応答性: Open field 試験による検討

自発運動量解析に最も広く用いられている Open field 試験は、広い空間にラットを置いた後の行動パターンを解析することにより、新奇環境下における情動的側面を同時に解析できる評価系である。この試験により、2WFS 群は FS(-)群と同様の行動パターンを示した。すなわち、Open field 環境に曝露した直後の探索期では、Open field の壁際から中央までを頻りに移動するが、時間の経過とともに行動量は減少し、20-30 分後には open field の隅に滞在するという行動パターンを示す。これに対して、3WFS 群では探索期の運動量が FS(-)群の約半分と有意に低く、その後の順応期でも運動量が低下することなく推移し、後半における運動量は FS(-)群を

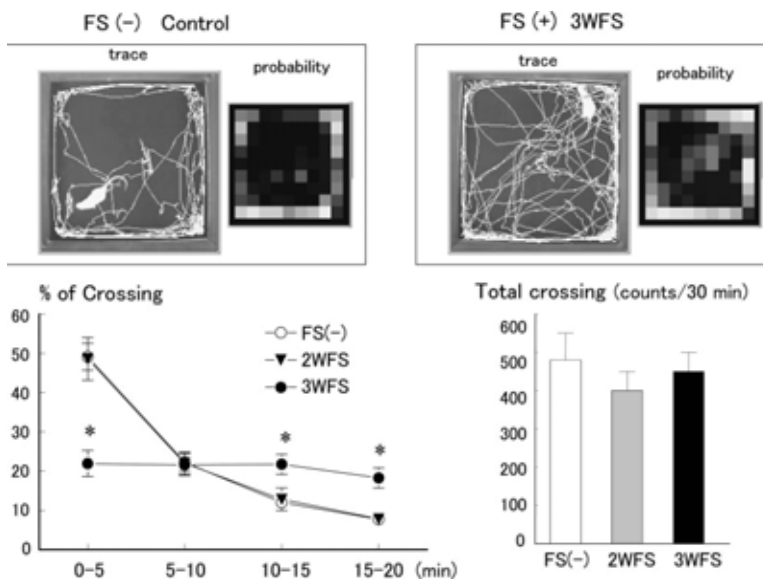


図3 新奇環境ストレスに対する幼若期ストレスの影響: Open field を用いた検討
 縦横 90cm、壁 40cm からなる正方形の装置の中央に置いたラットの行動を、装置上に設置した CCD カメラにて 30 分間記録した。縦横 10cm 毎に区切られたマス目をラットが横切った回数を水平運動量(crossing)として、行動解析システムで水平運動量として解析した。3WFS 群は FS(-) 群に比べ明らかな行動パターンの違いがみられた。

ない) その際生じるすくみ行動(freezing)を不安の指標とする、妥当性の高い不安評価系である。図4に CFC におけるすくみ行動の典型的な例を示す。これは環境と嫌悪刺激が条件付けられた文脈的記憶を背景とする不安に基づく情動行動であり、抗不安薬により抑制される(16,17)。2WFS 群では、再曝露時のすくみ行動が FS(-) 群に比較して有意に減少していた。一方 3WFS 群は FS(-) 群と同様の行動応答性を示した(図4)。

一種の新奇環境への曝露と考えられる FS 負荷前(pre-FS)、および FS 感受性あるいは短期記憶を反映すると考えられている FS 負荷後(post-FS)のすくみ行動については、FS(+)群と FS(-)

逆に上回っていた。この結果から幼若期にストレスを負荷したラットでは、ストレス負荷時期によって、新奇環境ストレスに対する行動パターンに違いが生じることが明らかになった(図3)。

2) 恐怖条件付けストレスに対する応答性: CFC 試験による検討

恐怖条件付けストレスとは、あらかじめ嫌悪刺激(foot shock; FS 刺激など)を負荷した動物を一定時間後に、同様の刺激環境下に再曝露し(この時は嫌悪刺激を与えない)

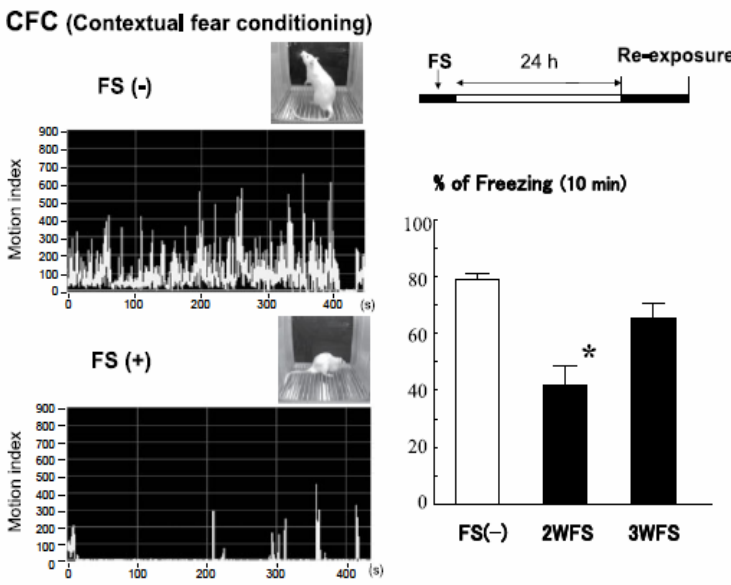


図4 恐怖条件付けストレスに対する幼若期ストレスの影響: CFC を用いた検討
 FS (0.5mA, 2 秒間)を 30 秒毎に 5 回負荷し、24 時間後、ラットを FS-box に再曝露(re-exposure)し、すくみ行動(freezing)の有無を 5 秒毎に 30 分間観察し、発現率(freezing %)として評価する。呼吸に関する骨格筋とひげの動き以外が認められない状態を freezing、それ以外を活動と判定する。FS を負荷しないラットは探索行動により行動量が増加する。一方、FS 負荷ラットは freezing を誘発し、行動量は極端に低下する。また 2WFS 群は、FS(-) 群と比較し、freezing 回数が有意に減少した。3WFS 群は FS(-) と有意差は見られなかった。 * P<0.05 vs. FS(-) 群

群との間に差は認められなかった。したがって、2WFS 群における再曝露時の行動変化は、FS に対する痛覚閾値の変化や短期記憶障害に起因するものではなく、条件恐怖に対する不安水準が低下していたことを示すものと考えられた。

以上のストレスに対する行動学的応答性を指標として検討した結果、生後 2 週齢あるいは 3 週齢時に嫌悪刺激を受けたラットは、新奇環境ならびに条件恐怖に対するストレス応答性が異なること、また成熟後のストレスに対する応答性には臨界期が存在することが推察された。

● セロトニンと情動ストレス応答機構

中枢神経系の発達に関する神経解剖学的研究が進められ、神経回路網形成に関わる種々の分子機構が明らかにされつつある。5-HTは情動表出を制御する最も重要な神経伝達物質である。5-HT作動性神経は主に背側縫線核と正中縫線核を起始核とし、脳内広範囲にわたって上行性投射線維を送っている。特に情動回路を形成している海馬、扁桃体および皮質前頭前野に高密度に分布しており、恐怖・不安といった情動記憶に関わっていると推察されている。しかし、ストレス応答機構における5-HTの調節的役割については未だ一致した見解は得られていない。例えば、ラットに条件付けストレスであるCFCを負荷すると、皮質前頭前野の5-HT遊離量が増加する、すなわち5-HT神経活動はストレスにより亢進する(図 5A)(18)。一方、選択的5-HT再取り込み阻害薬(SSRI)は、5-HTトランスポーターに作用し、内因性5-HTを増加させることにより、抗不安作用あるいは抗うつ作用を示す。従って、ストレス関連性精神疾患の背景には、5-HT神経活動低下の可能性も考えられる。

1) 恐怖条件付けストレスと5-HT神経調節: CFC試験による検討

ストレスによって生じた海馬の神経細胞萎縮(5,6)やcAMP response element binding protein (CREB)およびBDNFの発現減少が、SSRI反復投与によって回復することが明らかにされている(19,20,21)。これは、SSRI投与により生じた5-HT神経活動亢進が、結果的に後シナプスにおけるシグナル伝達機構を賦活し、遺伝子レベルでの可塑的变化を引き起こしていると推察される。換言すればストレス関連性精神疾患の病態には、神経細胞形態の可塑的变化が生じていると広義に解釈することも可能である。

この神経可塑的变化は、シナプス伝達機構にも影響をおよぼすと考えられる。例えば記憶、学習の電気生理学現象である海馬シナプス可塑性—長期増強(long-term potentiation; LTP)形成は、CFCを含む様々な情動ストレスにより阻害される(22-24)(図 5B)。このシナプス可塑性はSSRIあるいは5-HT系抗不安薬投与によっても修飾される(19,23,25,26)。最近、我々は、CFCにより抑制されたLTP形成が、5-HT/NE再取り込み阻害薬(SNRD)反復投与により回復することを明らかにした(27)。これらの結果から、ストレス応答システムにおける5-HT神経調節機構と海馬シナプス可塑性との間には密接な関連性があると考えられる。

図5(B,C)は、5-HT神経に対する神経毒である5,7-DHT(5,7-dihydroxytryptamine)を側脳室内に投与し5-HT神経を化学的に破壊した場合のシナプス可塑性および行動応答性を評価したものである。5-HT神経破壊により、CFCでみられたLTP抑制は減弱し、すくみ行動も低下す

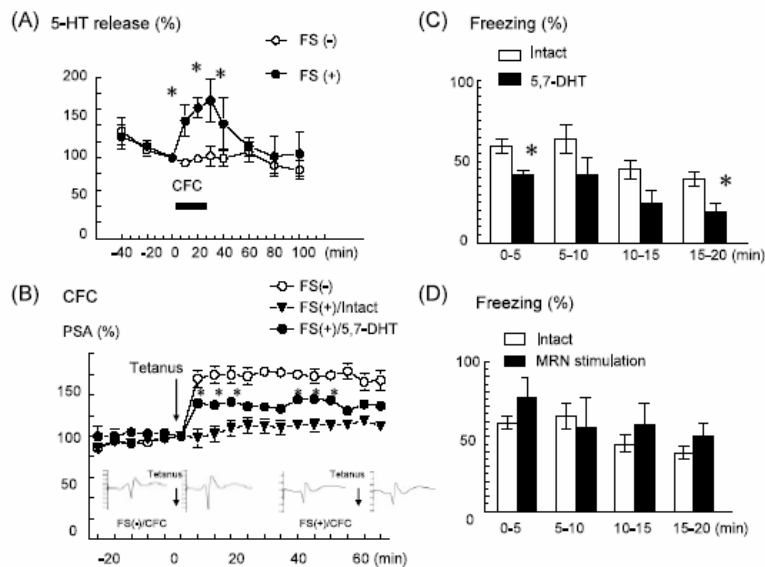


図5 恐怖条件付けストレスと5-HT神経調節: CFC試験を用いた検討
 (A) CFCにおけるラット皮質前頭前野(PFC)の5-HT遊離量の変化: FS負荷24時間後に再曝露(re-exposure)すると、PFCの5-HT遊離量はFS(-)群に比べ有意に増加した(文献18を参照)。* $P < 0.05$ vs. FS(-)
 (B) 5-HT神経破壊ラットにおけるシナプス可塑性の変化: CFCにより海馬CA1領域の長期増強(LTP)形成は抑制された。このLTP抑制反応は5-HT神経毒である5,7-dihydroxytryptamine(5,7-DHT)前投与ラットにおいて、減弱した(文献24を参照)。* $P < 0.05$ vs. FS(+)/Intact
 (C) 5-HT神経破壊ラットにおけるfreezing behaviorの変化: CFCにより生じたfreezingは、5,7-DHT前投与ラットにおいて減少した(文献24を参照)。* $P < 0.05$ vs. Intact
 (D) 正中縫線核(MRN)電気刺激によるfreezing behaviorの変化: 麻酔下にてMRNに双極電極を埋め込み、4日後FSを負荷した。24時間後、覚醒下で電気刺激(0.1 mA, 5分間)を行い、20分後に再曝露した。すくみ行動はMRN刺激により増加する傾向がみられた。

る。すなわち脳内5-HTが、ストレスにより生じる神経可塑性に影響を与えることにより、その応答性を変化させている可能性が推察される。一方、海馬5HT神経の起始核である正中縫線核(MRN)を電気刺激すると、すくみ行動は増加する傾向がみられた(図5D)。このように強制的に5-HT神経を擾乱させた場合の情動行動は、幼若期ストレス負荷による行動応答性と類似点が見出される。すなわち2週齢FS群と5-HT神経破壊ラットでは、不安水準の低下という共通した行動学的応答性を示すことが明らかになった。

2) 脳発達と5-HT受容体

皮質神経回路が急速に発達するラットの幼若期(生後2~3週令)は、5-HT受容体機能の変容することが最近明らかにされた(28-30)。例えばPFCにおける神経細胞は、2週齢時では5-HTによって脱分極が生じるが、3週齢では過分極に転じる。これは2週齢時では5-HT_{2A}、5-HT₄あるいは5-HT₇受容体を介し神経細胞が興奮し、3週齢時になると5-HT_{1A}受容体による反応が主になると解釈されている。この反応は受容体数の変化によるものか、あるいは細胞内情報伝達系による機能変化によるかは明らかでない。また海馬CA1の5-HT_{1A}受容体を介した過分極反応は母子分離ストレスにより、減弱する(31)。さらに遺伝子改変動物を用いた実験により、成長後の“正常な”ストレス応答反応には、脳発達における海馬や皮質5-HT_{1A}受容体機能が重要な役割を果たすことを示唆している(32)。幼若期の一定期間に過度のストレスを負荷すると、このような5-HT受容体を含む情動回路の機能不全や神経回路網の形成不全が生じ、成長後のストレス応答性に影響を与えていると推察される。その結果、ストレス感受性を変化させ、抑うつ、不安障害、PTSDなどの疾患の背景となっている可能性は十分考えられる。

● おわりに

幼若期ストレス負荷により、成長後のストレス応答性が変化すると仮説に基づき、行動学的応答性を指標として得られた結果を考察した。幼若期のFSストレスは、生後2週齢、3週齢という負荷時期のわずかな違いで、成熟後のストレス応答性に違いがみられた。特に、条件恐怖に対する応答性は、幼若期ストレス負荷時期によって明らかに異なっていた。このストレス負荷時期と情動表出の違いに関する脳内メカニズムは現在不明である。しかし、2週齢時にストレスを負荷したラットが示す不安水準の低下は、5-HT神経破壊ラットでみられた低不安ときわめて類似していたこと、この時期には5-HT受容体機能が劇的な変容を示すこと(28-30)から、脳機能発達における、5-HT神経による調節機構が重要な役割を担っていることは想像に難くない。

昨今の精神神経疾患の増加の背景には、幼児虐待の増加があると指摘されている。また、虐待を受けた子供は、PTSDや不安障害、抑うつなどの精神疾患発症頻度が対照群と比較して有意に高いという疫学的・臨床的事実が集積されつつある。本研究は、このような社会的問題の背景をなす精神神経疾患と幼児期のストレスとの関係を解明する上で、意義あるものと考えられる。また脳機能発達の臨界期における5-HT神経による調節機構が明らかになれば、発達過程でのストレス修復時期にも臨界期が存在することが推察され、より適切な時期に、より妥当性の高い薬物治療の可能性も考えられ、今後の研究に期待したい。

参考文献

- 1) McAllister-Williams R.H. et al. *Psychol. Med.* 1998; 28: 573-584.
- 2) Heim C. and Nemeroff C. B. *Biol. Psychiatry* 23001; 49: 1023-10391.
- 3) Magarinos A. M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94: 14002-14008.
- 4) Magarinos A. M. et al. *Neuroscience* 1995; 69: 89-98.
- 5) Malberg J.E. et al. *J Neurosci* 2000; 20: 9104- 9110.
- 6) Malberg J.E. et al. *Neuropsychopharmacol* 2003; 28: 1562- 1571.
- 7) Helmeke C. et al. *Cereb. Cortex* 2001; 11: 717-727.
- 8) Schmidt M. et al. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2003; 21: 125-132.
- 9) Huot R. L. et al. *Brain Res.* 2002; 950: 52-63.
- 10) Huot R. L. et al. *Psychopharmacology (Berl.)* 2001; 158: 366-373.
- 11) Caldji C. et al. *Biol. Psychiatry* 2000; 48: 1164-1174.
- 12) Mirescu C. et al. *Nat. Neurosci.* 2004; 7: 841-846.
- 13) Sarter M. et al. *Psychopharmacology (Berl.)* 1988; 94: 491-495.
- 14) Parada-Turska J. et al. *Neuropharmacol* 1990; 29: 1111-1116.
- 15) Katz R. J. et al. *Prog Neuropsychopharmacol* 1980; 4: 585-590.
- 16) Graeff F. G. et al. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996; 54: 129-141.
- 17) Mori K. et al. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 69:367-372.
- 18) Yoshioka M. et al. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995; 51: 515-519.
- 19) Nibuya M. et al. *J Neurosci.* 1996; 16: 2365-2372.
- 20) Duman R.S. et al. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54:597-606.
- 21) Thome J. et al. *J Neurosci.* 2000; 20: 4030-4036.
- 22) Xu L. et al. *Eur J Pharmacol* 1997; 323: 59-68.
- 23) Shakesby A.C. et al. *J Neurosci* 2002; 22: 3638-3644.
- 24) Matsumoto M. et al. *Brain Res* 2004; 1022: 221-225.
- 25) Kojima T. et al. *Brain Res* 2003; 959: 165-168.
- 26) Tachibana K. et al. *Neurosci Lett.* 2004; 357: 91-94.
- 27) Matsumoto M. et al. *Psychopharmacol.* 2005; 179: 606-612.
- 28) Béique J-C. et al. *J. Neurosci.* 2004; 20: 4807-4817.
- 29) Zhang Z-W J. *Neurosci.* 2003; 23: 3373-3384.
- 30) Béique J-C. et al. *J. Physiol.* 2004; 556: 739- 754.
- 31) van Riel, E. et al. *Synapse* 2004; 53:11-19.
- 32) Gross C. et al. 2002; *Nature* 416: 396-400.