

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名           | 吉 村 篤   |
| 学 位 の 種 類     | 博 士 (医 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 博 士 第 5 5 3 号   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 1 9 年 9 月 1 2 日   |
| 学 位 論 文 題 目   | Influence of age or circadian time on bcl-2 and bax mRNA expression<br>in the rat hippocampus after corticosterone exposure<br><br>(コルチコステロン投与により生じるラットの海馬における bcl-2 と bax<br>mRNA の発現は加齢または概日時間に影響される) |
| 審 査 委 員       | 主 査 教 授 鳥 居 隆 三<br><br>副 査 教 授 岡 田 裕 作<br><br>副 査 教 授 清 水 猛 史   |

## 論文内容要旨

|  |  |              |                  |
|--|--|--------------|------------------|
| ※整理番号  | 558  | (ふりがな)<br>氏名 | よしむら あつし<br>吉村 篤 |
| 学位論文題目   | <p style="text-align: center;">Influence of age or circadian time on <i>bcl-2</i> and <i>bax</i> mRNA expression<br/>in the rat hippocampus after corticosterone exposure<br/>(コルチコステロン投与により生じるラットの海馬における<br/><i>bcl-2</i>と <i>bax</i> mRNA の発現は加齢または概日時間に影響される)</p> |              |                  |
| <p>【研究の目的】 最近ではうつ病または外傷後ストレス障害(PTSD)患者の海馬容積は相対的に減少していることが報告され、これによりストレスと海馬容積の減少についての関連性が注目されるようになった。またストレスにより一過性のコルチコステロン(CORT)濃度の上昇が生じ、これにより海馬に2次的な傷害が引き起こされることも知られている。副腎皮質ホルモン受容体には、グルココルチコイド受容体(GRs)とミネラルコルチコイド受容体(MRs)の2タイプがあるが、この両受容体が海馬における細胞の生存または死において重要な役割を果たしている。さらにGRに対する刺激は神経毒性作用があり、逆にMRへの刺激は神経保護作用があるといわれている。一方ラットにおいて加齢によりこれらMR/GRの機能比率が減少するという変化が生じ、CORTの血中濃度は6ヶ月齢を頂点に徐々に基礎分泌量が減少するという動態を示す。CORT血中濃度の日内変動もある。このような先行研究から、加齢やストレスを受ける時間帯の相違により、ストレスの反応性が変化することが予想されるが、これについては十分に検討されていない。そこで我々は、CORTを投与したラットを急性ストレス反応の動物モデルとして、アポトーシス関連遺伝子である<i>bcl-2</i>および<i>bax</i> mRNAの海馬での発現比率をストレス反応性の指標として用い、ストレスが負荷される時間帯と年齢の相違が海馬でのストレス反応にどのように影響するかを検討した。</p> <p>【方法】 雄のWistar ラット10週齢と6カ月齢各N=26をRT-ISH用と、投与後4時間の血清CORT濃度を測定する用に各N=4~5ずつ6つの群に分けた。ラットは0800-2000hの光明暗環境で個別に飼育された(0800から明期、2000hから暗期)。CORT (10 mg/kg)は0800hまたは2000hに皮下注を行い、投与直後、投与2時間、投与4時間のポイントで断頭した。対象としてvehicleの投与も行った。血清のCORT濃度は投与0h及び4h後にラジオイムノアッセイを用いて測定した。海馬組織を16<math>\mu</math>mの厚さにスライスし、スライドガラス上で固定洗浄処置後、切片の海馬各領域であるCA1、CA2、歯状回(DG)における<i>bcl-2</i>、<i>bax</i> mRNAの発現をin situ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-ISH)を用いて検出した。形態画像はCCDカメラを用い取り込み、海馬の各領域でのハイブリダイゼーションシグナルは光学濃度スキャナーで取り込み、NIH imageを用いて画像解析し定量化した。定量化するにあたり、CA3で観察されたmRNA濃度を基準値(100%)として用い、相対的なDG及びCA1のmRNA濃度(%)を算出した。</p> |  |              |                  |

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

**【結果】**

1) CORTの血清濃度は6週齢のラット(young) 6ヶ月齢のラット(adult)何れにおいてもvehicle投与では明期のはじまりである8時(0800h)に低く、暗期の始まりである20時(2000h)に高い傾向が見られたが、この傾向はadultにおいてより顕著であった(\*\* $p < 0.001$ )。またyoung adult何れにおいても、0800hのCORTの投与によりvehicle投与に比べ有意にCORT血清濃度が上昇した。

2) 海馬での*bcl-2* mRNAの比率(*bcl-2/bax*比) : DGではおける*bax* mRNAに対するは、CORT投与2時間後ではyoungにおいて0800hまたは2000h投与で有意に減少した(\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ )。adultにおいては、CORTを0800hに投与した場合のみ*bcl-2/bax*比は有意に減少したが(\*\* $p < 0.01$ )、2000h投与では変化はなかった。この投与時刻によって生じる特異的な違いは、adultの場合にのみ見られた。一方CA1においては、youngではCORT投与4時間まで特に有意な変化はなかったが、adultでは0800hに投与した群で2時間後に有意に減少し(\* $p < 0.05$ )、投与時間後には投与前の値に回復した。

**【考察】** ステロイドが認知機能の低下を誘発することが動物実験から証明されており、CORTの暴露による神経傷害は、神経保護作用があるMRと神経毒性があるGRの機能的なバランスに影響されるといわれている。CORTは1mg/kgという低濃度ではMR有意なアゴニスト作用があり、逆に今回の実験のように10mg/kgといった高濃度のCORTはGR優位のアゴニストとして作用するとされている。今回の実験ではアポトーシス抑制タンパクである*bcl-2*と、アポトーシス促進タンパクである*bax*のmRNAの発現比率(*bcl-2/bax* mRNA比)を神経細胞のアポトーシスの動態観察する因子として用いた。その結果CORT投与2時間後に*bcl-2/bax* mRNA比が減少したが、これらの一過性の変動は、先行研究の急性のデキサメサゾン(DEX)投与や副腎摘出時に観察されるアポトーシスが誘発される海馬の傷害パターンと一致した。一部adultにおいて2000h投与群のみ*bcl-2/bax* mRNA比の減少が見られなかったという加齢依存性の相違がみられた。ラットにおいて加齢によりMR/GRの機能比率が減少しCORTの代謝能が減退するといわれており、これが今回の実験で見られた加齢による*bcl-2/bax* mRNA比の動態変化が生じたと考えられる。また急性のDEXの投与によりDGで誘発されるアポトーシスは、加齢により反応性が増加すると報告されている。また加齢は海馬の傷害に関連したいくつかのサイトカインやそれに連動する内因性のグルココルチコイドの代謝に影響を及ぼすといわれている。逆にCORTの投与時刻の違いにより、adultにおいてはCORTの血清濃度と海馬での*bcl-2/bax* mRNA比の反応性の変化が観察されたことになるが、これはCORTの基礎分泌濃度とGR/MR mRNAの濃度が概日リズムに従って変動することとグルココルチコイドに内分泌の概日リズムが存在することに関連があると考えられる。

**【結論】** ラットに対する高濃度 CORT の投与の結果生じる海馬でのアポトーシス関連遺伝子の発現は、CORT 分泌リズムに関連した投与時間帯と週齢の相違によって異なる反応を示した。これにより加齢と概日時間はストレスパラダイムに影響する重要な因子であると考えられる。

## 学位論文審査の結果の要旨

|   |     |    |      |
|---|-----|----|------|
| 整理番号  | 558 | 氏名 | 吉村 篤 |
| (学位論文審査の結果の要旨)  |     |    |      |
| <p>ラットにおいては、急性のストレスにより内因性のコルチコステロン (CORT) 濃度の上昇が生じ、視床下部-下垂体-副腎系を介し、海馬の細胞死(アポトーシス)が生じることが報告されている。本研究では、10 週齢と 6 ヶ月齢の異なる週齢のラットに高濃度の CORT を明期の始まりと暗期の始まりの二つの異なるタイムポイントで投与した後に、CORT 血中濃度の変化と海馬でのアポトーシス関連タンパクである bcl-2/bax の mRNA の発現の経時変化を in situ RT-PCR 法を用いて評価し、ストレス感受性の日内差及び週齢差の検討を目的とした。</p> <p>その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 成熟したラットは若いラットに比べ CORT 投与の海馬での影響を受けにくい。</li> <li>2) 若いラットは成熟したラットに比べ、ストレス感受性の日内変動が乏しい。</li> <li>3) 明期の始まりのストレスは、暗期の始まりのストレスに比べ海馬に傷害を与えやすい。</li> </ol> <p>ことが示唆された。</p> <p>本研究は、研究が進んでいないストレス感受性の日内差及び年齢差に着目したものであり、ストレス性疾患の治療への応用が期待できる有用な情報を提供した。</p> <p>よって博士 (医学) の学位論文に値すると評価された。</p> |     |    |      |
| (平成 19 年 8 月 29 日)  |     |    |      |