

PTSD モデルラットのレジリエンス・脆弱性に関
する行動科学的検討と、その生物学的基盤に
関する検討

たに ち まさあき
谷知 正章

(精神科学専攻)

防衛医科大学校

平成 30 年度

目次

単語・略語説明	1
第1章 緒言	2
第2章 研究1	7
第1節 背景と目的	7
第2節 対象及び方法	8
第1項 動物	8
第2項 不可避フットショックストレス	9
第3項 飼育環境	10
第4項 行動実験	11
第5項 リアルタイム PCR	12
第6項 データ処理及び統計法	13
第3節 結果	13
第1項 2週間良環境飼育が PTSD モデルの行動に与える影響	13
第2項 2週間良環境飼育が脳内 mRNA 発現に与える影響	14
第3項 それぞれの mRNA と行動実験結果との相関関係	15
第4節 考察	16
第3章 研究2	20

第 1 節 背景と目的.....	20
第 2 節 対象及び方法.....	21
第 1 項 動物.....	21
第 2 項 母子分離ストレス.....	22
第 3 項 不可避フットショックストレス.....	22
第 4 項 行動実験.....	23
第 5 項 拘束ストレス.....	23
第 6 項 血清 corticosterone 濃度測定.....	23
第 7 項 リアルタイム PCR.....	24
第 8 項 データ処理及び統計法.....	24
第 3 節 結果.....	24
第 1 項 成長後の行動に、母子分離ストレスが与える影響.....	24
第 2 項 成長後のストレス負荷による経時的な血清 corticosterone 濃度に、 母子分離ストレスが与える影響.....	25
第 3 項 成長後のストレス負荷による経時的な海馬、扁桃体、内側前頭前皮 質における FKBP5, BDNF, GDNF mRNA 発現量に、母子分離ストレスが 与える影響.....	26
第 4 項 血清 corticosterone 濃度と海馬、扁桃体、内側前頭前皮質における	

FKBP5, BDNF, GDNF mRNA 発現量との相関関係.....	30
第4節 考察	31
第4章 結論.....	35
謝辞	36
引用文献.....	37
図表	49

単語・略語説明

AFR, animal facility rearing

BDNF, brain-derived neurotrophic factor

EE, environmental enrichment

EGF, epidermal growth factor

FGF2, fibroblast growth factor-2

FKBP5, FK506 binding protein 5

GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor

GR, glucocorticoid receptor

HPA axis, hypothalamic-pituitary-adrenal axis

IS, inescapable stress

LH, learned helplessness

mPFC, medial prefrontal cortex

MS, maternal separation

NGF, nerve growth factor

PTSD, post-traumatic stress disorder

RW, running wheel

VEGF, vascular endothelial growth factor

第1章 緒言

砲弾ショック (Shell Shock) や戦争神経症(1)などと呼ばれていた精神障害は、1970年代にベトナム戦争帰還米兵のポストベトナム症候群(2)やレイプ被害者のレイプトラウマ症候群(3)などと報告されたものと臨床的に同一のものと考えられ、心的外傷後ストレス障害 (Post-traumatic stress disorder, PTSD) として統括された。米国精神医学会による最新の診断基準(4)によると PTSD とは、実際にまたは危うく死ぬ、重傷を負う、性的暴力を受ける出来事への曝露が原因となり、侵入症状、回避症状、認知と気分の陰性変化、覚醒度と反応性の著しい変化が1カ月以上続くもの、と定義されている。さらにストレスはこれらの心的な影響のみならず、身体的な反応も引き起こす。近年は PTSD の併存疾患として、心血管疾患やガンなどの報告もなされており、PTSD を全身疾患として位置付けようとする動きもある(5-7)。

精神疾患の動物モデルは、表面妥当性、構成概念妥当性、予測妥当性を全て満たすものが理想的な動物モデルとされている(8)。このため、PTSD の動物モデルには、ストレッサーが2方向性の行動変化を引き起こすことが表面妥当性として必須とされてきた。2方向性とは、回避・麻痺様の活動性低下と、刺激に対して強調された過覚醒様の過活動である(9)。一般的には、恐怖条件付けスト

レスモデルや Single prolonged stress モデルなどが PTSD の動物モデルとして使用されているが、我々は学習性無力 (Learned helplessness, LH) モデルで知られるシャトル箱法 (図 1) を用いて 3 つの妥当性を満たし、かつ 2 方向性の行動変化をもたらすシャトル箱法 PTSD モデルラットを作成してきた(10, 11)。最新の診断基準に定義されている症状を適用すると、侵入症状、回避症状、認知と気分の陰性変化が「活動性の低下」、覚醒度と反応性の著しい変化が「過覚醒様の過活動」として見なされる。シャトル箱法ではトラウマに相当する逃避不能ストレス (Inescapable shock, IS) の翌日に行動試験を行うと LH ラットが一定数発生するが、我々のシャトル箱法 PTSD モデルラットでは IS の 2 週間後 (ヒトの 1 カ月以上に相当) に行動試験を行うことで、LH のような 1 方向性の行動変化を示すラットはほぼ発生せず、一定の割合で 2 方向性の行動変化を来すことが特徴となっている(12)。

同一のトラウマに曝露されても、トラウマ反応の程度や持続期間は個体によって様々で、PTSD に至る場合も至らない場合もあり、これには脆弱性やレジリエンスの要因が複雑に影響している。例えば、良環境飼育は PTSD に治療的効果を有する、という好ましい環境によるストレス耐性の強化を示唆する報告がある(13-15)。一方で、逆境的な養育環境によるストレス耐性の低下を示唆する報告もある(16, 17)。よって、PTSD の回復につながるレジリエンス増強のメ

カニズムを検討する目的で良環境飼育（図 2）を、発症や増悪につながる脆弱性のメカニズムを検討する目的で母子分離（Maternal separation, MS）ストレス（図 3）を用いて、シャトル箱法による PTSD モデルへの行動科学的検討を行った。

さらに PTSD のレジリエンス・脆弱性に関する生物学的基盤として、先行研究で幅広く知見が集められているのが脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor, BDNF）を始めとする神経栄養因子である。BDNF は慢性的なストレスによる発現量低下、抗うつ薬投与による発現量増加、抗うつ作用などの報告が多く(18-20)、海馬のニューロンに対する形態学的な影響も持つため、記憶や学習の形成に関与する神経可塑性仮説においても重要な役割を持つとされている(21)。うつ病のバイオマーカー候補としての期待(22)、運動による海馬の BDNF 増加(23)、糖代謝への関与(24)、PTSD については Val66Met という一塩基多型がリスクとなるという報告があるが(25)、それでも現状ではまだ一定した見解に至っていない。

ストレス反応には視床下部 - 下垂体 - 副腎 (Hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 系が関与している(26)。コルチゾールはストレスにより上昇し、HPA 系を介してネガティブフィードバックの制御を受ける。一方で、制御されなければ高コルチゾールを引き起こして抑うつ、高血圧、骨粗しょう症、インスリン

抵抗、冠動脈疾患などの全身性作用を有するため、ストレスレジリエンス・脆弱性の生物学的基盤に関与していると指摘される(27)。PTSD では HPA 系のネガティブフィードバックの障害がその病態に深く関与し(26)、コルチゾールや HPA 系の日内変動が変化して睡眠障害を引き起こすという報告(29)もある。そこで我々は、HPA 系のネガティブフィードバックに関与するバイオマーカーに着目した。一般的にはストレスを感知すると、HPA 系においては視床下部から corticotrophin-releasing factor が分泌され、それに伴って下垂体前葉から分泌される adrenocorticotrophic hormone を介して、glucocorticoid が副腎から分泌される。血中や脳脊髄液中で glucocorticoid 濃度が上昇すると、海馬の glucocorticoid receptor (GR) を介して corticotrophin-releasing hormone の分泌が抑制され、ネガティブフィードバックが成立する(21)。この HPA 系における glucocorticoid の核内移行を調整する機能を有し、その遺伝多型と幼少期ストレスの相互作用によって PTSD のリスクを上昇させる、とされている FKBP5 binding protein 5 (FKBP5) に着目し(26, 30)、ストレス反応性における脆弱性やレジリエンスへの影響について、神経栄養因子と FKBP5 を対象に検討することとした。なお、解析領域はこの GR が作用する海馬に加え、PTSD の病態に扁桃体の過剰反応や内側前頭前皮質の機能不全が深く関与すると言われているため(26)、海馬、扁桃体、内側前頭前皮質を対象とした。

我々は IS 後 2 週間の良環境飼育が回避・麻痺行動を改善させ、海馬の BDNF を増加させたと過去の研究で報告した(31)。しかし自発運動の促進による影響が強い可能性を懸念し、良環境飼育における自発運動促進のための running wheel (RW) と、感覚刺激増加のための toys の構成要素それぞれが、シャトル箱法 PTSD モデルのレジリエンスにどう影響しているのか、そしてまだ良環境飼育との関連では報告のなかった FKBP5 が変化しているかどうか、研究 1 として検討した。次いで、幼少期ストレスとして母子分離ストレスをシャトル箱法 PTSD モデルラットに負荷することで脆弱因子になるものと仮定し、その背景に BDNF や FKBP5 がどう影響しているか、研究 2 として検討した。

第 2 章 研究 1

第 1 節 背景と目的

環境を整えることが身体的にも心理的にも健康を維持する上で重要であるとされている。特に PTSD は精神疾患の中でもトラウマが直接的に引き起こした結果であり、環境要因のサポートは重要である(32)。環境要因が及ぼすレジリエンスの観点で PTSD のストレス耐性に関する病態生理を明らかにするため、PTSD 動物モデルにおいては良環境飼育が代表的に用いられる。良環境飼育は自発運動を促進する RW や感覚刺激を促進する toys が入った大きなケージで飼育され、抗うつ作用(33)、抗不安作用(34)、学習能力の向上(35)、神経栄養因子の増強(36)など、幅広い作用を発揮することが知られている。しかしながら、運動が神経栄養因子を増やしたり、神経新生を促進したりするという報告もあり(37-39)、代表的な神経栄養因子である BDNF に関しても RW と toys で異なるエクソンを介して発現に影響するという報告もある(40)。不可避フットショックストレスから 2 週間後の行動試験までの間に、良環境飼育を処置すると回避・麻痺様行動が改善し、海馬の BDNF 発現量が増加した(31)と我々は過去に報告したが、この点での検討をしていなかった。そのため、本研究では、良環境飼育における RW と toys それぞれの効果を検討することを目

的とした。また、シャトル箱法による行動面への影響と、PTSD の病態生理に重要な役割を果たすと指摘されている海馬、扁桃体、内側前頭前皮質の 3 部位における複数の神経栄養因子の mRNA 発現量を測定した。さらに、PTSD には HPA 系における GR 伝達の破綻も重要な意義を持ち(26)、ストレスレジリエンスには HPA 系が強く関与するという指摘もある(27)。そこで HPA 系の制御因子として近年注目を浴びており、GR と複合体を形成する heat shock protein 90 のコシャペロンとして GR の感受性を調整する、FKBP5 の mRNA も測定した。

第 2 節 対象及び方法

第 1 項 動物

雄性の 6 週齢 Wistar ラット (Clea Japan, 東京、日本) を購入した。明暗周期、温度、湿度はコントロールされ (24℃、55%)、食餌と水は自由に摂取できるような環境で飼育された。全ての動物の扱いは NIH Methods and Welfare Consideration in Behavioral Research with Animal (<http://www.nimh.nih.gov/researchFunding/animals.cmf>) に基づいて行われた。また本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認のもとに行われた。

7 週齢でフットショックによる約 30 分間の不可避ストレス (IS) を全てのラットに負荷し、その後の 2 週間を 良環境飼育 (Environmental enrichment, EE) 群 $n = 18$ 、RW 群 $n = 18$ 、Toys 群 $n = 18$ 、通常飼育 control 群 $n = 17$ に分けて飼育した。IS から 15 日目に行動実験として回避・逃避試験を行った。試験終了直後に断頭し、速やかにブレインスライサ (Muromachi, 東京、日本) を用いて脳を厚さ 1mm の切片に切り分け、海馬、扁桃体、内側前頭前皮質を摘出して -80°C で保管した。

第 2 項 不可避フットショックストレス

全てのラットに対して 7 週齢で IS を与えた。ビデオカメラでモニターされたシャトル箱 (MED Associates、Albans、VT、米国) を薄暗い環境下に設置した。シャトル箱 ($20 \times 46 \times 20\text{cm}$) は開閉式の中央ゲートによって 2 部屋に仕切られている (図 1)。床はステンレス製の棒でできており (1cm 間隔で 26 本) そこから電撃フットショックが伝わる。シャトル箱の中央ゲートを閉じて、ラットを左の部屋において逃避不可能な状態で、15 秒間持続する 0.8mA の電撃フットショックを、各々のフットショックの間隔を平均 15 (± 7.5) 秒に設定し、合計 60 回、約 30 分間にわたり、強制的かつ無作為の間隔で与えた。この際、側壁のシグナルランプは常時消灯されたまま

であり、ラットには条件刺激が一切呈示されないようになっている。

第3項 飼育環境

EE 群、RW 群、Toys 群は大きいケージ (40 × 54 × 30 cm) に道具を入れて6匹で飼育した (図2)。EE 群は2つの木のブロック (大; 5 × 5 × 5 cm、中; 3.8 × 3.8 × 3.8 cm、小; 3.1 × 3.1 × 3.1 cm)、2つの玩具 (9.5cm の骨の形をしたプラスチック; 緑の風味なし、ベーコン風味、ナチュラル風味の3種類、7.7cm の円筒形プラスチック; サイクロンチュー)、小屋 (赤、幅 15cm、高さ 3.5cm)、待避所 (幅 9cm、長さ 15cm の四角の筒。赤、黄、青の3色)、トンネル (直径 7.5cm、長さ 15cm の円の筒。赤、黄のプラスチック製2種類と、紙製の計3種類)、クローボール (直径 10cm の球状のプラスチックに直径 6cm の穴があいている。赤、黄の2色) (Animec、東京、日本)、回し車 (幅 10cm、直径 24cm) (Sanko、東京、日本) の9つの道具を入れた。RW 群は回し車1つのみ、Toys 群は回し車以外の道具8つを入れた。道具は週2回交換した。Control 群は標準サイズの飼育ケージ (25 × 40 × 20cm) に3ないし4匹で飼育した。全ての動物は床敷や道具を交換するために必要なとき以外のハンドリングは行わなかった。

第4項 行動実験

IS 負荷の 15 日後、全てのラットは IS 負荷に用いたシャトル箱で回避・逃避試験を行った。シャトル箱の中央ゲートは常にかかれており、壁にはラットの位置や動きを感知する 4 つのセンサーがついている。回避・逃避試験の前の 5 分間、シャトル箱に対する順応期間が与えられ、両方の区画を行き来できる。順応期間中の中央ゲート通過数を「順応期門通過数 (crossing during adaptation)」として記録した。5 分間の順応後、セッションが開始される。側壁にシグナルランプがあり、各フットショックの 5 秒前に光刺激が条件刺激として与えられる。5 秒後フットショックが 0.8mA で最大 15 秒与えられる。条件刺激中、あるいはフットショック中にラットが隣の区画へ移動した場合、即座にそのセッションは終了し、光刺激とフットショックは止まる。ラットが隣の区画へ移動できなかった場合、15 秒間で光刺激とフットショックは終了する。セッションは 3 つに区切られる。①条件刺激 5 秒間、②最大 15 秒間のフットショック、③15±7.5 秒間のランダムな次のセッションまでの間隔、である。この一連のセッションは計 80 回行われた。もしラットが①で隣の区画へ移動した場合、その回数を「回避数 (Avoidance)」として、③で隣の区画へ移動した場合、その回数を「ショック間門通過数 (Unnecessary crossings)」として、全てのフットショック

刺激時間を合わせて「総刺激時間 (Total stimulation duration)」として記録した。観察者は 1 人に固定した。実験は午前 9 時から午後 5 時までに実施した。

第 5 項 リアルタイム PCR

海馬、扁桃体、内側前頭前皮質を切り分け (図 4)、それぞれから、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) を用いて cDNA に逆転写した。Light Cycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) を用いて、Light Cycler 480 (Roche) にてリアルタイム PCR を行った。全ての試料は三重測定した。PCR の条件は 50°C2 分と 95°C10 分の後、95°C15 秒と 60°C1 分を 40 サイクルとした。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をコントロール遺伝子として使用した。測定サンプルは、コントロール遺伝子と同時に PCR 反応を行った。測定サンプルの相対濃度は、標準サンプルから作成した標準曲線を用いて計算し、代表的な神経栄養因子として BDNF (エクソン I, II, IV, VI も含む)、Nerve growth factor (NGF)、Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)、

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)、Epidermal growth factor (EGF)、そして FKBP5 の相対濃度を GAPDH の相対濃度で除して割合を計算した。各々の遺伝子のプライマーの塩基配列を表に示した。

第 6 項 データ処理及び統計法

統計解析ソフトは SPSS version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, 米国) を使用した。それぞれの mRNA 発現のレベルは GAPDH により標準化された。統計解析には one-way ANOVA を実施し、post-hoc Tukey's test による多重比較を行った。回避・逃避試験の結果と mRNA 発現量との相関解析には Pearson の相関分析を実施した。全てのデータは平均値±標準誤差で表示した。また、全ての検定において $p < 0.05$ の場合に、統計学的有意差があるものとした。

第 3 節 結果

第 1 項 2 週間良環境飼育が PTSD モデルの行動に与える影響

Control 群、EE 群、RW 群、Toys 群の 4 群における one-way ANOVA を実施したところ、「順応期門通過数」($F_{(3, 67)}=3.62, p < 0.05$)、「回避数」($F_{(3, 67)}=3.44, p < 0.05$)、「総刺激時間」($F_{(3, 67)}=3.30, p < 0.05$) で群間の主効果

に有意な差を認めた。Post-hoc Tukey's test で、control 群と比較して、EE 群は「回避数」($p < 0.05$) が有意に増加し、「順応期門通過数」($p < 0.10$) が増加傾向を、「総刺激時間」($p < 0.10$) が短縮傾向を示した。Control 群と比較して、RW 群は「順応期門通過数」($p < 0.05$) と「回避数」($p < 0.05$) が有意に増加し、「総刺激時間」($p < 0.05$) が有意に短縮した。Control 群と比較して、Toys 群は「順応期門通過数」($p < 0.05$) が有意に増加し、「回避数」($p < 0.10$) が増加傾向、「総刺激時間」($p < 0.10$) が短縮傾向を示した。EE 群、RW 群、Toys 群の 3 群に関してはいずれの指標でも差は認められなかった (図 5)。

第 2 項 2 週間良環境飼育が脳内 mRNA 発現に与える影響

4 群における one-way ANOVA の結果、海馬では BDNF ($F_{(3, 28)}=9.71$, $p < 0.001$)、GDNF ($F_{(3, 28)}=11.59$, $p < 0.001$)、NGF ($F_{(3, 28)}=4.10$, $p < 0.05$)、FKBP5 ($F_{(3, 28)}=5.17$, $p < 0.01$) で主効果に有意な差を認めた。扁桃体では NGF ($F_{(3, 28)}=10.52$, $p < 0.001$)、VEGF ($F_{(3, 28)}=10.52$, $p < 0.001$)、FGF2 ($F_{(3, 28)}=13.51$, $p < 0.001$)、FKBP5 ($F_{(3, 28)}=5.17$, $p < 0.01$) で有意な差を、内側前頭前皮質では NGF ($F_{(3, 28)}=6.17$, $p < 0.01$) で有意な差を認めた (図 6)。

Post-hoc Tukey's test によると、海馬では BDNF、GDNF が、EE 群と RW 群で他の 2 群より有意に高かった。NGF が RW 群で Toys 群より有意に高く、FKBP5 が Toys 群で他の 3 群より有意に低かった。扁桃体では NGF と VEGF が EE 群で他の 3 群より有意に高く、FGF2 が RW 群では control 群や EE 群より有意に高かった。FKBP5 は Toys 群では control 群や RW 群より有意に低かった。内側前頭前皮質では NGF が control 群で他の 3 群より高かった。

さらに BDNF のエクソンを解析したところ、one-way ANOVA で海馬のエクソン I ($F_{(3, 28)}=5.93, p < 0.01$) とエクソン II ($F_{(3, 28)}=13.32, p < 0.001$) で群間の主効果に有意な差を認めた。Post-hoc Tukey's test によると、エクソン I、II はともに EE 群で control 群と Toys 群より有意に高く、さらにエクソン II は RW 群で Toys 群より有意に高かった (図 7)。

第 3 項 それぞれの mRNA と行動実験結果との相関関係

行動試験の結果と、第 2 項で有意となったそれぞれの mRNA との相関関係を比較した。EE 群、RW 群、Toys 群はそれぞれ行動試験の結果に顕著な差を認めなかったため、これらの 3 群を合わせて ($n=24$) 全 EE 群とした。

全 EE 群では、「順応期門通過数」と海馬の BDNF ($r=0.455, p < 0.05$)、

GDNF ($r=0.422$, $p < 0.05$) で正の相関が認められた。他に有意な組み合わせは認められなかった (図 8)。

第 4 節 考察

今回の EE, RW, Toys の処置によって、回避・麻痺行動の指標となる、「順応期門通過数」は control 群と比較して、いずれも有意な上昇、もしくは上昇傾向を認めた。しかし過覚醒行動を示す「ショック間門通過数」は差を認めなかった。「回避数」は control 群と比較して、有意な上昇、もしくは上昇傾向を認めた。一方で、抑うつ反応を示す「総刺激時間」は有意な短縮、もしくは短縮傾向を認めた。EE 群、RW 群、Toys 群の 3 群間ではいずれの行動試験の結果も主効果で有意な差を認めず、RW と Toys の両方を備えた良環境飼育の行動科学的影響とは差がなかった、と解釈できる。いずれの処置においても、回避・麻痺行動と抑うつ反応は有意な改善、もしくは改善傾向となったが、過覚醒行動については改善効果が認められなかった。「回避数」に至ってはむしろ有意に増悪、もしくは増悪傾向とも解釈できるが、過覚醒行動を評価するもう一方のパラメーターである「ショック間門通過数」は有意ではないため、過覚醒行動への影響については言及できない。ただ、これまで過覚醒行動に有意な改善効果をもたらしたのはパロキセチンの 2 週間反復投与(33)のみであり、

回避・麻痺行動は良環境飼育、もしくは自発運動促進、感覚刺激増加で改善し、過覚醒行動はパロキセチンで改善するということは、臨床における PTSD 治療の薬物療法と環境調整の両者が必須であるということを意味している可能性がある。

EE 群、RW 群、Toys 群の行動試験の結果に関しては明らかな差は認められなかったものの、脳内の mRNA 発現に関しては RW の効果や Toys の効果が明らかであった。海馬の BDNF、GDNF が EE 群と RW 群で、control 群と Toys 群より有意に高かった。EE の構成要素の中でも特に自発運動が BDNF や GDNF を高めるという報告(38, 39, 41)があり、海馬の BDNF や GDNF は神経可塑性に重要な役割を持つという報告(21)もあることから、今回の結果は先行報告を支持している。また、BDNF のエクソン I や II は、運動が影響を及ぼすという報告(42)もあり、やはり今回の結果が支持する形となった。さらに行動試験との相関関係で、回避・麻痺行動を示すと思われる「順応期門通過数」と、海馬の BDNF、GDNF の mRNA 発現量にそれぞれ正の相関を認め、自発運動が PTSD の回避・麻痺行動の改善をもたらす効果に海馬の BDNF、GDNF が関与していると考えられた。

一方でストレスレジリエンスは、ストレス負荷中に望ましい範囲で HPA 系やノルアドレナリン活性を維持する能力と、ストレス因が消失したらすぐにス

トレス反応を終える能力に関連すると指摘されており(32)、良環境飼育の効果はその HPA 系を介するという報告もある(40, 43, 44)。HPA 系の調節因子としては、急性ストレス時にグルココルチコイドと GR との親和性を低下させることで HPA 系のネガティブフィードバックを担う FKBP5 が近年注目を浴びている。しかしながら、良環境飼育における FKBP5 の関与という観点の先行研究は、我々の知るところでは存在しない。今回の結果では、海馬と扁桃体の FKBP5 mRNA 発現量が Toys 群で低下していた。感覚刺激増加として toys を定期交換することがレジリエンス促進因子となり、FKBP5 を介した HPA 系のネガティブフィードバックが改善され、この結果につながったものと推察される。また、EE 群でも toys は含まれていたが FKBP5 の結果に差を認めなかった。その原因は RW を組み合わせることで自発運動に費やす時間が発生することで、toys による感覚刺激の時間が減少し、効果が減弱したのではないと思われる。

良環境飼育の構成要素である感覚刺激増加という環境要因が回避・麻痺行動と抑うつ反応に治療的效果をもたらしたこと、神経栄養因子への影響はなかったが FKBP5 のみに差を認めたことから、PTSD モデルラットのレジリエンスに FKBP5 が神経栄養因子とは別の系で関与していると考えた。そこでレジリエンスとは逆の脆弱性に着目した研究 2 として、PTSD モデルラットに環境要

因としての MS ストレスを負荷した場合、FKBP5 にも変化が起きるのか検討することを目的とした。また、シャトル箱法による行動試験では各ラットによって曝露されるストレスが均一ではない。よって、研究 1 における遺伝子変化は行動変化を引き起こす原因ではなく、行動試験によって受けるストレスの違いによって生じている可能性が否定はできず、その点が研究 1 の問題点の一つであると考えられた。よって、研究 2 のサンプル採取については直前の刺激量を均一化できるよう、拘束ストレス（図 3）を負荷する方針とした。

第3章 研究2

第1節 背景と目的

成人の精神疾患に関して、幼少期の身体的・性的虐待やネグレクトは最大の危険因子とも言われており(45, 46)、特に PTSD やうつ病などの罹患率が上昇すると報告されている(47, 48)。通常の母子関係が阻害されると、HPA 系の破綻が誘発されて発達段階においてストレスホルモンである glucocorticoid の過剰な曝露が起き、成長後の脳機能に悪影響を及ぼす(21, 49)。幼少期ストレスにより海馬の GR 遺伝子のプロモーター領域に DNA のメチル化が誘導され、GR 発現量低下に伴ってネガティブフィードバックが減弱し、HPA 系が亢進するためストレス反応からの回復が障害され、持続的な glucocorticoid の上昇もしくはストレス負荷時の過剰な分泌が引き起こされる、と指摘されている(50)。そしてこの HPA 系の調節因子である FKBP5 は、幼少期ストレスとの相互作用で増加し、HPA のネガティブフィードバックに障害を引き起こし、PTSD のリスクとなると報告されることが多い(30, 51, 52)。FKBP5 のリスクアليلやイントロン 7 のメチル化が低下すると FKBP5 は DNA 立体構造が変化して転写が促進されるため増加し、GR シグナルに対して抑制的な作用を及ぼす、と指摘されている(53, 54)。幼少期ストレスがない条件で、急性ストレスが海馬におけるコルチコステ

ロイドと GR 関連遺伝子の受容体との結合を強め、FKBP5 mRNA がストレス開始から 60/180 分で上昇したという報告がある(55)。我々は MS ストレスによる幼少期ストレスを負荷し、成長後のストレスに対する HPA のネガティブフィードバック障害が起き、さらに FKBP5 mRNA が高値を来している可能性を考え、研究 2 を計画した。

第 2 節 対象及び方法

第 1 項 動物

出産予定日を固定した妊娠 Wistar ラット (Clea Japan, 東京、日本) を購入し、1 匹／ケージで飼育した。全てのラットは、標準的なケージを使用した。

明暗周期、温度、湿度はコントロールされ (24℃、55%)、食餌と水は自由に摂取できるような環境で飼育された。全ての動物の扱いは NIH Methods and Welfare Consideration in Behavioral Research with Animal (<http://www.nimh.nih.gov/researchFunding/animals.cmf>) に基づいて行われた。また本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認のもとに行われた。

第 2 項 母子分離ストレス

MS ストレスは、Plotsky と Meaney の方法(56)をもとに実施した。9 時に出産を確認し、確認日を生後 1 日目とした。生後 2 日目に、仔ラット間の差異を少なくするために、仔ラットを全て集めて雄性仔ラットを 8~9 匹、雌性仔ラットを 2~1 匹、合計 10 匹を母ラット 1 匹に対して割り当て、そのケージに戻した。生後 2~14 日目の 9 時半~12 時半の間に、連日 MS ストレス負荷を行った。MS 群では、最初に母ラットを他のケージに移して、仔ラットを紙製床敷が敷き詰められたプラスチック製の箱に移し、30℃に設定した保温箱の中で 3 時間母ラットと分離した。その後、仔ラットを元のケージに戻してから、母ラットを同ケージに戻した。MS ストレスの間は、仔ラット同士は分離せずに扱った。通常飼育 (AFR、animal facility rearing) ラットを control 群とし、動物実験施設担当者が週に 1 回ケージ交換を行った。以下の実験では、雄性仔ラットのみ使用し、行動実験、拘束ストレスを 9 週齢目で実施した。

第 3 項 不可避フットショックストレス

研究 1 と同様に実施した。

第4項 行動実験

研究1と同様に実施した。

第5項 拘束ストレス

ISとシャトル箱による回避・逃避試験を受けていない雄性ラットをAFR群(n=24)、MS群(n=24)に分け、9週齢でDecapi Cone(Braintree Scientific Inc., Braintree, MA, 米国)による30分間の拘束ストレスを午前中に実施した(図3)。拘束開始時点から30分、60分、120分、180分で断頭して、海馬、扁桃体、内側前頭前皮質を採取した。また同時に、非拘束群のAFR群(n=12)、MS群(n=12)として、午前8時と午後4時に断頭して、同3部位を採取した(図4)。

第6項 血清 corticosterone 濃度測定

拘束ストレス後の断頭時に発生する出血より毛細管採血を行い、3000回転/分で5分間遠心分離して得られた血清を速やかに-80℃で保管した。凍結血清試料を氷上融解しCorticosterone ELISA Kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI, 米国)により分析し、製造説明書にしたがって血清corticosterone濃度を測定した。

第7項 リアルタイム PCR

研究1と同様に実施した。

第8項 データ処理及び統計法

統計解析ソフトは SPSS version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, 米国) を使用した。それぞれの mRNA 発現のレベルは GAPDH により標準化された。統計解析には two-way ANOVA を実施し、post-hoc Bonferroni's test による多重比較を行った。また2群間の比較には Student's t test を、血清 corticosterone の結果と mRNA 発現量との相関解析には Pearson の相関分析を実施した。全てのデータは平均値±標準誤差で表示した。全ての検定において $p < 0.05$ の場合に、統計学的有意差があるものとした。

第3節 結果

第1項 成長後の行動に、母子分離ストレスが与える影響

AFR 群、MS 群それぞれにシャトル箱パラダイムで行動試験を行い、AFR 群をコントロールとして Student's t test を実施したところ、「順応期門通過数」、「回避数」、「ショック間門通過数」いずれも有意な差は認められなかつ

た。「総刺激時間」については、 $t=-3.22$ 、 $df=23.418$ 、 $p < 0.01$ と有意に MS 群で延長していることが示された。「順応期門通過数」は、 $t=1.82$ 、 $df=39$ 、 $p = 0.10$ であり有意差は認めなかったが、減少傾向と考えられた（図 9）。

第 2 項 成長後のストレス負荷による経時的な血清 corticosterone 濃度 に、母子分離ストレスが与える影響

母子分離の有無、および timepoint による血清 corticosterone 濃度に違いがあるかどうかを検証するため、独立変数を母子分離の有無と timepoint、従属変数を血清 corticosterone 濃度とする対応のない two-way ANOVA を行った。その結果、母子分離の主効果 ($F_{(1, 51)}=3.85$, $p = 0.055$) は有意ではないが差が生じる傾向を認め、timepoint の主効果 ($F_{(5, 51)}=14.6$, $p < 0.001$) は有意であった。有意な交互作用 ($F_{(5, 51)}=1.23$, n.s.) は認めなかった。単純主効果の検定の結果、各 timepoint における 60 分の時点での母子分離の主効果は有意であり ($F_{(1, 51)}=4.83$, $p < 0.05$)、ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群で高値となっていた。一方、母子分離の有無における単純主効果はともに有意であった（順に $F_{(5, 51)}=11.25$, $p < 0.001$: $F_{(5, 51)}=4.80$, $p < 0.01$)。ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群では 30 分、60 分で am（拘束なし）、120 分、180 分、pm（拘束なし）それ

それより高値だった。AFR 群では、30 分で 120 分、180 分より高値だった (図 10)。

第 3 項 成長後のストレス負荷による経時的な海馬、扁桃体、内側前頭前皮質における FKBP5, BDNF, GDNF mRNA 発現量に、母子分離ストレスが与える影響

母子分離の有無、および timepoint によるそれぞれの mRNA 発現量に違いがあるかどうかを検証するため、独立変数を母子分離の有無と timepoint、従属変数を mRNA 発現量とする対応のない two-way ANOVA を行った。

FKBP5 の発現量解析は、母子分離の主効果は海馬のみで有意な差 ($F_{(1, 60)}=7.11, p < 0.05$) を認めた。各 timepoint の主効果は、海馬、扁桃体、内側前頭前皮質の全てで有意であった (海馬 $F_{(5, 60)}=66.7, p < 0.001$: 扁桃体 $F_{(5, 60)}=25.7, p < 0.001$: 内側前頭前皮質 $F_{(5, 59)}=36.4, p < 0.001$)。交互作用についてはいずれも有意ではなかった。海馬の各 timepoint における単純主効果の検定の結果、120 分の時点で母子分離の主効果が有意であり ($F_{(1, 60)}=8.90, p < 0.01$)、ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群は AFR 群より高値であった。母子分離の有無における timepoint の単純主効果はともに有意であった (MS 群 $F_{(5, 60)}=40.7, p < 0.001$: AFR 群 $F_{(5, 60)}=27.5, p < 0.001$)。ボ

ンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群では 120 分と 180 分が am (拘束なし)、30 分、60 分、pm (拘束なし) より有意に高く、pm (拘束なし) は am (拘束なし)、60 分より有意に高かった。AFR 群では 180 分が am (拘束なし)、30 分、60 分、pm (拘束なし) より有意に高く、120 分が am (拘束なし)、30 分、60 分より有意に高く、pm (拘束なし) が am (拘束なし)、60 分より有意に高かった。扁桃体の母子分離の有無における timepoint の単純主効果はともに有意であった (MS 群 $F_{(5, 60)}=10.6$, $p < 0.001$: AFR 群 $F_{(5, 60)}=16.0$, $p < 0.001$)。ボンフェローニの方法における多重比較の結果、MS 群では 120 分が am (拘束なし)、30 分、60 分、pm (拘束なし) より有意に高く、180 分が am (拘束なし) より有意に高かった。AFR 群では 120 分が am (拘束なし)、30 分、60 分、pm (拘束なし) より有意に高く、180 分が am (拘束なし)、30 分、60 分より有意に高かった。内側前頭前皮質については、母子分離の有無における timepoint の単純主効果はいずれも有意であった (MS 群 $F_{(5, 59)}=23.8$, $p < 0.001$: AFR 群 $F_{(5, 59)}=13.5$, $p < 0.001$)。ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群 AFR 群ともに 120 分、180 分が am (拘束なし)、30 分、60 分、pm (拘束なし) のいずれよりも高値であった。また、180 分で母子分離による単純主効果が有意であり ($F_{(1, 59)}=4.71$, $p < 0.05$)、ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群で高値となっ

ていた (図 11)。

BDNF については、母子分離の主効果は海馬、扁桃体、内側前頭前皮質いずれでも有意でなかった。各 timepoint の主効果は、(海馬 $F_{(5, 60)}=8.75$, $p < 0.001$: 扁桃体 $F_{(5, 60)}=33.0$, $p < 0.001$: 内側前頭前皮質 $F_{(5, 59)}=5.46$, $p < 0.001$) と全て有意であった。交互作用はいずれも有意ではなかった。海馬の各 timepoint における単純主効果の検定の結果、pm (拘束なし) の時点で母子分離の主効果が有意であり ($F_{(1, 60)}=6.06$, $p < 0.05$)、ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群で高値となっていた。母子分離の有無における単純主効果はともに有意であった (MS 群 $F_{(5, 60)}=6.88$, $p < 0.001$: AFR 群 $F_{(5, 60)}=3.57$, $p < 0.01$)。ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群では pm (拘束なし) が am (拘束なし)、30 分、60 分、120 分より有意に高かった。AFR 群では 30 分が 60 分、120 分より有意に高かった。扁桃体の母子分離の有無における単純主効果はともに有意であった (MS 群 $F_{(5, 60)}=16.9$, $p < 0.001$: AFR 群 $F_{(5, 60)}=16.9$, $p < 0.001$)。ボンフェローニの方法における多重比較の結果、MS 群では 60 分が他の全ての timepoint より有意に高く、30 分、120 分が am (拘束なし)、180 分より有意に高かった。AFR 群でも 60 分が他の全ての timepoint よりも有意に高く、30 分が am (拘束なし)、180 分より有意に高かった。内側前頭前皮質については、母子分離の有無における

単純主効果はいずれも有意であった (MS 群 $F_{(5, 59)}=3.20, p < 0.05$: AFR 群 $F_{(5, 59)}=3.14, p < 0.05$)。ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群では 180 分が pm (拘束なし) よりも有意に高く、AFR 群では 120 分が pm (拘束なし) よりも有意に高かった (図 12)。

GDNF については、母子分離の主効果は海馬、扁桃体、内側前頭前皮質いずれでも有意でなかった。各 timepoint の主効果は、(海馬 $F_{(5, 60)}=8.59, p < 0.001$: 扁桃体 $F_{(5, 60)}=9.32, p < 0.001$: 内側前頭前皮質 $F_{(5, 59)}=5.80, p < 0.001$) と全て有意であった。交互作用はいずれも有意ではなかった。海馬の各 timepoint における単純主効果の検定の結果、pm (拘束なし) の時点で母子分離の主効果が有意であり ($F_{(1, 60)}=6.66, p < 0.05$)、ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群で高値となっていた。母子分離の有無における単純主効果は MS 群のみ有意であった ($F_{(5, 60)}=8.31, p < 0.001$)。ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群では pm (拘束なし) が am (拘束なし)、30 分、60 分、120 分より有意に高かった。扁桃体の母子分離の有無における単純主効果はともに有意であった (MS 群 $F_{(5, 60)}=7.52, p < 0.001$: AFR 群 $F_{(5, 60)}=3.03, p < 0.05$)。ボンフェローニの方法における多重比較の結果、MS 群では 180 分が am (拘束なし)、30 分、60 分、pm (拘束なし) より有意に高かった。AFR 群でも 180 分が 30 分よりも有意に高かった。内側

前頭前皮質については、母子分離の有無における単純主効果はいずれも有意であった (MS 群 $F_{(5, 59)}=2.67, p < 0.05$: AFR 群 $F_{(5, 59)}=3.77, p < 0.01$)。ボンフェローニの方法による多重比較の結果、MS 群では有意な差は認められず、AFR 群では 120 分が am (拘束なし)、pm (拘束なし) よりも有意に高かった (図 13)。

第 4 項 血清 corticosterone 濃度と海馬、扁桃体、内側前頭前皮質における FKBP5, BDNF, GDNF mRNA 発現量との相関関係

拘束ストレスの有無で 2 群に分け、それぞれの血清 corticosterone 濃度と海馬、扁桃体、内側前頭前皮質における各 mRNA 発現量とで相関分析を実施した。拘束ストレスなしの群はいずれの部位のいずれの mRNA も有意な相関は認めなかった。拘束ストレスを負荷した群では、FKBP5 が 3 領域とも有意な相関を認めた ($p < 0.001$)。相関係数は海馬が-0.669、扁桃体が-0.570、内側前頭前皮質が-0.658 とそれぞれ負の強い相関を認めた (図 14)。BDNF と GDNF は拘束ストレスが負荷された扁桃体のみで、BDNF が $r = -0.460$ ($p < 0.01$)、GDNF が $r = -0.334$ ($p < 0.05$) と有意な相関を認めた。

第 4 節 考察

シャトル箱法は IS 翌日に LH の発生を定量化する方法であったが、本校の PTSD モデルでは IS から 2 週間の期間を空けることで LH の発生が有意に減少し、2 方向性の行動変化をもたらすのが特徴であった。しかし幼少期に母子分離を負荷すると、「総刺激時間」が有意に延長する結果となり、LH の発生数が有意に増加した。また有意ではなかったが、順応期間中の「門通過数」も減少傾向となった。我々はこれまで、成長後の慢性変動ストレスが過覚醒行動を増悪するという報告をしている(57)が、MS という幼少期ストレス負荷が成長後のシャトル箱法による回避・麻痺行動と抑うつ反応を増悪した、と解釈できる。

血清 corticosterone 濃度については、母子分離の主効果は有意ではなかったものの p 値が 0.055 であり、各 timepoint における母子分離の影響をみると拘束開始から 60 分の時点で有意に MS 群が高値となっていた。さらに、timepoint 毎の比較では MS 群は 30 分、60 分が他の am (拘束なし)、120 分、180 分、pm (拘束なし) のいずれよりも高値であったのに対し、AFR 群では、30 分が 120 分、180 分より高値であった。これらのことから、血清 corticosterone 濃度が拘束開始 60 分の時点で AFR 群より高値かつピークが遷延していたことがわかる。つまり、成長後のストレス反応として、幼少期スト

レスの母子分離が corticosterone のネガティブフィードバックを障害したものと考えられる。

海馬の mRNA 発現については、まず FKBP5 について、拘束開始から 120 分の時点で MS 群が高値となっていた。MS 群、AFR 群ともに 120 分、180 分が am（拘束なし）、30 分、60 分より高値となっており、MS 群で 120 分の時点でより急峻な立ち上がりを見せたものと考えられた。拘束なしの場合は、AFR 群、MS 群ともに朝より夕刻の方が高値だったが、母子分離の影響はなかった。扁桃体では、母子分離による有意差は認められず、AFR 群、MS 群ともに 120 分、180 分が am（拘束なし）、30 分、60 分より高値だった。内側前頭前皮質においても AFR 群、MS 群ともに 120 分、180 分が他の timepoint より有意に高く、180 分では MS 群の方が有意に高かった。また、血清 corticosterone 濃度との相関関係を見ると、非拘束群では相関がなく、拘束ストレス群ではいずれの部位でも強い相関を認められ、ストレス反応における FKBP5 mRNA の関与が示されたと解釈できる。以上の結果より、MS 群で成長後のストレスに対して FKBP5 が増加し、GR の glucocorticoid 親和性が低下したため HPA 系のネガティブフィードバックが障害され、ストレス脆弱性を獲得したため LH に至った、という仮説を支持する結果と考えられる。

代表的な神経栄養因子である BDNF、GDNF に関しては、ストレス反応に

における母子分離の影響として有意な差を認めなかった。しかしながら、非ストレス時の海馬における両神経栄養因子の mRNA に対して、MS 群で成長後に夕刻の変化が有意に発生していることがわかった。臨床場面では日内変動がうつ病の診断に重要な意義を持つこと、いずれの神経栄養因子も抗うつ薬の投与で増加するという報告もあること(58-60)、幼少期ストレスがうつ病の難治化に寄与するという報告もあること(61, 62)などを考慮すると、今後の検討に値する結果であると推察される。

研究 1 では、良環境飼育において、運動が海馬の神経栄養因子の上昇と関連して、感覚刺激が海馬の FKBP5 の低下を伴って、それぞれが同様に回避・麻痺行動と抑うつ反応を軽減した。研究 2 では、幼少期ストレスとして、ネグレクトに相当する母子分離が成長後のストレス反応において回避・麻痺行動を助長し、抑うつ反応を増悪した。また母子分離が拘束ストレス時では血清 corticosterone 濃度と関連して海馬の FKBP5 mRNA 上昇を、非ストレス時の神経栄養因子の夕刻の mRNA 上昇をそれぞれ誘導した。一方で、ネグレクトに相当する幼少期ストレスとしての MS 群で、成長後のシャトル箱法で回避・麻痺行動の助長や抑うつ反応の増悪が発生し、成長後の拘束ストレスに対しては拘束開始から 60 分で血清 corticosterone 濃度が、その後 120 分で海馬の FKBP5 mRNA がそれぞれ有意に上昇した。さらにストレス時にはコルチゾ

ールの GR への結合が増えるとされるが、研究 2 でも非ストレス時とは異なり脳内の FKBP5 mRNA と血清 corticosterone 濃度が強く相関していた。良環境飼育の感覚刺激増進ではこれらの行動が軽減し、海馬の FKBP5 mRNA が低下していた。母子分離と良環境飼育の感覚刺激増進はいずれも身体感覚よりは認知を経た刺激が強いと思われるが、これがストレス時に FKBP5 を介した GR 系が賦活してストレス反応に寄与している示唆される。また今回の結果では研究 1 と研究 2 とともに、有意な変化を認めた領域は海馬が特に目立ち、扁桃体でも一部の遺伝子は変化を認めたが、内側前頭前皮質ではほとんど変化していなかった。この結果から、FKBP5 がこれら 3 領域の中では海馬や扁桃体で主に作用しており、内側前頭前皮質ではこれら以外の遺伝子が主に作用しているのではないか、と推察される。FKBP5 selective antagonist の動物モデルへの効果も報告されており(63-65)、海馬や扁桃体を対象としたストレスレジリエンス・脆弱性に関する今後の研究がさらに期待される。

第4章 結論

1. 良環境飼育を構成する自発運動促進と環境刺激増加はともにシャトル箱法 PTSD モデルの回避・麻痺行動と抑うつ反応に対して同様の治療的効果をもたらした。
2. 自発運動促進では海馬の神経栄養因子が上昇し、感覚刺激増加では海馬の FKBP5 が低下した。
3. 母子分離は、PTSD モデルの回避・麻痺行動を増悪傾向（有意差なし）にし、抑うつ行動を有意に増悪させた。
4. 母子分離群で、ストレス負荷時の海馬の FKBP5 が有意に上昇した。
5. 海馬の FKBP5 は、PTSD モデルラットのストレス反応における、レジリエンスや脆弱性に関与していると考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲いただいた防衛医科大学校精神科学講座教授 吉野相英博士、同解剖学講座教授 小林靖博士、同薬理学講座准教授 佐藤泰司博士に厚く御礼申し上げます。そして本研究の実施にあたり懇切丁寧に直接ご指導いただいた同精神科学講座講師 戸田裕之博士に心より御礼申し上げます。更に、日々ご討議いただいた同防衛医学研究センター行動科学研究部門教授 清水邦夫博士および同精神科学講座助教 古賀農人博士、実験助手として手助けをしてくださった浅井史穂さん、三井由美博士、秘書的手助けをしてくださった広瀬裕子さん、三浦寿代さん、師岡佐知子さん、土本順子さん、上野山真紀さんに深く感謝いたします。

引用文献

1. Kardiner A, Spiegel H. War stress and neurotic illness. New York: Hoeber; 1947.
2. Haley SA. When the patient reports atrocities: Specific treatment considerations of the Vietnam veteran. Archives of General Psychiatry. 1974;30:191-6.
3. Burgess AW, Holmstrom LL. Rape trauma syndrome. American Journal of Psychiatry. 1974;131:981-6.
4. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5). Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
5. Edmondson D, von Känel R. Post-traumatic stress disorder and cardiovascular disease. Lancet Psychiatry. 2017;4:320-9.
6. Chang J-C, Yen AM-F, Chen H-H, Chen SL-S, Chiu SY-H, Fann JC-Y, et al. Comorbid diseases as risk factors for incident posttraumatic stress disorder (PTSD) in a large community cohort (KCIS no. PSY4). Scientific Reports. 2017;7:41276.
7. Cordova M, Riba M, Spiegel D. Post-traumatic stress disorder and

cancer. *Lancet Psychiatry*. 2017;4:330–338.

8. 山本経之, 采輝昭. 行動薬理学的側面からみた精神疾患モデルとその妥当性. *日本薬理学雑誌*. 2002;120:173-80.

9. Yehuda R, Antelman SM. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*. 1993;33:479-86.

10. Koba T, Kodama Y, Shimizu K, Nomura S, Sugawara M, Kobayashi Y, et al. Persistent behavioural changes in rats following inescapable shock stress: a potential model of posttraumatic stress disorder. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 2001;2:34-7.

11. 清水邦夫, 菊地章人, 脇園知宜, 鈴木豪, 戸田裕之, 澤村岳人, et al. シヤトル箱を用いた心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の動物モデル. *日本神経精神薬理学雑誌= Japanese Journal of Psychopharmacology*. 2006;26:93-9.

12. Sawamura T, Shimizu K, Nibuya M, Wakizono T, Suzuki G, Tsunoda T, et al. Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats. *Neuroscience Letters*. 2004;357:37-40.

13. Hendriksen H, Prins J, Olivier B, Oosting RS. Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell

proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. PLOS ONE. 2010;5:e11943.

14. Moncek F, Duncko R, Johansson B, Jezova D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. Journal of Neuroendocrinology. 2004;16:423-31.

15. Takuma K, Ago Y, Matsuda T. Preventive effects of an enriched environment on rodent psychiatric disorder models. Journal of Pharmacological Sciences. 2011;117:71-6.

16. Nugent NR, Tyrka AR, Carpenter LL, Price LH. Gene–environment interactions: early life stress and risk for depressive and anxiety disorders. Psychopharmacology. 2011;214:175-96.

17. Koenen KC, Moffitt TE, Poulton R, Martin J, Caspi A. Early childhood factors associated with the development of post-traumatic stress disorder: results from a longitudinal birth cohort. Psychological Medicine. 2007;37:181-92.

18. Alfonso J, Frick LR, Silberman DM, Palumbo ML, Genaro AM, Frasch AC. Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments.

Biological Psychiatry. 2006;59:244-51.

19. Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobald D, Malkovska I, Nef S, et al. Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biological Psychiatry*. 2007;61:187-97.

2007;61:187-97.

20. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *Journal of Neuroscience*. 1995;15:7539-47.

21. Boku S, Nakagawa S, Toda H, Hishimoto A. Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2018;72:3-12.

22. Fuchikami M, Morinobu S, Segawa M, Okamoto Y, Yamawaki S, Ozaki N, et al. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PLOS ONE*. 2011;6:e23881.

23. Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Research*. 1996;726:49-56.

24. Nakagawa T, Ono - Kishino M, Sugaru E, Yamanaka M, Taiji M, Noguchi H. Brain - derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*. 2002;18:185-91.
25. Zhang L, Benedek D, Fullerton C, Forsten R, Naifeh J, Li X, et al. PTSD risk is associated with BDNF Val66Met and BDNF overexpression. *Molecular Psychiatry*. 2014;19:8.
26. Yehuda R, Hoge CW, McFarlane AC, Vermetten E, Lanius RA, Nievergelt CM, et al. Post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1:15057.
27. Charney DS. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability. *American Journal of Psychiatry*. 2004;161:195-216.
28. Delahanty DL, Gabert-Quillen C, Ostrowski SA, Nugent NR, Fischer B, Morris A, et al. The efficacy of initial hydrocortisone administration at preventing posttraumatic distress in adult trauma patients: a randomized trial. *CNS Spectrums*. 2013;18:103-11.
29. Yehuda R, Teicher MH, Trestman RL, Levengood RA, Siever LJ. Cortisol regulation in posttraumatic stress disorder and major depression: a

chronobiological analysis. *Biological Psychiatry*. 1996;40:79-88.

30. Binder EB, Bradley RG, Liu W, Epstein MP, Deveau TC, Mercer KB, et al. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *The Journal of the American Medical Association*. 2008;299:1291-305.

31. Takahashi T, Shimizu K, Shimazaki K, Toda H, Nibuya M. Environmental enrichment enhances autophagy signaling in the rat hippocampus. *Brain Research*. 2014;1592:113-23.

32. Ozbay F, Johnson DC, Dimoulas E, Morgan III C, Charney D, Southwick S. Social support and resilience to stress: from neurobiology to clinical practice. *Psychiatry (Edgmont)*. 2007;4:35.

33. Sáenz JCB, Villagra OR, Trías JF. Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural Brain Research*. 2006;169:57-65.

34. Fernandez-Teruel A, Escorihuela R, Castellano B, Gonzalez B, Tobena A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior Genetics*.

1997;27:513-26.

35. Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS.

Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of Neurobiology*. 1999;39:569-78.

36. Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH,

Granholm A-C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental Neurology*.

2000;164:45-52.

37. Bechara R, Kelly A. Exercise improves object recognition memory

and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behavioural Brain Research*. 2013;245:96-100.

38. Kobil T, Liu Q-R, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H.

Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learning & Memory*. 2011;18:605-9.

39. Mustroph ML, Chen S, Desai SC, Cay EB, DeYoung EK, Rhodes JS.

Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male

C57BL/6J mice. *Neuroscience*. 2012;219:62-71.

40. Zajac M, Pang T, Wong N, Weinrich B, Leang L, Craig J, et al. Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon - specific BDNF expression in the hippocampus of wild - type and pre - motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus*. 2010;20:621-36.
41. Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews*. 2007;55:78-88.
42. Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research*. 1998;61:147-53.
43. Morley - Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *European Journal of Neuroscience*. 2003;18:3367-74.
44. Novaes LS, Dos Santos NB, Batalhote RF, Malta MB, Camarini R, Scavone C, et al. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the

basolateral amygdala. *Neuropharmacology*. 2017;113:457-66.

45. Levine S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science*. 1967;156:258-60.

46. Teicher MH, Tomoda A, Andersen SL. Neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment: are results from human and animal studies comparable? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1071:313-23.

47. Kendler KS, Sheth K, Gardner CO, Prescott CA. Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychological Medicine*. 2002;32:1187-94.

48. Morgan C, Kirkbride J, Leff J, Craig T, Hutchinson G, McKenzie K, et al. Parental separation, loss and psychosis in different ethnic groups: a case-control study. *Psychological Medicine*. 2007;37:495-503.

49. Enthoven L, Oitzl M, Koning N, Van Der Mark M, De Kloet E. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of newborn mice rapidly desensitizes to repeated maternal absence but becomes highly responsive to novelty. *Endocrinology*. 2008;149:6366-77.

50. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*. 2004;7:847.
51. Xie P, Kranzler HR, Poling J, Stein MB, Anton RF, Farrer LA, et al. Interaction of FKBP5 with childhood adversity on risk for post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:1684.
52. Klengel T, Mehta D, Anacker C, Rex-Haffner M, Pruessner JC, Pariante CM, et al. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene–childhood trauma interactions. *Nature Neuroscience*. 2013;16:33.
53. Zannas AS, Wiechmann T, Gassen NC, Binder EB. Gene–stress–epigenetic regulation of FKBP5: clinical and translational implications. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41:261.
54. Klengel T, Binder EB. FKBP5 allele-specific epigenetic modification in gene by environment interaction. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40:244.
55. Mifsud KR, Reul JM. Acute stress enhances heterodimerization and binding of corticosteroid receptors at glucocorticoid target genes in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113:11336-41.

56. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*. 1993;18:195-200.
57. Wakizono T, Sawamura T, Shimizu K, Nibuya M, Suzuki G, Toda H, et al. Stress vulnerabilities in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Physiology & Behavior*. 2007;90:687-95.
58. Takebayashi M, Hisaoka K, Nishida A, Tsuchioka M, Miyoshi I, Kozuru T, et al. Decreased levels of whole blood glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in remitted patients with mood disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2006;9:607-12.
59. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang J-F, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological Psychiatry*. 2001;50:260-5.
60. Coppel A, Pei Q, Zetterström T. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology*. 2003;44:903-10.
61. Toda H, Inoue T, Tsunoda T, Nakai Y, Tanichi M, Tanaka T, et al. The

structural equation analysis of childhood abuse, adult stressful life events, and temperaments in major depressive disorders and their influence on refractoriness. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2015;11:2079.

62. Toda H, Inoue T, Tsunoda T, Nakai Y, Tanichi M, Tanaka T, et al. Affective temperaments play an important role in the relationship between childhood abuse and depressive symptoms in major depressive disorder. *Psychiatry Research*. 2016;236:142-7.

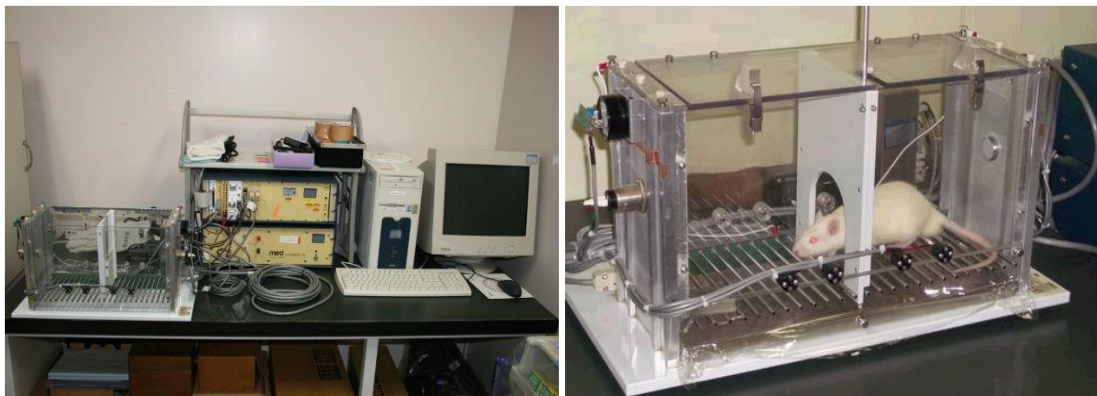
63. Maiarù M, Tochiki KK, Cox MB, Annan LV, Bell CG, Feng X, et al. The stress regulator FKBP51 drives chronic pain by modulating spinal glucocorticoid signaling. *Science Translational Medicine*. 2016;8:325.

64. Hartmann J, Wagner KV, Gaali S, Kirschner A, Kozany C, Rühler G, et al. Pharmacological inhibition of the psychiatric risk factor FKBP51 has anxiolytic properties. *Journal of Neuroscience*. 2015;35:9007-16.

65. Maiarù M, Morgan OB, Mao T, Breitsamer M, Bamber H, Pöhlmann M, et al. The stress regulator FKBP51: a novel and promising druggable target for the treatment of persistent pain states across sexes. *Pain*. 2018;159:1224-34.

図表

図 1 シャトル箱



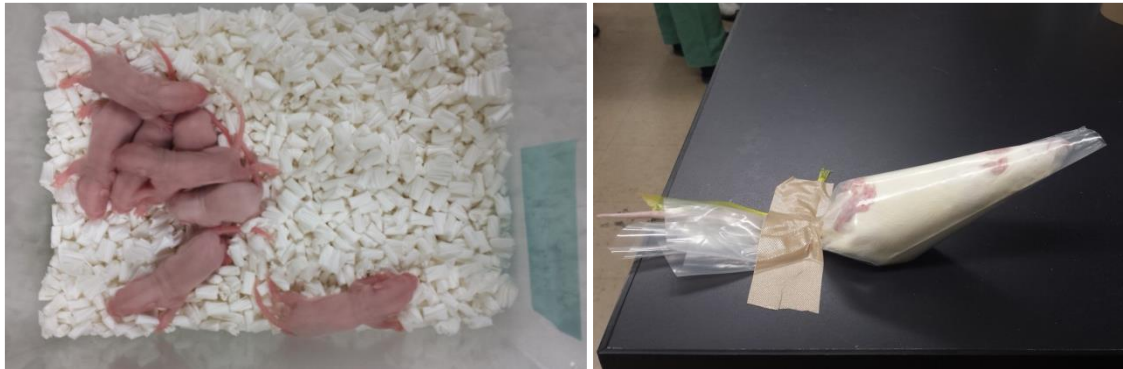
シャトル箱の装置一式の写真（左）と 9 週齢 Wistar 雄性ラットが中央ゲートを通過する写真（右）

図 2 良環境飼育ケージ



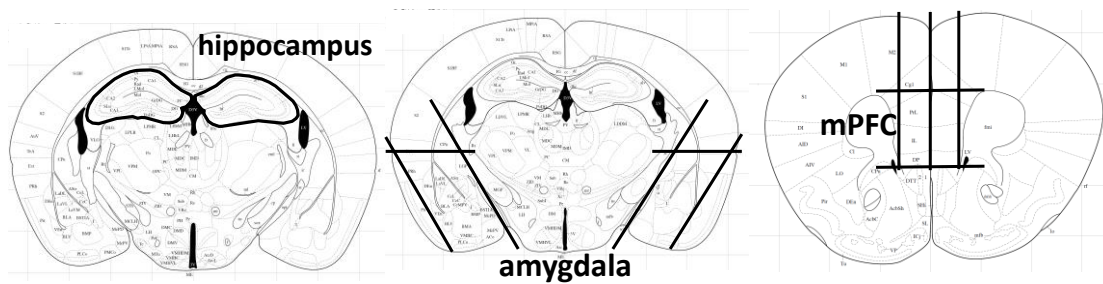
（左）左が通常の飼育ケージ、右が良環境飼育ケージの写真
（右）6 匹の 9 週齢 Wistar 雄性ラットが良環境飼育ケージで飼育中の写真

図 3 母子分離ストレスと拘束ストレス



幼少期ストレスとして行った母子分離（左）と、成長後ストレスとして行った拘束ストレス（右）の写真

図 4 サンプル採取を行った海馬、扁桃体、内側前頭前皮質

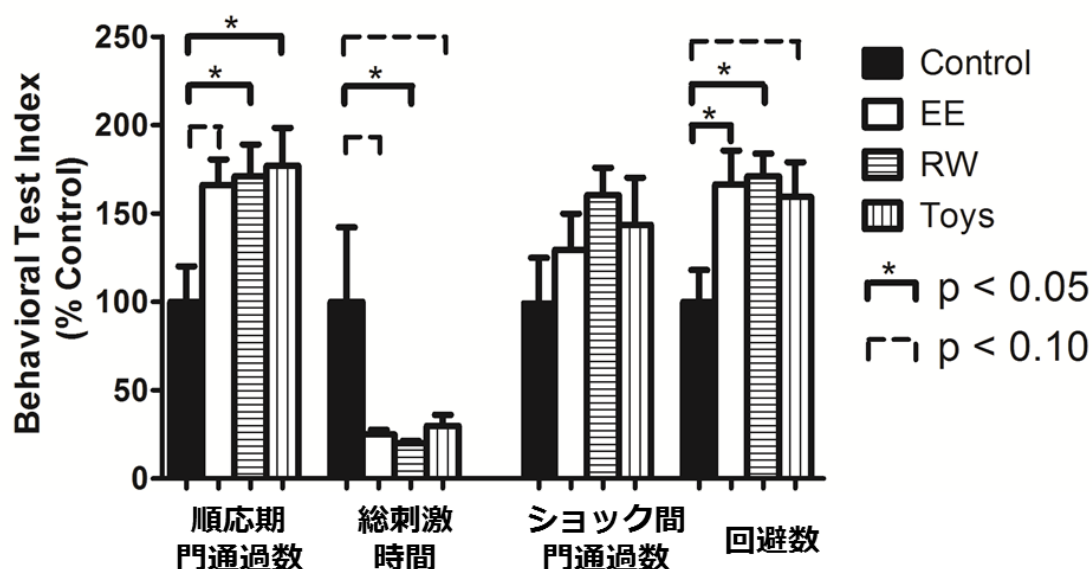


海馬（左）：Bregma -3.30mm

扁桃体（中）：Bregma -2.56mm

内側前頭前皮質（右）：Bregma 2.70mm

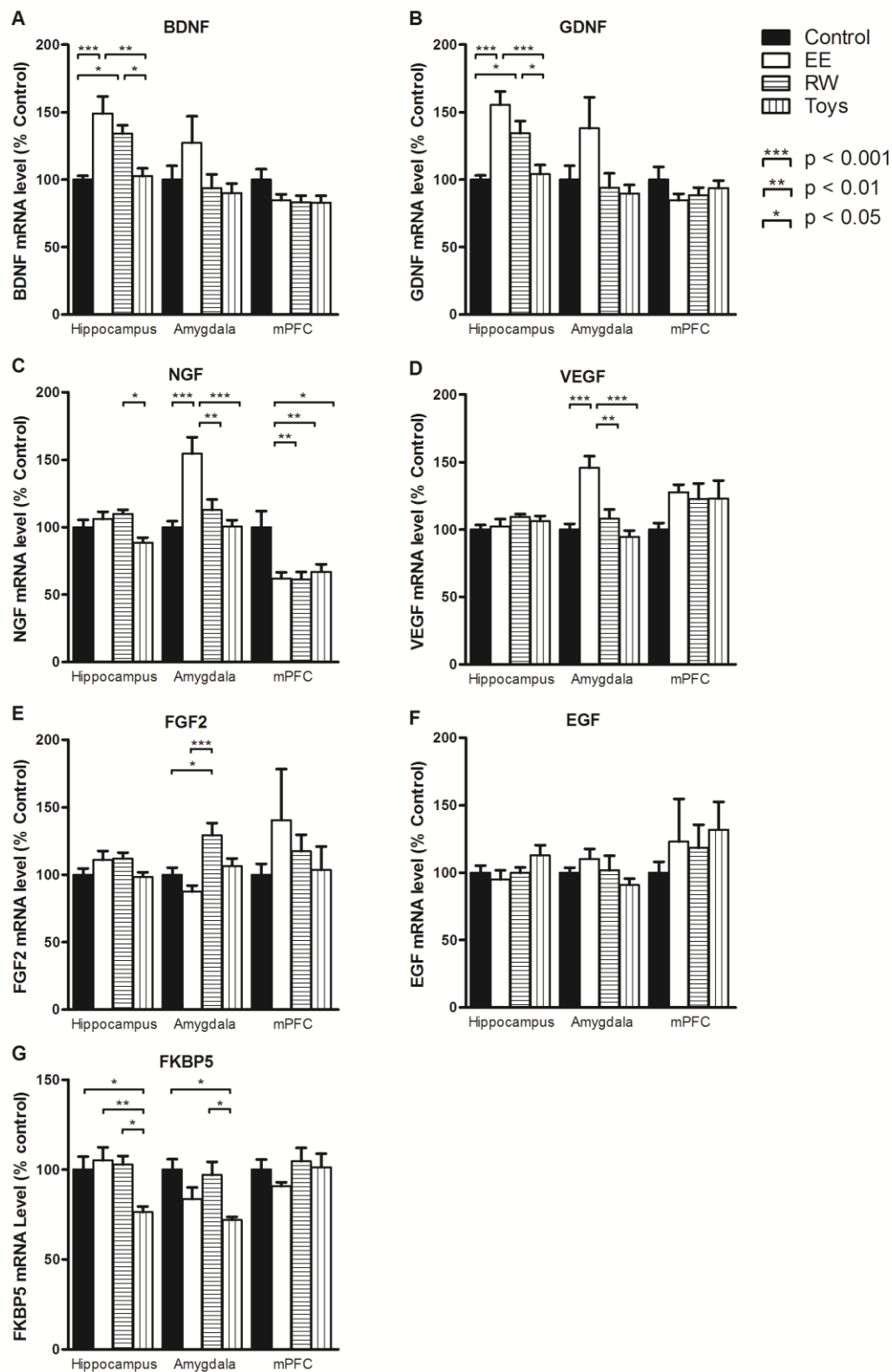
図5 シャトル箱法 PTSD モデルにおける control, EE, RW, Toys 群の行動試験の結果



低活動性行動変化は「順応期門通過数 (a)」、「総刺激時間 (b)」で、過活動性行動変化は「ショック間門通過数 (c)」、「回避数 (d)」で評価する。Control 群と比較して、EE 群、RW 群、Toys 群いずれも低活動性行動変化の a と b で有意な改善、もしくは改善傾向となった。過活動性行動変化については、有意な変化が生じたのは d のみであった。数値はそれぞれ control 群のデータで除して記している。全てのデータは平均値±標準誤差で表記している。(n = 17-18)

・略語説明 EE, environmental enrichment; RW, running wheel

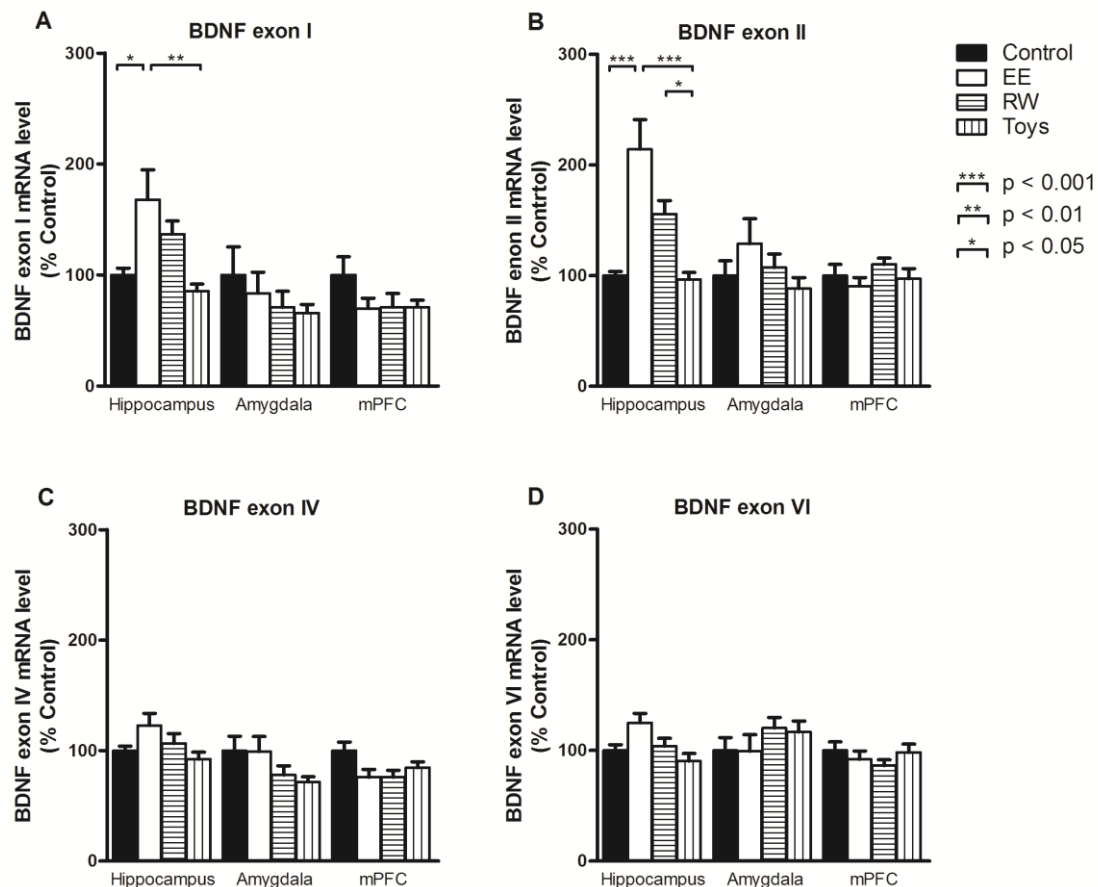
図 6 シャトル箱法 PTSD モデルに対する行動試験直後の、海馬、扁桃体、内側前頭前皮質におけるそれぞれの mRNA 発現量



海馬の BDNF、GDNF は EE 群と RW 群が control 群と Toys 群より多く発現していた。海馬の NGF は RW 群が Toys 群より多く発現していた。扁桃体の NGF は EE 群が他の 3 群より多く発現していた。扁桃体の VEGF は EE 群が他の 3 群より多く発現していた。扁桃体の FGF2 は RW 群が control 群と EE 群より多く発現していた。海馬の FKBP5 は Toys 群が他の 3 群より少なく発現していた。扁桃体の FKBP5 は Toys 群で control 群と RW 群より少なく発現していた。全ての結果はそれぞれの control 群のデータで除して記している。全てのデータは平均値±標準誤差で表記している。(n = 8)

・略語説明 BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EE, environmental enrichment; EGF, epidermal growth factor; FGF2, fibroblast growth factor-2; FKBP5, FK506 binding protein 5; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; NGF, nerve growth factor; RW, running wheel; VEGF, vascular endothelial growth factor

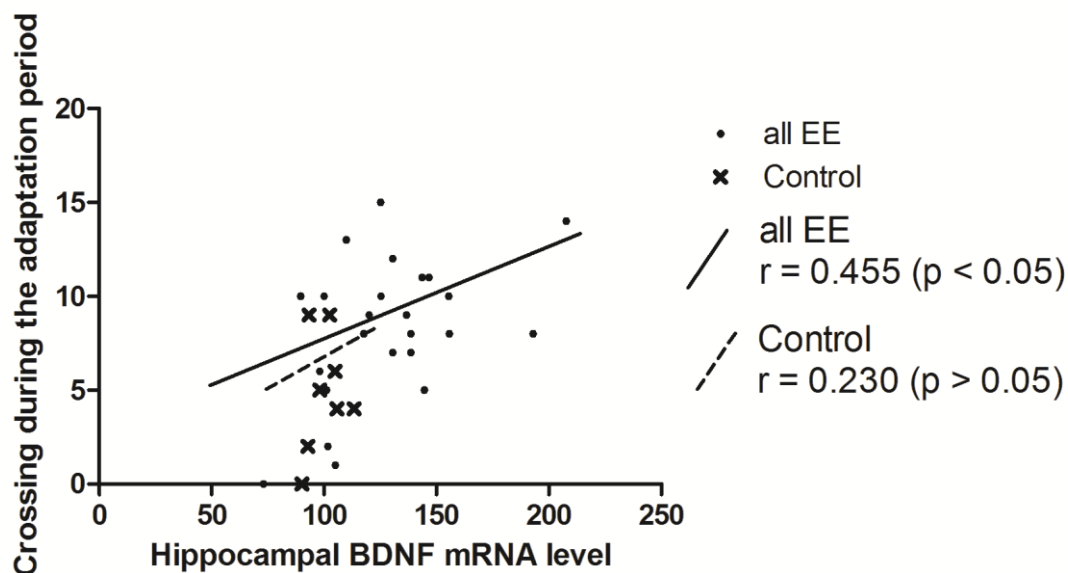
図 7 シャトル箱法 PTSD モデルに対する行動試験直後の、海馬、扁桃体、内側前頭前皮質における BDNF 各エクソンの mRNA 発現量



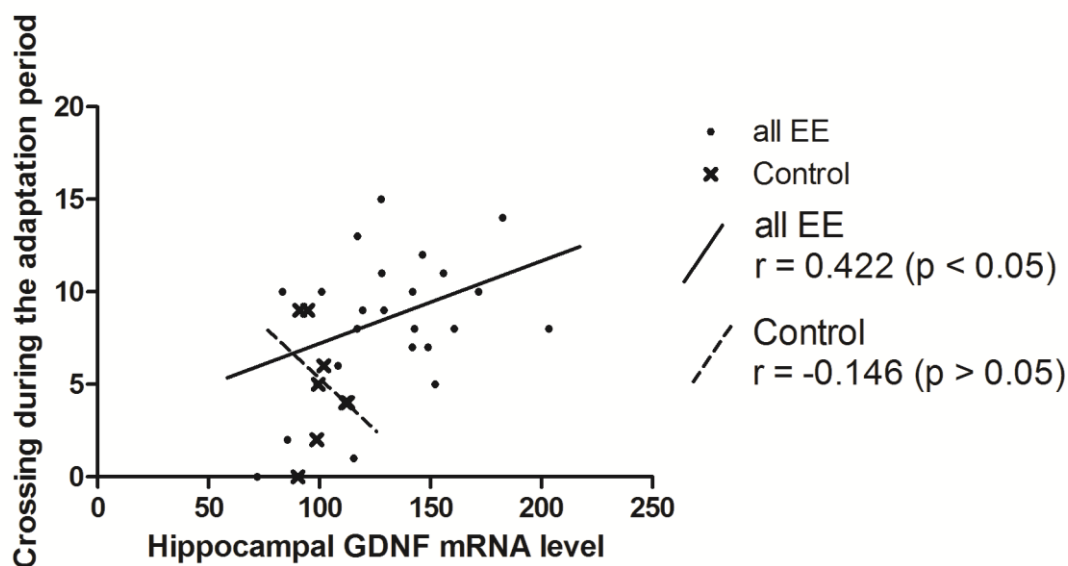
海馬の BDNF エクソン I、II とともに、EE 群が control 群と Toys 群より多く発現していた。さらに海馬の BDNF エクソン II では、RW 群も Toys 群よりも多く発現していた。全ての結果はそれぞれの control 群のデータで除して記している。全てのデータは平均値±標準誤差で表記している。(n = 8)

・略語説明 BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EE, environmental enrichment; RW, running wheel

図 8 海馬の BDNF、GDNF mRNA 発現量と「順応期門通過数」との相関関係
A



B

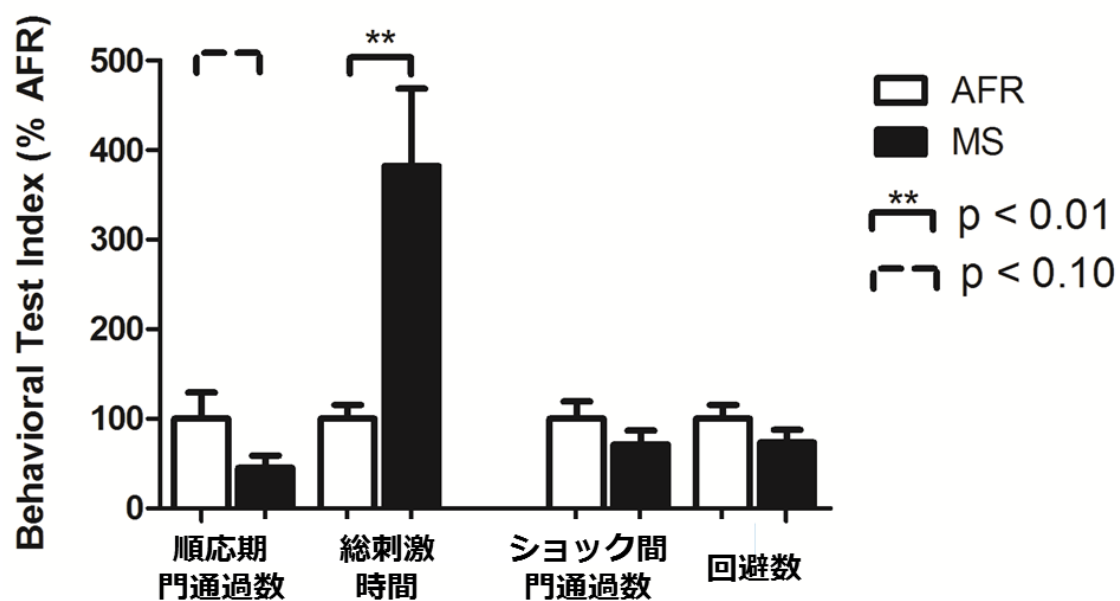


A: BDNF mRNA、B: GDNF mRNA

EE 群、RW 群、Toys 群全て合わせた all EE 群において、「順応期門通過数」は海馬の BDNF、GDNF mRNA 発現量の増加と有意な正の相関を示した ($n = 24$)。Control 群ではいずれも有意な相関を認めなかった ($n = 8$)。

・略語説明 BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EE, environmental enrichment; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; RW, running wheel

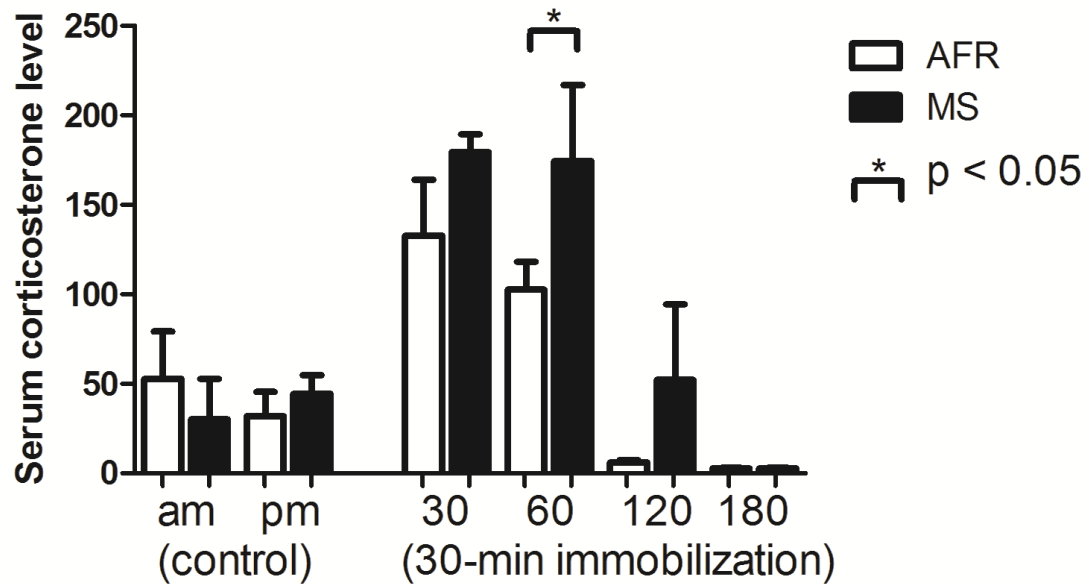
図9 シャトル箱法 PTSD モデルに対する AFR 群、MS 群の行動試験の結果



低活動性行動変化は「順応期門通過数 (a)」、「総刺激時間 (b)」で、過活動性行動変化は「ショック間門通過数 (c)」、「回避数 (d)」で評価する。AFR 群と比較して、MS 群では「総刺激時間」が有意に延長した。また有意ではなかったが、「順応期門通過数」も MS 群では減少傾向を認めた。数値はそれぞれ AFR 群のデータで除して記している。全てのデータは平均値±標準誤差で表記している。(AFR; $n = 21$, MS; $n = 23$)

・略語説明 AFR, animal facility rearing; MS, maternal separation

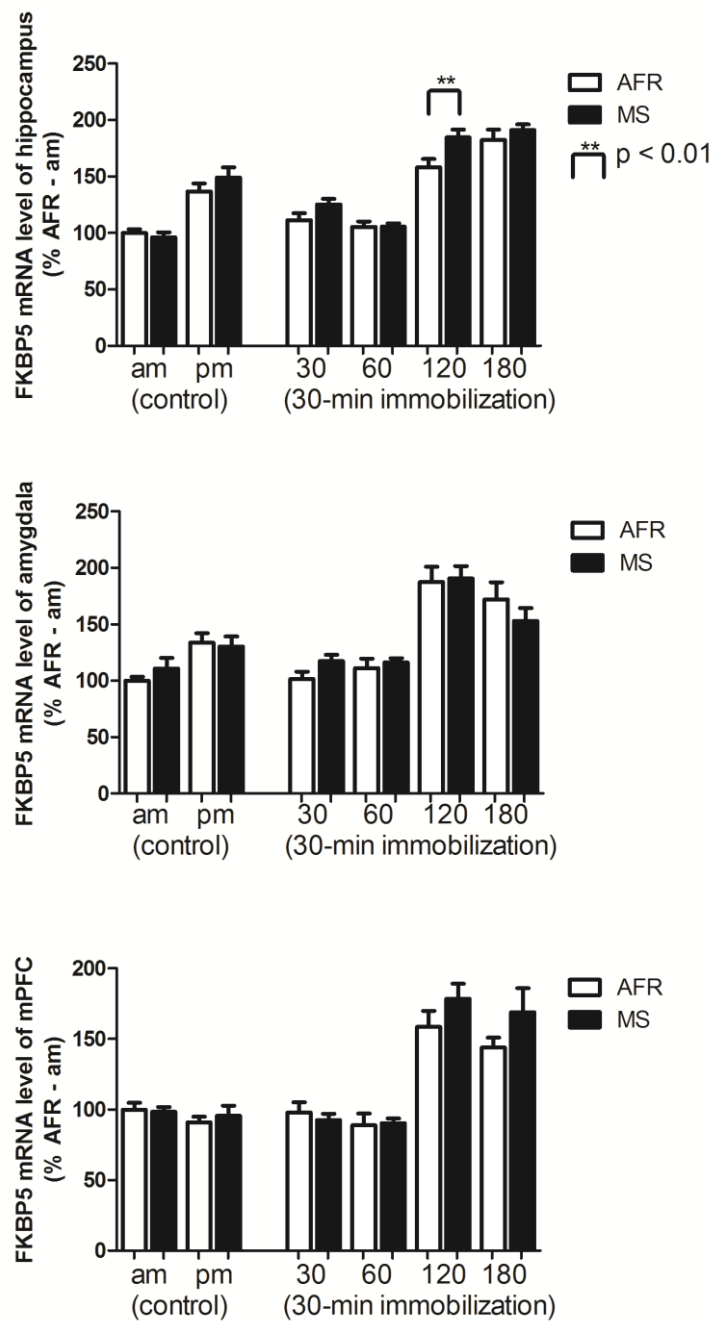
図 10 拘束ストレスに伴う血清 corticosterone 濃度



AM と PM は非拘束群、それぞれの時間は拘束（30 分）開始時からの経過時間を示す。拘束開始時から 60 分の時点で血清 corticosterone 濃度は MS 群で有意に高値を示した。全てのデータは平均値±標準誤差で表記している。(n = 5 - 6)

・略語説明 AFR, animal facility rearing; MS, maternal separation

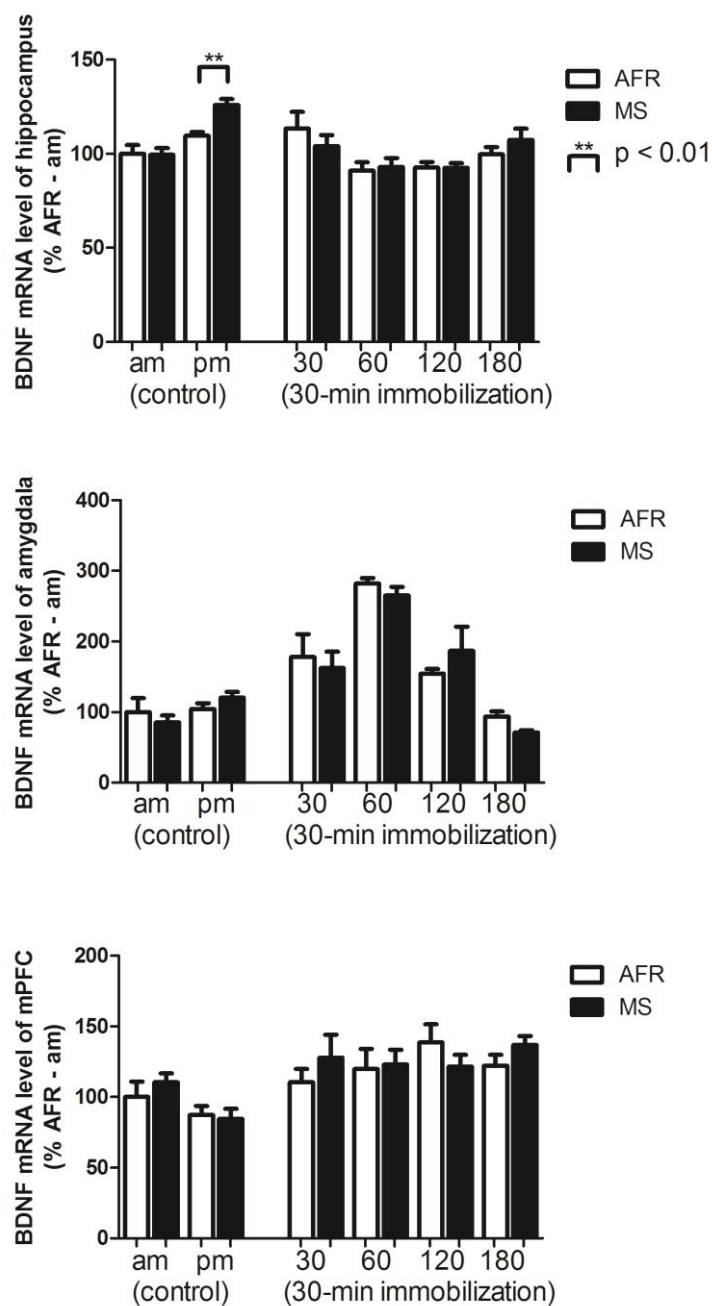
図 11 拘束ストレスに伴う海馬（上）、扁桃体（中）、内側前頭前皮質（下）の FKBP5 mRNA 発現量



各 timepoint における MS の影響は、拘束開始時から 120 分で海馬の FKBP5 mRNA 発現量が、MS 群で AFR 群より高値を示した。全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表記している。(n = 5 - 6)

・略語説明 AFR, animal facility rearing; FKBP5, FK506 binding protein 5; MS, maternal separation

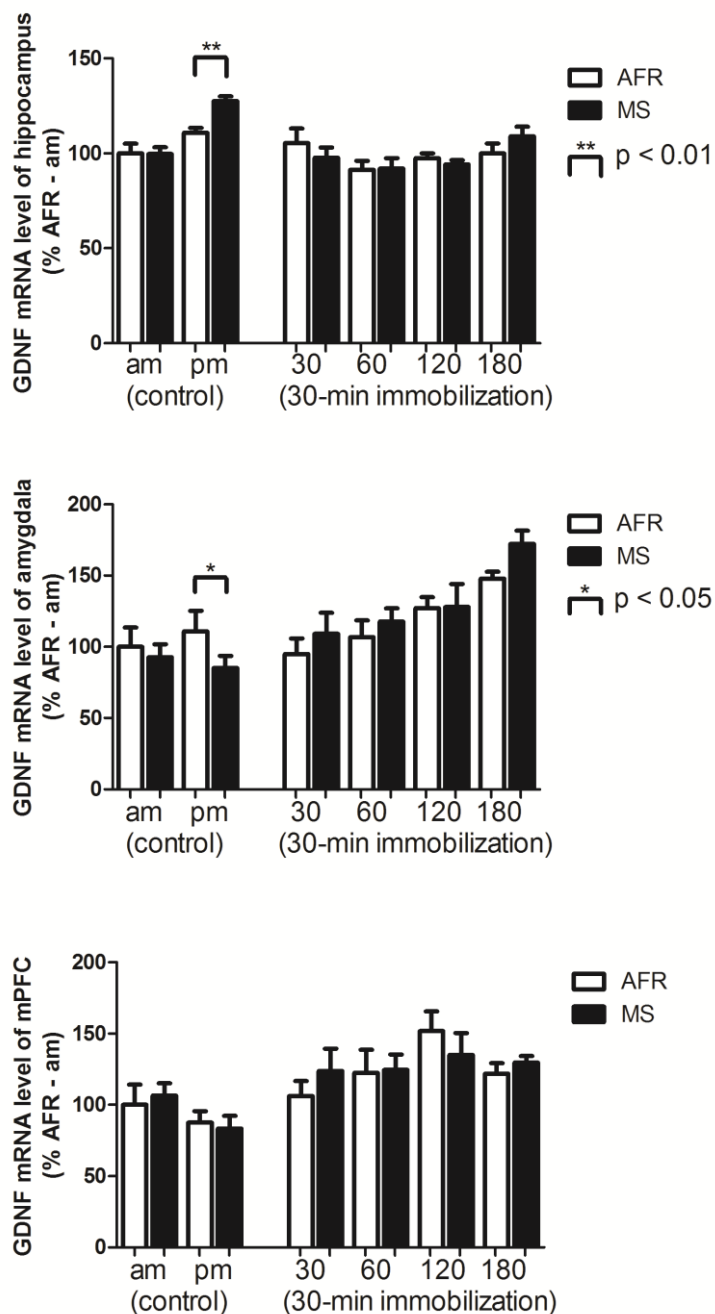
図 12 拘束ストレスに伴う海馬（上）、扁桃体（中）、内側前頭前皮質（下）の BDNF mRNA 発現量



各 timepoint における MS の影響は、非拘束群の夕刻で海馬の BDNF mRNA 発現量が、MS 群で AFR 群より高値を示した。全てのデータは平均値±標準誤差で表記している。(n = 5 - 6)

・略語説明 AFR, animal facility rearing; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; MS, maternal separation

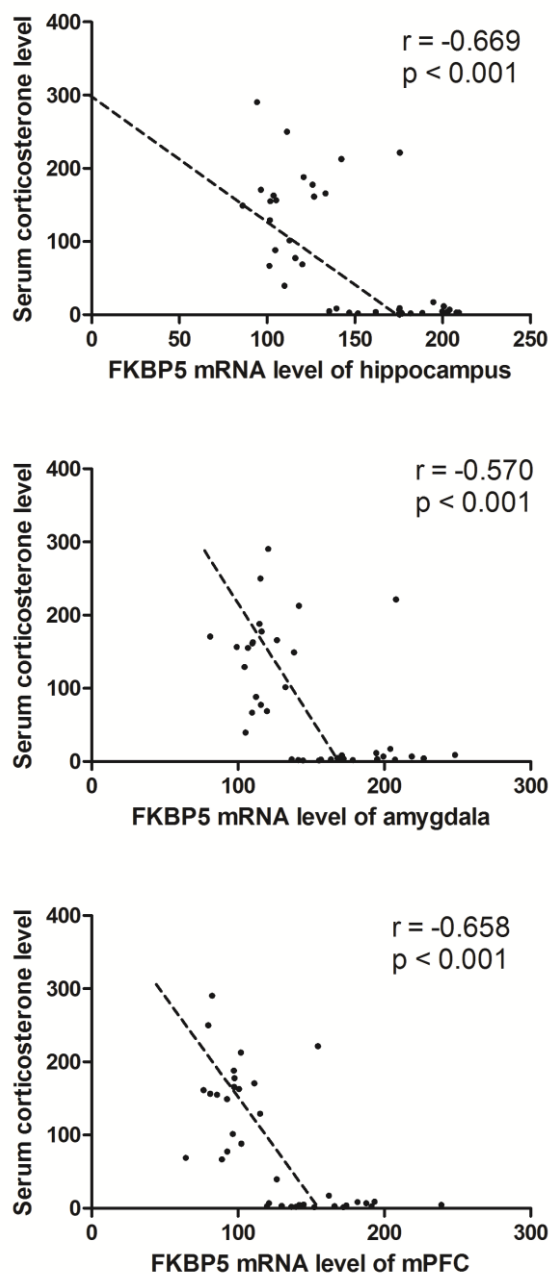
図 13 拘束ストレスに伴う海馬（上）、扁桃体（中）、内側前頭前皮質（下）の GDNF mRNA 発現量



各 timepoint における MS の影響は、非拘束群の夕刻の GDNF mRNA 発現量が、海馬では MS 群が AFR 群より高値を、扁桃体ではより低値を示した。全てのデータは平均値±標準誤差で表記している。(n = 5 - 6)

・略語説明 AFR, animal facility rearing; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; MS, maternal separation

図 14 拘束ストレス負荷後の血清 corticosterone 濃度と海馬(上)、扁桃体(中)、内側前頭前皮質(下)の FKBP5 mRNA 発現量との相関関係



拘束ストレスを負荷した群 ($n = 39$) は海馬、扁桃体、内側前頭前皮質いずれも FKBP5 mRNA 発現量と血清 corticosterone 濃度で有意な相関を認めた ($p < 0.001$)。一方、非拘束ストレスの control 群 ($n = 24$) はいずれも有意な相関を認めなかった。

・略語説明 FKBP5, FK506 binding protein 5

表 リアルタイム PCR に使用したプライマーの配列

Primer	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Bdnf	CCATAAGGACGCGGACTTGT	GAGGCTCCAAAGGCACTTGA
Bdnf exon I	GCGTTGAGAAAGCTGCTTCAG	AGGTTACCAATGACTGTCCAACTG
Bdnf exon II	CCGAGGTTTCGGCTCACA	CGCTCCAAAATCTGACTCTCTCT
Bdnf exon IV	GCTGCCTTGATGTTTACTTTGA	CGTGGACGTTTGCTTCTTTC
Bdnf exon VI	GCACGGTCCCCATTGC	GGGAACCCGGTCTCATCAAAG
Gdnf	TACCTGGATGCCGCAAACAT	GTAGAAATATTGCTTCAGTTGG
Ngf	ACATCAAGGGCAAGGAGG	GTGAGTCGTGGTGCAGTATG
Vegf	TATGTTTGACTGCTGTGGACTTGA	CAGGGATGGGTTTGTCGTGT
Fgf2	TCCATCAAGGGAGTGTGTGC	TCCGTGACCGGTAAGTGTTG
Egf	GTGGCGTGTGCATGTATGTT	CTCACGTTGCTGCTTGACTC
Fkbp5	GAACCCAATGCTGAGCTTATG	ATGTACTTGCCCTCCCTTGAAG
Gapdh	TGGGAAGCTGGTCATCAAC	GCATCACCCCATTTGATGTT