



|              |                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ストレス感受性の性差について                                                                      |
| Author(s)    |                                                                                     |
| Citation     | 令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業<br>研究成果報告書．2024                                          |
| Version Type | VoR                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/95175">https://hdl.handle.net/11094/95175</a> |
| rights       |                                                                                     |
| Note         |                                                                                     |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                |          |            |    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|------------|----|-----|
| ふりがな<br>氏名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | みやした こうへい<br>宮下 滉平                                                                                                                             | 学部<br>学科 | 歯学部<br>歯学科 | 学年 | 4 年 |
| ふりがな<br>共同<br>研究者氏名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                | 学部<br>学科 |            | 学年 | 年   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                |          |            |    | 年   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                |          |            |    | 年   |
| アドバイザー教員<br>氏名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 田熊 一徹 / 早田 敦子                                                                                                                                  | 所属       | 歯学研究科      |    |     |
| 研究課題名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | ストレス感受性の性差について                                                                                                                                 |          |            |    |     |
| 研究成果の概要                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 研究目的, 研究計画, 研究方法, 研究経過, 研究成果等について記述すること. 必要に応じて用紙を追加してもよい. (先行する研究を引用する場合は, 「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い, 盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること.) |          |            |    |     |
| <p>【研究目的】</p> <p>ストレスは生体において様々な反応を引き起こす内的または外的な刺激のことであり, 適度なストレスは良い緊張感や集中力の向上をもたらし, 人間の成長や発達を促すものと考えられている. 一方で, 過度のストレスは心身の変調を引き起こし, 生活習慣病や精神神経疾患の発症や病態悪化に繋がる要因とされている. ストレス関連疾患の有病率を調べてみると, 多くの疾患で性差があり, なかでもうつ病やパニック障害といった精神疾患においては, 女性の有病率が男性より約2倍高いことが報告されている. しかしながら, 有病率の性差を説明しうる病態分子基盤については未だ明らかにされていない. 申請者は令和4年度の歯学部基礎配属実習で, 雌雄の成体マウスに単回あるいは反復にて身体的な拘束ストレスを負荷して行動解析と生化学的解析を行った結果として, 雌性マウスは雄性マウスと比べてストレス感受性が高いという性差を認めた.</p> <p>そこで本研究課題では, これらの拘束ストレス負荷マウスを用いて, 精神疾患発症の性差をもたらす分子機序を追究することを目的とした.</p> <p>【研究計画】</p> <p>本研究課題では, 単回あるいは反復にて身体的な拘束ストレスを負荷した雌雄の成体マウスを用いて, 行動解析を追加して情動行動変化の性差について更なる検証をするとともに, 遺伝子発現解析を行い抑うつ様ならびに不安様行動の発現の性差に関わる分子の解明を試みた.</p> <p>【研究方法】</p> <p><b>実験動物:</b> 雌性および雄性のICR系マウス(7週齢)を日本エスエルシー株式会社より購入して用いた. マウスは明期・暗期それぞれ12時間の条件下で飼育し, 実験開始までの飼育期間は自由に飲水および節餌が行えるようにした.</p> |                                                                                                                                                |          |            |    |     |

**拘束ストレスの負荷：**拘束ストレスは、呼吸および体温調節ができるように先端部と側面部に穴を開けた 50 mL のプラスチック製遠沈管にマウスを入れ、飼育ケージ内に静置することで負荷をした。単回ストレス群は 30 分の拘束ストレスを 1 回だけ負荷した。反復ストレス群は 1 日 4 時間の拘束ストレスを 5 日負荷した、反復ストレス群においては、マウスの健康状態の確認を含めた基礎的データの収集のため、ストレス負荷後に毎回体重を測定することとする。

**薬物投与：**男性ホルモンの役割を検討する目的で、非ステロイド性アンドロゲン受容体拮抗薬であるフルタミドを雄性マウスに投与した。投薬は、20mg/kg の用量で拘束ストレス負荷開始の 30 分前に腹腔内注射にて行った。

**行動解析：**マウスの抑うつ様行動は強制水泳試験により解析した。被験マウスを水深 13.0 cm (水温  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) としたアクリル製シリンダー (直径 19.0 cm, 高さ 25.0 cm) 内へ静かに入れ、6 分間の行動をビデオ録画した。「水面に浮く為の最小限度の行動を除いた静止状態」を無動と定義し、6 分間に観察される無動の総時間を手動で計測した。新奇環境下におけるマウスの自発的行動はオープンフィールド試験により解析した。被験マウスを 30 cm × 30 cm × 30 cm の塩ビ製ボックス内の中央に静かに置き、20 分間の自由行動をビデオ録画し、ANY-maze Video Tracking Software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) を用いて、総移動距離、中央区画侵入回数および中央区画滞在時間を測定した。なお、ボックス底面の中央部 (全体面積の 30%) を中央区画と定義した

**血漿コルチコステロン量の測定：**行動解析後に血漿標品を調製し、血漿コルチコステロン量を Corticosterone ELISA Kit (Cayman Chemical 社製) を用いて定量した。

**遺伝子発現変動の解析：**行動解析後に全脳を摘出し、視床下部室傍核 (PVN) を分画し mRNA 標品を調製した。逆転写後 Real-time PCR 法により、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、アルギニンバソプレシン (AVP)、オキシトシン、エストロゲン受容体 (Esr1)、アロマターゼおよび甲状腺ホルモン変換酵素の mRNA 発現量変化を解析した。

**統計解析：**データは全て「平均値  $\pm$  標準誤差」で表し、統計解析ソフト StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。2 群の比較は対応のない *t* 検定により行った。3 群以上の比較は ANOVA および *post hoc* Tukey 法により行った。いずれも有意水準は  $P < 0.05$  とした。

#### 【研究経過】

**急性拘束ストレスあるいは慢性拘束ストレスが雌性マウスの抑うつ様行動に及ぼす影響：**令和 4 年度の歯学部基礎配属実習で実施した強制水泳試験において、単回の急性拘束ストレス (30 分, 1 回) が雄性マウスの無動時間に影響を示さず ( $P = 0.29$ ,  $n = 6$ )、雌性マウスの無動時間を有意に減少させること ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ )、また、5 日間の慢性拘束ストレス (1 日あたり 4 時間) を負荷した雌性マウスが不動時間の増加傾向を示すことを認めた (雄:  $P = 0.86$ ,  $n = 6$ ; 雌:  $P = 0.088$ ,  $n = 6$ )。すなわち、雄性マウスにくらべて雌性マウスのほうがストレスによって抑うつ症状が惹起されやすいことを見出した。

## 【研究成果】

**抗アンドロゲン薬の反復投与が慢性拘束ストレスを負荷した雄性マウスの抑うつ様行動および血漿****コルチコステロン濃度に及ぼす影響**：5 日間の慢性拘束ストレスによる雄性マウスの体重増加量の低

下に対してフルタミドは改善傾向を示したが有意な効果はなかった (Control vs. Stress:  $P < 0.05$ ; Stress vs. Flutamide:  $P = 0.064$ ,  $n = 6$ ). 一方, 強制水泳試験における無動時間ならびに血漿コルチコステロン濃度においては, 5 日間の慢性拘束ストレス負荷ならびにフルタミド反復投与の影響は認められなかった (強制水泳試験:  $F_{2,15} = 1.608$ ,  $P = 0.23$ ; コルチコステロン濃度:  $F_{2,14} = 1.672$ ,  $P = 0.22$ ). すなわち, ストレス誘発性抑うつ行動に男性ホルモンは発症抑制といった保護的作用を持たないことが示唆された。

**慢性拘束ストレスが雌性 ICR マウスの新奇環境下での自発的行動に及ぼす影響**：オープンフィールド

ド試験において, 慢性拘束ストレスは雌性マウスの総移動距離に影響を及ぼさなかったが (図 A:  $P = 0.94$ ,  $n = 3$ ), 中央区画侵入回数 (図 B) および中央区画滞在時間 (図 C) を有意に減少させることを認めた (回数:  $P < 0.05$ ; 時間:  $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ). ストレス感受性の性差をより明らかとするために, 今後さらに雄性マウスでの解析が必要であるが, 少なくとも今回の成果より, 慢性拘束ストレスは雌性マウスにおいて抑うつ様行動だけではなく不安様行動も惹起していることを見出した。

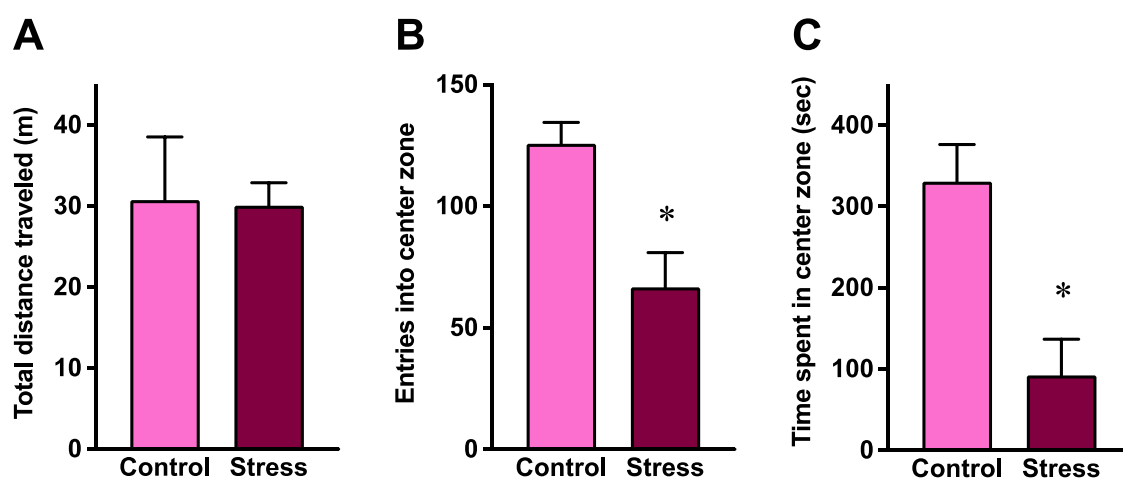


図. 慢性拘束ストレスが雌性ICRマウスの新奇オープンフィールドでの自発的行動に及ぼす影響. **A:** 総移動距離 (m); **B:** 中央区画侵入回数; **C:** 中央区画滞在時間 (sec). \* $P < 0.05$ , 対照群と比較して (unpaired  $t$  test).

**慢性拘束ストレスが ICR マウス PVN のストレス関連分子ならびに女性ホルモン関連分子の mRNA**

**発現に及ぼす影響**：雌雄マウスの PVN 分画より cDNA 標品を調製し, 慢性拘束ストレスが BDNF, AVP, オキシトシン, Esr1, アロマターゼおよび甲状腺ホルモン変換酵素の mRNA 発現量に及ぼす影響についての検討を試みた。しかしながら, 雄性マウスで慢性拘束ストレスによりオキシトシン発現が増加する傾向が見られているものの, 現時点において統計解析ができたものは雌性マウスの BDNF,

AVP および Esr1 についてのみでいずれも有意な変化は認められなかった (BDNF:  $P = 0.29$ ; AVP:  $P = 0.89$ ; Esr1:  $P = 0.15$   $n = 3$ ). ただし, 雄性マウスで標品数を確保できなかったように, 高品質の cDNA 標品を調製する技術の習得という点でまだ大きな課題が残されていると考えている. したがって, 今後しっかりと技術を向上させ, そのうえで追加実験ならびに再実験を行い, 以上の分子変動の再解析を実施したい.