

慢性変動ストレスが誘発する情動変化と脳由来神経栄養因子との関連性

野原 淳¹⁾ 辻 稔¹⁾²⁾ 武田 弘志¹⁾²⁾
山田 朋子¹⁾ 松宮 輝彦¹⁾¹⁾東京医科大学薬理学講座²⁾国際医療福祉大学薬学部薬理学分野

【要旨】 うつ病等の情動障害の発症に関与するリスクファクターの1つとして、慢性的なストレス状況が挙げられる。また、近年、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) が、情動障害の病態生理や治療薬の作用機序と密接に関連していることが示唆されている。本研究では、情動障害の実験動物モデルと考えられている慢性変動ストレス刺激 (chronic variable stress: CVS) 負荷マウスの情動性と脳内 BDNF 発現量の変化について検討した。実験動物には ICR 系雄性マウスを用いた。CVS は、1日目: 拘束ストレス (2時間)、2日目: 電撃ストレス (5分間)、3日目: 絶水 (24時間)、4日目: 寒冷強制水泳ストレス (5分間)、5日目: 心理的ストレス (1時間)、6日目: 絶食 (24時間)、7日目: tail-pinch ストレス (5分間) を1クールとし、これを1クール (1週間)、2クール (2週間)、4クール (4週間) 負荷した。最終 CVS 負荷の24時間後に、hole-board 試験により CVS 負荷マウスの情動性を評価した。また、hole-board 試験終了直後に、大脳皮質前頭部、海馬、扁桃体、視床下部および中脳を摘出し、これら脳組織中に含まれる BDNF 量を ELISA 法より定量した。Hole-board 試験において、CVS の1週間および2週間負荷は、それぞれマウスの穴のぞき (head-dip) 行動の亢進と総移動距離 (locomotion) の低下を誘発した。これらの結果より、CVS は、負荷期間に依存した異なったタイプの情動変化を惹起することが明らかとなった。一方、これらの情動変化は、CVS を4週間負荷したマウスでは消失し適応現象が認められた。さらに、脳内 BDNF 量は、CVS の1週間負荷では大脳皮質前頭部および扁桃体で減少し、2週間負荷では扁桃体において増加した。これらの変化は4週間 CVS 負荷で消失した。したがって、BDNF が、慢性的なストレス刺激による情動異常の発現やストレス適応の形成において、重要な役割を担っている可能性が示唆された。

はじめに

めまぐるしく動的である現代社会は、高齢化、情報化、ハイテク化や国際化など、かつて類を見ない社会・経済環境の変革の中にあり、我々は日々、多種多様なストレスに曝露されている。そして、このように複雑化する社会状況を背景にして、ストレス性精神疾患が多発しかつ多様化していることから、これら疾患に対する適切な診断と治療プログラムの構築が切望されている。

従来から、ストレス刺激に対する生体の恒常性維持には内分泌系、神経系および免疫系が密接に関与し、相互に連携していることが知られている。例えば、ストレス刺激に対する生体応答は、脳において統合・処理され、神経機能変化、内分泌機能変化、免疫機能変化、情動変化などとして表出される。その中でも視床下部-下垂体-副腎系は、最も重要な内分泌系のストレス応答機構の1つである。その活性化に伴い遊離される適度な副腎皮質刺激ホルモン放出因子やグルココルチコイドは、生体がストレス刺激に対処する重要な

2008年12月15日受付、2009年2月10日受理

キーワード: 情動行動、hole-board 試験、慢性変動ストレス、脳由来神経栄養因子、マウス
(別冊請求先: 〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学薬理学講座 野原 淳)

防御因子と考えられている。また、中枢神経系では、 γ -aminobutyric acid、serotonin (5-HT) あるいは norepinephrine 作動性神経系などがストレス応答機構の中核を担っており、神経ステロイドも重要な役割を担っていることが広く知られている¹⁾²⁾。さらに近年、中枢神経系に発現するサイトカインおよび増殖因子の神経機能における役割が注目され、多角的に研究が進められている。その成果の累積により、これらの生理活性物質が脳高次機能を制御する重要な分子であることが証明されてきている³⁾⁴⁾。特に、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) は、その名の由来の通り脳内に豊富に発現する神経栄養因子の1つであるが、その生理学的意義は、従来考えられていた神経細胞の分化・発達・維持の機能分子という概念を越えて、情動機構に極めて重要な因子であることが明らかにされている。Lyons⁵⁾ らは、BDNF の遺伝子欠損マウスにおいて攻撃性の亢進が認められることを明らかにしている。また、Shirayama⁶⁾ らは、BDNF のラット脳内への投与により抗うつ様効果が発現することを報告している。さらに、臨床うつ病の治療に用いられる電気痙攣処置や抗うつ薬の投与を行ったラットの大脳皮質前頭部および海馬において、BDNF mRNA 発現量の増加が認められることが報告されている⁷⁾。これらの報告は、BDNF が情動障害の病態生理や治療薬の作用機序と密接に関連していることを強く示唆する。また、ストレスに関する基礎医学的研究において、ストレス曝露動物モデルの構築は大きな課題の1つである。1981年、Roth⁸⁾ らが報告した慢性変動ストレス (chronic variable stress: CVS) は、日々、我々が予期または回避し得ない様々なストレスに曝露されることをシミュレーションしたストレス曝露モデルであり、基礎医学的研究において繁用されるパラダイムの1つである。

本研究では、情動障害の発症機構における脳内 BDNF の役割を考究する目的で、情動障害の動物モデル

として繁用されている CVS 負荷マウスの情動行動の変化と脳内 BDNF 発現量との関連について行動学および神経化学的に検討した。

研究材料および方法

1. 実験動物

実験には、体重 20~30 g の健常な ICR 系雄性マウス (日本チャルスリバー) を用いた。マウスは予備飼育および実験期間を通じて、恒温恒湿条件下 (温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$) に固形飼料 (MF 固形飼料、オリエンタル酵母工業) および飲料水 (水道水) を自由に摂取させ、12 時間の明暗周期 (7 時点灯、19 時消灯) 下で飼育した。尚、本研究は、動物実験に関する日本薬理学会指針および東京医科大学動物実験指針を遵守して行った。

2. 慢性変動ストレス (CVS) の負荷

CVS は、Roth⁸⁾ の提唱した方法に準じてマウスに應用した。マウスに 7 種類のストレスを、Table 1 に挙げた順序で 1 日 1 回負荷した。1 日目: 拘束ストレス (2 時間)、2 日目: 電撃フットショックストレス (1.2 mA、1 秒、10 秒間隔、5 分間)、3 日目: 絶水 (24 時間)、4 日目: 強制水泳ストレス (4°C 、5 分間)、5 日目: 心理的ストレス (1 時間)、6 日目: 絶食 (24 時間)、7 日目: tail-pinch ストレス (5 分間) を 1 クールとした。これを 1 クール (1 週間)、2 クール (2 週間)、4 クール (4 週間) 負荷した群とそれぞれの対照群を作製した。なお、心理的ストレスは、コミュニケーションボックス法⁹⁾を用いて、電撃刺激を受けているマウスを観察させることにより負荷した。実験は、1 群 12 匹とし、体重、摂食量および摂水量を実験期間中連日測定した。

3. 情動性の評価

新奇環境におけるマウスの情動性の評価は、自動 hole-board 試験装置 (model ST-1、室町機械) を用いて行った¹⁰⁻¹⁴⁾。最終ストレス負荷の 24 時間後に、マウスを試験装置内に入れ、装置内における探索行動 (総

Table 1 Chronic variable stress procedure

DAY	Manipulation
DAY 1	Restraint stress (2 hr)
DAY 2	Foot shock stress (1.2 mA, 1 sec/10 sec, 5 min)
DAY 3	Water deprivation (24 hr)
DAY 4	Cold water swim stress (4°C , 5 min)
DAY 5	Psychological stress (1 hr)
DAY 6	Food deprivation (24 hr)
DAY 7	Tail-pinch stress (5 min)

} × {
 1 cycle (1 week)
 2 cycles (2 weeks)
 4 cycles (4 weeks)

移動距離 (locomotion)、立ち上がり行動 (rearing 行動) の回数および時間、穴のぞき行動 (head-dip 行動) の回数と時間および head-dip 潜時 (マウスが hole-board 試験装置に入れられた後、最初に head-dip 行動を示すまでの時間) などの探索行動を5分間測定した。

自動 hole-board 試験装置は、hole-board 装置本体 (model HT-001)、カラービデオ・トラッキング・システム (Comp ACT vas) (CCD カラーカメラ、カラートラッカー CAT-10、映像用モニター) およびデータ解析用パーソナルコンピューター (オペレーション・ソフトウェア Comp ACT HBS、解析用モニター) の3システムから構成されている。また、hole-board 装置本体は、縦 500 mm、横 500 mm、高さ 400-490 mm (可変) の灰白色角形ケージで、床面には中央より等距離に直径 30 mm (マウス用) の穴が4箇所設けられており、装置上方には CCD カラーカメラが、また床面の上方および下方には赤外線スキャニング方式の高性能センサーが取り付けられている。この CCD カラーカメラを介してマウスの locomotion が、また、床面上方の赤外線センサーにより rearing 行動の回数および時間が自動的に測定される。さらには、マウスが穴をのぞき込み赤外線をカットし、かつその時穴の位置にマウスの頭が存在することが CCD カラーカメラを介して確認された時のみ head-dip 行動としてみなされ、その回数と時間および head-dip 潜時が測定される。赤外線センサーおよび CCD カラーカメラを介して得られた信号は全てデータ解析用のパーソナルコンピューターに取り込まれ最終データが算出される。

4. 脳内脳由来神経栄養因子 (BDNF) 発現量の測定

情動性の評価直後にマウスを断頭瀉血致死させ、速やかに全脳を摘出した。摘出した脳は、Paxinos and Franklin の脳図譜¹⁵⁾に従い、大脳皮質前頭部、海馬、扁桃核、視床下部および中脳に分画し、抽出操作を行なうまで -80°C 下で凍結保存した。

各脳組織に20倍量 (w/v) の 137 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1% NP40 および 10% Glycerol を含む lysis buffer を加え、Teflon pestle 付きの Potter-Elvehjem tissue grinder を用いてホモジナイズした後、高速遠心 (10,000 g、10分間、 4°C) を行った。得られた上清に4倍量の 2.7 mM KCl、137 mM NaCl、1.5 mM KH_2PO_4 、8 mM Na_2HPO_4 、900 mM CaCl_2 および 50 mM MgCl_2 を含む DPBS (pH 3.0) を加えて希

釈し、さらに希釈液 50 μl あたり 1 μl の割合で 1N HCl を添加した後に、室温にて15分間インキュベーションした。その後、1N NaOH を加えて pH 7.5 に中和した後、遠心 (1,500 g、15分間、 4°C) を行った。得られた上清を試験サンプルとし、定量操作を行うまで -80°C 下で凍結保存した。それぞれの試験サンプル中に含まれる BDNF 量を、BDNF Emax[®] ImmunoAssay Systems (Promega) を用いて ELISA 法により定量した。

5. データ解析

実験結果は平均値±標準誤差で表示した。行動実験より得られた結果は、一元配置分散分析を行った後に、Student-Newman-Keuls 多重比較検定を用いて統計学的有意差検定を行った。また、神経化学の実験より得られた結果の統計学的有意差検定には Student's-t 検定 (両側検定) を採用した。

結 果

1. マウスの摂食量、摂水量および体重に及ぼす慢性変動ストレス刺激の影響

1) 摂食量と摂水量の変化

慢性変動ストレス (CVS) 負荷期間における摂食量および摂水量の推移を Fig. 1 (A-F) に示した。CVS 負荷期間において、絶食ストレス負荷の翌日には反動によると考えられる摂食量の増加が認められた。しかし、その他のストレス負荷による特記すべき変化は生じなかった (Fig. 1A, B, C)。また、絶水ストレス負荷により、絶食ストレス負荷と同様に、翌日の摂水量の増加が生じた。さらに、絶食ストレス負荷は摂水量の著しい増加を誘発した (Fig. 1D, E, F)。

2) 体重の変化

CVS 負荷期間における体重変化の推移を Fig. 2 (A, B, C) に示した。CVS 負荷群では、全群とも絶水および絶食ストレス負荷後に体重の減少を認めた。また、CVS の1週間負荷群では、負荷前と最終負荷24時間後との間には、特記すべき体重変化は生じなかったが、CVS の2および4週間負荷群では、対照群と比較して体重増加率に有意な減少が認められた (Fig. 2D, E, F)。

2. マウスの内分泌・免疫関連臓器重量に及ぼす慢性変動ストレス刺激の影響

CVS の1、2あるいは4週間負荷が各種内分泌・免疫担当臓器の重量に及ぼす影響を Table 2 に示した。CVS の1および2週間負荷により胸腺および脾臓重

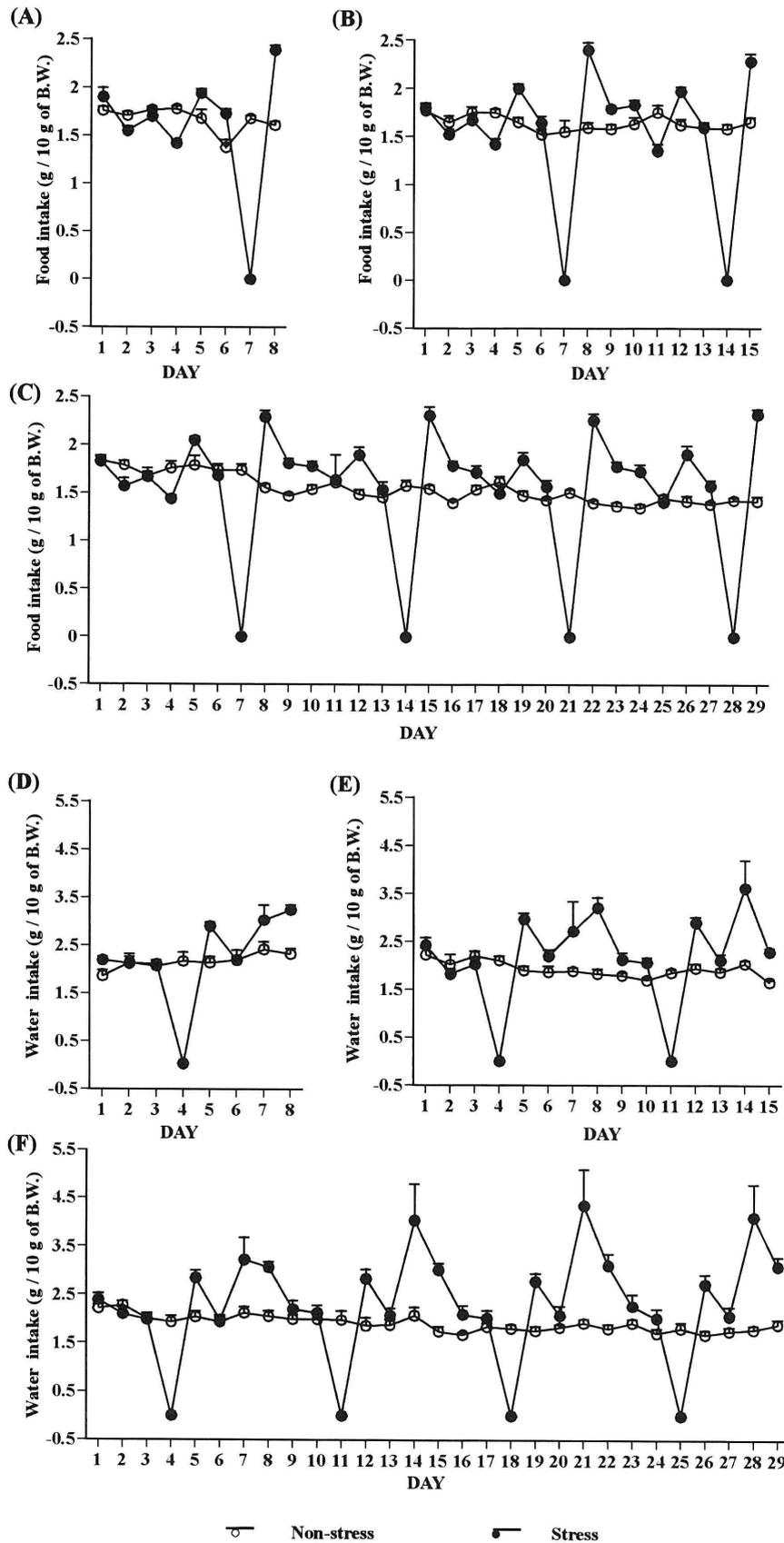


Fig. 1 Effects of exposure to chronic variable stress (CVS) on the food or water intake in mice. Panel A-C: Time-course pattern of food intake during exposure to CVS for 1 (A), 2 (B) and 4 (C) weeks. Panel D-F: Time-course pattern of water intake during exposure to CVS for 1 (D), 2 (E) and 4 (F) weeks. Each point represents the mean with S.E.M. of 12 mice.

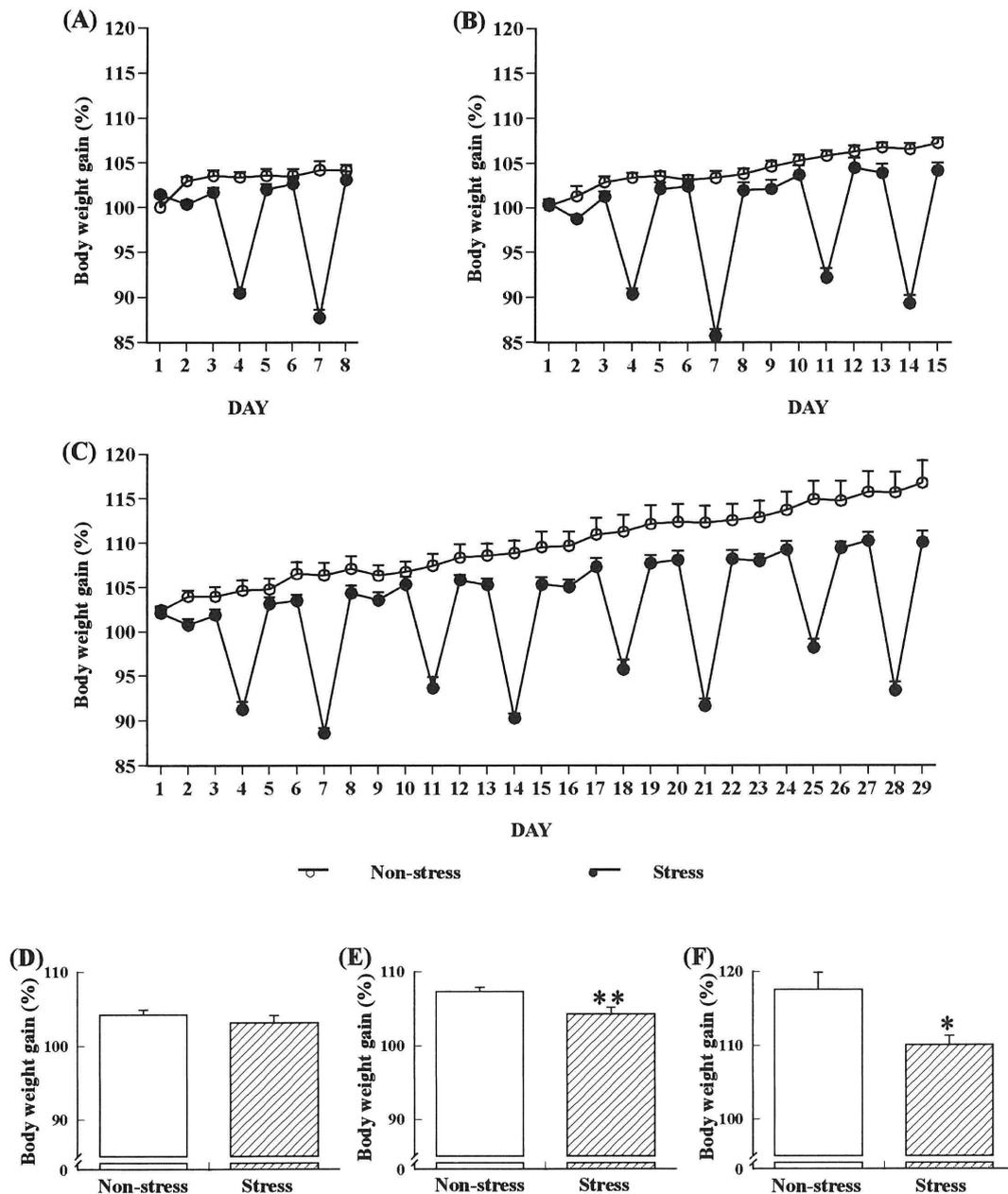


Fig. 2 Effects of exposure to chronic variable stress (CVS) on the body weight gain in mice. Panel A-C : Time-course pattern of body weight gain during exposure to CVS for 1 (A), 2 (B), 4 (C) week. Panel D-F : The body weight gain after exposure to CVS for 1 (D), 2 (E), 4 (F) week. Each point and column represents the mean with S.E.M. of 12 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Non-stress group.

量の有意な減少が認められたが、4週間負荷群では変化は生じなかった。一方、副腎の重量は、CVSの1、2および4週間負荷いずれによっても有意な影響を受けなかった。

3. マウスの情動行動に及ぼす慢性変動ストレス刺激の影響

CVSの1、2および4週間負荷による探索行動の変化をTable 3に示した。CVSの1週間負荷は、ホールボード装置内でのlocomotion、rearing行動に対して

何ら影響を生じさせなかった。しかし、head-dip回数とその行動時間を有意に増加した。また、CVSの2週間負荷は、locomotionを特異的かつ有意に減少した。一方、CVSの4週間負荷により、locomotion、rearing行動の回数と時間およびhead-dip行動の回数、時間、潜時など評価指標として用いた探索行動には特記すべき変化が認められなかった。

Table 2 Effect of exposure to chronic variable stress on the weight of organs of mice related to the immune (thymus and spleen) and endocrine (adrenal gland)

Group	Thymus	Spleen	Adrenal gland	(mg/10 g of B.W.)
Non-stress	16.7±1.3	33.8±2.1	1.8±0.08	
Stress (1 week)	11.6±0.7*	27.1±1.4*	1.7±0.06	
Non-stress	16.0±1.2	37.1±3.8	1.7±0.10	
Stress (2 weeks)	12.3±1.0*	26.9±0.8*	2.3±0.30	
Non-stress	12.9±0.9	33.1±1.8	1.4±0.10	
Stress (4 weeks)	10.5±1.1	30.2±2.4	1.5±0.10	

The organs were removed immediately after the measurement of exploratory behavior of mice on the hole-board. Each data represents the mean with S.E.M. of 11-12 mice. **p*<0.05 vs. non-stress group.

Table 3 Influence of exposure to chronic variable stress on exploratory behavior of mice estimated by the hole-board test

Group	Locomotion (cm)	Rearing		Head-dips		
		Counts	Buration (sec)	Counts	Duration (sec)	Latency (sec)
Non-stress	2,174.5±88.4	28.0±3.4	29.0±3.6	33.3±1.7	15.7±1.4	20.3±2.9
Stress (1 week)	2,273.8±76.5	25.3±2.6	28.9±4.0	44.2±3.0**	21.7±1.9*	26.9±4.8
Non-stress	2,263.4±68.3	26.4±2.4	27.7±3.6	36.1±3.8	17.6±1.7	28.2±5.1
Stress (2 weeks)	1,887.9±71.3**	26.1±2.5	30.0±3.8	34.8±3.3	17.5±2.2	41.1±16.2
Non-stress	2,043.5±110.2	22.5±2.2	22.7±2.8	45.1±1.5	25.7±1.2	21.4±3.4
Stress (4 week)	2,179.1±118.3	24.5±3.3	29.6±4.5	42.9±3.3	21.2±2.7	19.3±4.1

Mice were exposed to various types of stress stimuli for 1, 2 or 4 weeks. Twenty-four hours after the final stress stimulus, exploratory behavior of mice on the hole-board were measured for 5 min. Each datum represents the mean with S.E.M. of 11-12 mice. **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. non-stress group

4. マウス脳組織中の脳由来神経栄養因子 (BDNF) 量に及ぼす慢性変動ストレス刺激の影響

CVS の 1, 2 あるいは 4 週間負荷による各脳組織中の BDNF 量の変化を Fig. 3 (A-E) に示した。CVS の 1 週間負荷により大脳皮質前頭部および扁桃体における BDNF 量の有意な減少が認められた (Fig. 3A, B)。しかし、検討した他の脳部位では変化は生じなかった。さらに CVS の 2 週間負荷により、扁桃体における BDNF 量のみ有意な増加が認められた (Fig. 3B)。一方、CVS の 4 週間負荷群では、大脳皮質、扁桃体、海馬、視床下部および中脳内 BDNF 量に特記すべき変化が認められなかった。

考 察

現代社会はストレス社会ともいわれ、多種多様なストレス状況を作り上げている。このような社会背景により、ストレス関連疾患 (不安障害、感情障害、心身症など) が急増している。これらに対応すべく、ス

レス医学研究において、ストレス関連疾患の診断法や薬物療法の進展などを目的として、抗不安薬や抗うつ薬などの創薬や育薬研究、ストレス状況を把握するためのバイオマーカーの検索研究、さらには、ストレス関連疾患の遺伝子レベルでの病態生理学的研究まで幅広くかつ精力的に行われている。本研究では、ストレス性の情動障害の発症機構を病態生理学的に考究する一環として、CVS 負荷マウスの情動変化を行動薬理学的に検討し、さらにこの変化と脳内 BDNF との関連性について神経化学的に検討した。

CVS を 1, 2 あるいは 4 週間負荷したマウスの情動行動変化の特徴を多角的に解析した結果、1 週間の CVS 負荷により、locomotion や rearing 行動が何ら変化しないにもかかわらず、head-dip 回数と時間が著明かつ有意に増加した。このことから、1 週間の CVS 負荷は、マウスの衝動的な情動行動の亢進¹⁶⁾ を惹起することが考えられる。また、CVS の 2 週間負荷により、locomotion の減少のみが有意に生じたことから、マウスの自発活性が著明に抑制され、抑うつ状況に陥って

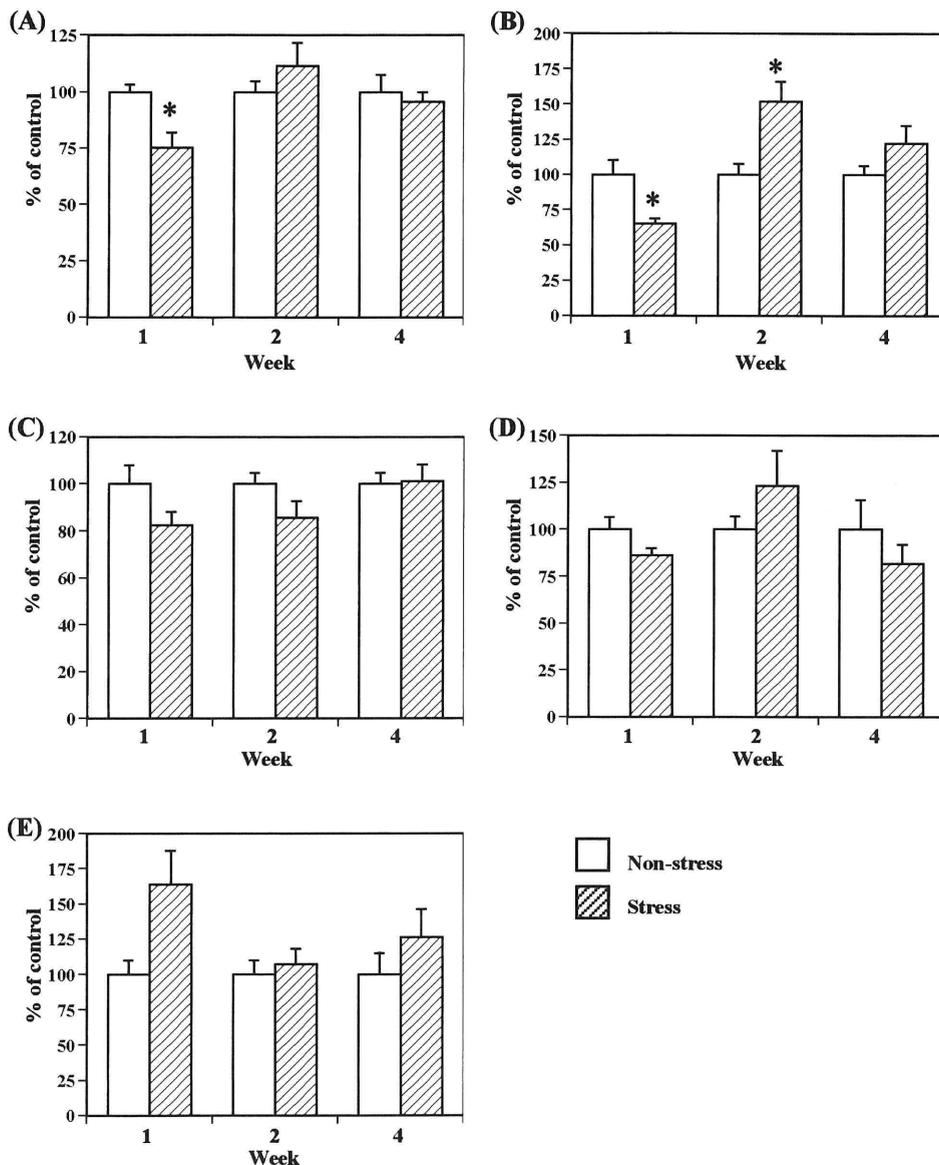


Fig. 3 Effects of exposure to chronic variable stress on the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the frontal cortex (A), amygdala (B), hippocampus (C), hypothalamus (D) and midbrain (E) of mice. Each column represents the mean with S.E.M. of 11-12 mice. * $P < 0.05$ vs. Non-stress group.

いる¹⁷⁾ことが考えられる。さらに、4週間のCVS負荷マウスにおいて、情動行動には何ら変化が認められなかった。この結果から、CVS負荷4週間では、すでに行動学的適応が形成されていることが示唆される。

一方、慢性的なストレス刺激は、脾臓・胸腺の萎縮や副腎の肥大を惹起することが知られている¹⁸⁾。本研究において、CVSの1および2週間負荷により脾臓および胸腺の有意な萎縮が認められたが、4週間のCVS負荷ではこれら臓器重量に何等変化は生じなかった。本結果より、CVSの1あるいは2週間負荷が誘発する身体的ストレス反応は、4週間負荷では消失することが明らかとなった。このことは、CVSの4週間負荷に

より、上記した情動面での適応のみならず身体的適応も形成されることを示唆する。

情動調節機構における脳内BDNFの重要性⁵⁻⁷⁾についての多くの報告が見られることを踏まえ、本研究では次に、情動調節に深く関わっていると考えられる各種脳部位(大脳皮質前頭部、海馬、扁桃体、視床下部および中脳)におけるBDNF発現量に及ぼすCVS負荷の影響について検討した。その結果、1週間のCVS負荷により、大脳皮質前頭部および扁桃体におけるBDNF発現量の減少が観察された。これまでに、BDNFの受容体であるTrkB受容体のノックアウトマウスが、衝動的情動行動を示すことが報告されてい

る¹⁹⁾。この報告や本研究の hole-board 試験における情動行動の結果から、1週間の CVS 負荷による大脳皮質前頭部および扁桃体の BDNF 発現量の減少が、衝動的行動の亢進に寄与していることが推察される。さらに、情動調節機構において脳内 5-HT 神経系が重要な役割を担っていることは広く示唆されている²⁰⁾²¹⁾が、近年、脳内 5-HT 神経系の機能低下が衝動的行動を亢進すること²²⁾、BDNF ヘテロノックアウトマウスの脳内では 5-HT 神経の機能低下が生じていること⁵⁾、5-HT 受容体の活性化が cAMP responsive element binding protein (CREB) を介した BDNF 発現に関与すること²³⁾が見出されている。したがって、1週間の CVS 負荷により脳内 5-HT 神経系の機能低下が引き起こされ、その結果、大脳皮質前頭部および扁桃体の 5-HT 受容体—CREB を介した BDNF 発現機構の減弱が惹起された可能性も推察される。また、CVS の 2 週間負荷では、1週間負荷とは異なり、扁桃体の BDNF 発現量においてのみ有意な増加が認められた。したがって、メカニズムの解明には今後詳細な検討が必要と考えるが、脳内 BDNF は、ストレス刺激の負荷期間に依存して多様な発現変動を示す特性を有していることが示唆される。実際これまでに、mRNA レベルでの発現を検討した研究でも、ストレス刺激の負荷期間を変えることにより、BDNF の異なった脳内発現が観察されることが報告されている²⁴⁾²⁵⁾。さらに、抗うつ薬の慢性投与が脳内の BDNF を誘導する、あるいは BDNF の脳内投与により抗うつ様効果が発現するとのこれまでの報告⁶⁾⁷⁾²³⁾を踏まえると、脳内 BDNF は抑うつ状態を緩解する作用を有する内因性生理活性物質であることが示唆される。したがって、2週間の CVS 負荷時に認められた扁桃体での BDNF 発現量の増加は、hole-board 試験において行動学的に観察された抑うつ症状に抵抗しようとする生体の恒常性維持反応である可能性が考えられる。一方、4週間の CVS 負荷によりストレスに対する適応が形成されたマウスにおいては、脳内の BDNF 発現量に有意な変化は認められなかった。このことは、慢性的なストレス刺激による情動異常の発現やストレスに対する適応の形成過程では BDNF が重要な役割を担っているが、ストレス適応の維持機構には関与していないことを示唆する。

脳内 5-HT 神経は縫線核に起始核を有し、不安や抑うつなどの情動の形成に重要な役割を果たす大脳辺縁系を中心に分布している。このような組織学的特徴な

どもあり、不安障害やうつ病などの情動障害の治療において、この 5-HT 神経を標的とする数多くの薬物が開発されてきている。最近、このような 5-HT 系精神疾患治療薬の作用機序が神経栄養因子や抗 apoptosis 分子の誘導、あるいは apoptosis 促進分子の阻害という形で整理されつつある。これらの流れは、5-HT 系精神疾患治療薬の神経細胞新生・神経細胞保護学説を提唱している。また、ストレス適応機構に 5-HT 神経系が極めて重要な役割を担うことや 5-HT_{1A} 受容体刺激がストレス抵抗性を誘導すること¹¹⁾¹²⁾¹⁴⁾、さらに、5-HT_{1A} 受容体と BDNF の機能的連関が情動調節に重要な役割を担うなどの報告²⁶⁾は、本研究で得た CVS 負荷過程におけるマウスの情動行動の変化や適応形成には、脳内 5-HT 神経と BDNF の機能的連関システムが深く関与していることを示唆する。

以上を総括すると、CVS 負荷は、その負荷期間により異なった情動変化を誘発することが明らかとなった。また、この情動変化の発現機序の一部には、大脳皮質前頭部および扁桃体における BDNF が関与することが示唆される。さらに、BDNF は、CVS 負荷に対する適応の形成過程に関連するが、形成された適応の維持には関与しないことが推察される。

結 論

不安障害、うつ病などの情動障害の発症に関与するリスクファクターの 1 つとして、慢性的なストレス状況が挙げられる。また、最近の基礎ならびに臨床医学的検討により、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が、情動障害の病態生理や治療薬の作用機序と密接に関連していることが示唆されている。これらを踏まえ、本研究では、慢性変動ストレス刺激 (CVS) 曝露マウスの情動行動変化の特徴と、脳内 BDNF 発現量との関連について検討した。

1. CVS1、2 あるいは 4 週間負荷群において、絶水および絶食ストレス負荷後に体重の減少を認めた。また、CVS の 2 および 4 週間負荷群では、対照群と比較して体重増加率に有意な減少が認められた。
2. CVS の 1 および 2 週間負荷により脾臓および胸腺重量の有意な減少が生じたが、4 週間負荷群では変化は認められなかった。一方、副腎の重量においては、CVS の 2 週間負荷により増加傾向を示すものの、全負荷群において有意な変化は認められなかった。

3. CVSの1週間負荷により head-dip 回数および時間の有意な増加を観察した。また、CVSの2週間負荷により自発運動の有意な低下が認められた。4週間負荷群において検討した情動行動には何ら変化が認められなかった。
4. CVSの1週間負荷により大脳皮質前頭部および扁桃体における BDNF 量の有意な減少が生じた。また、CVSの2週間負荷により、扁桃体の BDNF 量の有意な増加が認められたが、4週間負荷群ではなんら変化は観察されなかった。

以上の結果より、1および2週間の CVS 負荷は、負荷期間に依存した異なったタイプの情動変化を惹起することが明らかとなった。また、4週間の CVS 負荷では、ストレスに対する適応が形成されることが明らかとなった。さらに、脳内 BDNF についても、1および2週間の CVS 負荷で認められた変化が、4週間の CVS 負荷で消失したことから、慢性的なストレス刺激による情動異常の発現やストレス適応の形成過程において、BDNF が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Magarinos AM, Verdugo JM, EcEwen BS: Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14002-14008, 1997
- 2) Magarinos AM, EcEwen BS: Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* **69**: 89-98, 1995
- 3) Schinder AF, Poo M: The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **23**: 639-645, 2000
- 4) Poo M: Neurotrophins as synaptic modulator: *Nat Rev Neurosci* **2**: 24-32, 2001
- 5) Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L: Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 15239-15244, 1999
- 6) Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS: Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* **22**: 3251-3261, 2002
- 7) Nibuya M, Morinobu S, Duman RS: Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* **15**: 7539-7547, 1995
- 8) Roth KA, Katz RJ: Further studies on a novel animal model of depression: therapeutic effects of a tricyclic antidepressant. *Neurosci Biobehav Rev* **5**: 259-264, 1981
- 9) Kamei J, Ohsawa M: Socio-psychological stress-induced antinociception in diabetic mice. *Psychopharmacology* **149**: 397-400, 2000
- 10) Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T: Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* **350**: 21-29, 1998
- 11) Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T: Different effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: a study using the hole-board test. *Psychopharmacology* **152**: 157-166, 2000
- 12) Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T: Protective effects of 5-HT_{1A} receptor agonists against emotional changes produced by stress stimuli are related to their neuroendocrine effects. *Br J Pharmacol* **134**: 585-595, 2001
- 13) Takeda H, Tsuji M, Fujisawa Y, Yamada T, Tsuji K, Egashira T, Matsumiya T: Intracerebroventricular administration of endothelin-1 impairs the habituation of rats to a novel environment in conjunction with brain serotonergic activation. *Neuroscience* **117**: 449-460, 2003
- 14) Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T: Brain of 5-HT_{1A} receptors as important mediators in the development of stress adaptation. *Curr Neuropharmacol* **1**: 315-324, 2003
- 15) Paxinos G, Franklin KBJ: The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego 2nd ed, Academic Press, 2001
- 16) Kamei J, Hirose N, Oka T, Miyata S, Saitoh A, Yamada M: Effects of methylphenidate on the hyperemotional behavior in olfactory bulbectomized mice by using the hole-board test. *J Pharmacol Sci* **103**: 175-180, 2007
- 17) Echandía EL, Broitman ST, Fóscolo MR: Behavioral responses of high and low active male rats to the chronic ingestion of desipramine. *Pharmacol Biochem Behav* **22**: 917-920, 1985
- 18) Selye H: Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* **138**: 32, 1936
- 19) Zörner B, Wolfer DP, Brandis D, Kretz O, Zacher C, Madani R, Grunwald I, Lipp HP, Klein R, Henn FA, Gass P: Forebrain-specific trkB-receptor knockout mice: behaviorally more hyperactive than depressive. *Biol Psychiatry* **54**: 972-982, 2003
- 20) Bauer M, Heinz A, Whybrow PC: Thyroid hormones, serotonin and mood: of synergy and significance in the adult brain. *Mol Psychiatry* **7**: 140-156, 2002
- 21) Jones BJ, Blackburn TP: The medical benefit of

- 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* **71**: 555-568, 2002
- 22) Pattij T, Vanderschuren LJ: The neuropharmacology of impulsive behavior. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 192-199, 2008
- 23) Duman RS: Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. *Biol Psychiatry* **44**: 324-335, 1998
- 24) Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM: Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* **15**: 1768-1777, 1995
- 25) Rage F, Givalois L, Marmigère F, Tapia-Arancibia L, Arancibia S: Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neuroscience* **112**: 309-318, 2002
- 26) 辻 稔、武田弘志、榎屋二郎、飯森真喜雄、松宮輝彦: ストレス抵抗性と 5-HT_{1A} 受容体-脳由来神経栄養因子 (BDNF) 関連システム。 *ストレス科学* **17**: 222-230, 2003

Relationship between emotional changes induced by chronic variable stress and the brain-derived neurotrophic factor in mice

Jun NOHARA¹⁾, Minoru TSUJI¹⁾²⁾, Hiroshi TAKEDA¹⁾²⁾,
Tomoko YAMADA¹⁾, Teruhiko MATSUMIYA¹⁾

¹⁾Department of Pharmacology, Tokyo Medical University

²⁾Division of Pharmacology, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, International University Health and Welfare

Abstract

It is well known that the chronic stressful situation is one of the risk factors underlying the induction of emotional disorders including depression. Increased evidence suggests that the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a member of the neurotrophin family, may play an important role in the pathophysiology and treatment of emotional disorders. The aim of the present study was to examine the changes in emotionality as well as the levels of BDNF in the brains of mice that have been exposed to the chronic variable stress (CVS). The schedule of exposure to CVS was as follows: Day 1, restraint stress (1 hr); Day 2, foot shock stress (5 min (intensity 1.2 mA, duration 1 sec, interval 10 sec)); Day 3, water deprivation (24 hr); Day 4, cold swimming stress (5 min (4°C)); Day 5, psychological stress (1 hr); Day 6, food deprivation (24 h); Day 7, tail-pinch stress (5 min). Mice were exposed to CVS for 1, 2 or 4 cycles (i.e. 1, 2 or 4 weeks). Twenty-four hours after the final exposure to CVS, the emotionality of mice was estimated by the hole-board test. Then, the brains of mice were rapidly removed and dissected into five brain regions (frontal cortex, amygdala, hypothalamus, hippocampus and midbrain). The concentration of BDNF in the brain regions were analyzed by ELISA. Exposure to CVS for 1 and 2 weeks produced an increase in head-dipping behavior and a decrease in locomotor activity, respectively. These results suggest that CVS may induce different types of emotional abnormalities depend on the duration of stress exposure. On the other hand, exposure to CVS for 4 weeks did not induce any behavioral changes, indicating the development of stress adaptation. Furthermore, exposure to CVS for 1 week produced a significant decrease in BDNF level in the frontal cortex and amygdala. In contrast, BDNF levels in the amygdala significantly increased after exposure to CVS for 2 weeks. These biochemical changes also diminished by exposure to CVS for 4 weeks. It is therefore suggested that BDNF may have a critical role in chronic stress-induced emotional abnormalities as well as the development of stress adaptation.

<Key words> Emotional behavior, Hole-board test, Chronic variable stress, Brain-derived neurotrophic factor, Mice
