

【17】

氏 名	田 ^た 中 ^{なか} 宏 ^{ひろ} 美 ^み
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第782号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (精神神経科学)
学位論文題目	Behavioral, hormonal, and neurochemical outcomes of neonatal repeated shaking brain injury in male adult rats (幼若期ラットへの反復揺さぶり刺激による発達後の行動、ホルモンおよび神経化学的变化)
論文審査委員	(主査) 教授 吉原重美 (副査) 教授 鈴木圭輔 教授 黒須明

論文内容の要旨

【背景】

乳幼児揺さぶられ症候群 (shaken baby syndrome : SBS) は児の頭部が激しく揺さぶられる虐待によって惹起される。被虐待児は発達後に不安などの精神症状を起こすことが知られているが、既存のSBSモデル動物は血腫が大きく死亡率も高いため長期変化での動物の心理・精神症状を表出する行動変化を解析できず、揺さぶりによる脳障害 (shaking brain injury : SBI) が行動変化を起こす機序も解明されていない。

【目的】

本研究では幼若期の反復揺さぶり刺激により、一過性微小脳出血を起こすSBIモデル動物を用いて、発達後のストレスに対する行動解析、血中ホルモン計測さらに神経伝達物質およびストレスホルモン受容体の脳内変化を解析し、本モデル動物の特性を明らかにする。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従って行った。

Sprague-Dawley系妊娠ラットを実験動物センターにて飼育した。出産日を生後0日 (postnatal day 0 : P0)、生後X日をPXと定義した。以下の実験は雄のみを用い、揺さぶり群 (S群)、対照群 (C群) の2群にわけた。離乳時 (P21) まで、同腹仔ラットは母ラットと共に同じケージ内で飼育した。先行研究ではS群の仔ラットは1日1クールの揺さぶり刺激をP3からP14まで12日間与えていたが、本研究では、揺さぶりの臨界期間を決定するために、揺さぶり期間を早期 (揺さぶり期間P3か

らP7, S1群) および後期 (P8からP14, S2群) に分けた。揺さぶった後、授乳中にすべての仔を母親に戻し、離乳後は8~10週齢 (P8W-P10W) まで1ケージあたり2~3匹となるように動物を飼育した。揺さぶり刺激装置および揺さぶり方法は先行研究 (Kawamata et al. Neurosci Lett, 2018) に準じた。以下の実験は全てP8W-P10W雄ラットで行った。

オープンフィールド (open field : OF) を用いて、ラットの行動をスクリーニングし、さらに同週齢ラットで不安様行動の評価・解析のため高架式十字迷路 (elevated plus maze : EPM) および明/暗箱 (L/D) 試験を実施した。また、ストレスラーとしてEPMを用い、副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone : ACTH) およびコルチコステロン (corticosterone : CORT) の血漿レベルを経時的に測定した。

さらに、このSBIモデルの不安様行動の機序を検討するため、このモデル動物の、海馬におけるグルココルチコイド・リセプター (glucocorticoid receptor : GR) およびミネラルコルチコイド・リセプター (mineral corticoid receptor : MR) の mRNA発現をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (real time-polymerase chain reaction : RT-PCR) で解析し、ストレス関連脳領域でのモノアミン濃度を高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : HPLC) により解析した。

統計解析は、OFでは、分散分析、続いてBonferroni/Dunn検定を用いて群間差を評価した。EPMおよびL/D試験、PCRおよびHPLC分析では、Studentの t 検定により有意性を決定した。ホルモン測定では、2元配置分散分析、続いてTukey's post hoc検定を用いて有意性を決定した。p < 0.05の値を有意とみなした。

【結 果】

OFでは、S1群で他群と比べ有意な不安様行動の増加が観察されたが、S2群とC群間では差が認められなかった。以下の実験はS1プロトコルをS群としてC群との比較を行った。

EPMではS群のオープンアームへの侵入・滞在時間の減少が観察され、L/D試験で明箱での滞在時間の減少が認められた。

血中ホルモン計測では、EPM曝露に伴いACTH、CORTは上昇し、時間経過と共に減少したが、S群ではC群に比べ、EPM曝露早期での急激なACTHの立ち上がり、ACTHおよびCORTのピーク値の有意な増加、さらにピーク後の上昇維持が観察された。

PCR解析では、海馬でのMR mRNAの発現がC群に比べS群では有意に低下していた。また、有意差はなかったが、GR mRNAも同様の傾向が認められた。

HPLCによるモノアミン計測では、S群とC群の海馬に差は認められなかったが、背側前頭皮質 (dorsomedial prefrontal cortex : dmPFC) でS群がC群に比べDA、5-HT、NAの濃度が高い。一方、代謝回転または代謝の指標となるDOPAC/DAおよび5-HIAA/5-HT値に差はなく、同領域のシナプス部位でのモノアミン量の増加が示唆された。

【考 察】

OFによるスクリーニング実験から、早期揺さぶり群で有意に不安様行動の指標となる探索行動が減少した。一方、後期揺さぶり群は対照群と差が認められなかった。この結果は、SBIには脆弱性期

間があることが示唆される。さらにL/D試験およびEPMからもS群で不安様行動が増加することが確認された。S群ラットでは心理的ストレスであるEPM曝露でストレスホルモンの過剰分泌・分泌調節不全が認められた。これらストレスホルモンの分泌調節は視床下部-下垂体-副腎 (hypothalamic-pituitary-adrenal : HPA) 軸により調節され、視床下部の上位にある海馬のGRおよびMRがHPA軸のネガティブフィードバック機構の中心として働いている。S群海馬のGRおよびMRのmRNA発現の低下は、このネガティブフィードバックの機能不全を意味し、ネガティブフィードバックの低下からACTHの過剰分泌が生じ、引き続き過剰なCORTの分泌が起こる。このCORT分泌増加がラットの不安様行動を更に増加させたと考えられた。そして、ホルモン調節の他にHPLCによるモノアミンの解析から、HPA軸への神経性調節を行うdmPFCでのモノアミンの変化が行動の変容およびホルモン分泌に関与すると考えられた。

【結 論】

本研究では、幼若期に揺さぶり刺激を受けたラットが成熟期に心理的ストレスに対して不安様行動の増加および過剰なストレスホルモン反応を示した。さらに、海馬におけるステロイドホルモン受容体発現の低下およびモノアミンの変化が不安関連脳領域において観察された。先行研究より海馬および前頭前皮質は本モデル動物で一過性に微小脳出血を起こしやすい脳部位であり、この微小脳出血が行動・ホルモン変化の引き金になると考えられた。本モデル動物はヒトでのSBSを考える上で新たなモデルになることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

乳幼児揺さぶられ症候群 (shaken baby syndrome : SBS) は児の頭部が激しく揺さぶられる虐待によって惹起される。被虐待児は発達後に不安などの精神症状を起こすことが知られているが、既存のSBSモデル動物は血腫が大きく、死亡率も高いため長期変化での動物の行動変化を解析できず、揺さぶりによる脳障害 (shaking brain injury : SBI) が行動変化を起こす機序も解明されていない。申請論文では、幼若期の反復揺さぶり刺激により一過性微小脳出血を起こすSBIモデル動物を用いて、発達後のストレスに対しての行動解析、血中ホルモン計測さらに神経伝達物質およびストレスホルモン受容体の脳内変化を解析している。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、揺さぶり群ラットおよび対照群ラットを用いて、行動解析は標準的な実験方法であるオープンフィールド試験を行い、水平活動および垂直活動を計測している。ラットの不安様行動の解析には高架式十字迷路法に加え明暗箱法も用いて解析している。また、ストレスホルモン分泌の変化を検討するため、高架式十字迷路曝露による副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone : ACTH) およびコルチコステロン (corticosterone : CORT) の血漿レベルをラジオイムノアッセイ法にて経時的に測定している。更に、ストレスホルモンの過剰分泌の原因については、海馬での副腎皮質ステロイド受容体発現と脳におけるストレス関連領域でのモノアミン濃度を、それぞ

れリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応と高速液体クロマトグラフィーによって測定している。適切な対象群の設定と客観的な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

SBI後のhypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axisの変化は、いくつかの成体げっ歯類モデルで実証されているが、新生児SBIを受けた成体でのストレスに対するHPA軸の応答に関する報告はない。申請論文では新生児期の軽度SBI後のHPA応答に関する長期的結果を報告している。こういった報告はこれまでになされておらず、本研究は新奇性・独創性に優れたものと評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、幼若期ラットへの反復揺さぶり刺激により、成熟期に心理的ストレスに対し不安様行動の増加および過剰なストレスホルモン反応、海馬での副腎皮質受容体の発現低下、海馬と前頭前野でのモノアミン濃度の増加を示した。先行研究より海馬及び前頭前野はモデル動物で一過性微小脳出血を起こしやすい部位であり、この微小脳出血が行動・ホルモン・神経回路の変化の引き金になるのではないかと考察している。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、かつ先行研究の結果と照らし合わせても、矛盾するものではない。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、幼若期の反復揺さぶり刺激により一過性微小脳出血を起こすモデル動物を用いて発達後の不安様行動および過剰なストレスホルモン反応を認めることを明らかにしている。こうした結果は、これまでのSBSの疾患概念より軽症であっても発達後のホルモン調節系、神経系の調節に異常をきたすことにより不安様行動を起こす可能性があるという、臨床的に非常に示唆に富むものである。被虐待児における精神医学的病態の解明や治療法の開発につながると想定され、大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、臨床精神医学、神経科学や免疫組織化学の理論と実践を学んだ上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域での学会発表を経て国際誌に受理され、既に公開されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Physiology & Behavior

(199 : 118-126, 2019)