

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	荒木 基亮
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 The role of glucocorticoid receptors in the induction and prevention of hippocampal abnormalities in an animal model of posttraumatic stress disorder (PTSD モデルラットにおける海馬異常の惹起と予防に関するグルココルチコイド受容体の役割の検討)			
論文審査担当者			
主査	教授	池上 浩司	印
審査委員	教授	相澤 秀紀	
審査委員	講師	沖 健司	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>外傷後ストレス障害 (posttraumatic stress disorder: PTSD) では重篤なストレス事象に遭遇した後, 一定期間を経て病態が形成されることが知られているが, その機序は十分に解明されておらず, 詳細な病態の理解に基づいた新たな予防法・治療法の開発が望まれている。PTSD の病態に関与する脳部位に関して未だ結論は得られていないが, これまでの動物モデルを用いた研究では内側前頭前野や海馬の神経可塑性の障害の関与が指摘されている。特に, 海馬は PTSD 患者の MRI 研究においても萎縮が報告されている。ストレス負荷による海馬萎縮の機序の一つとして, 副腎皮質ホルモンの過剰分泌に引き続いて起こるグルココルチコイド受容体 (GR) の活性化を介した神経細胞のアポトーシス制御機構の変化 (抑制因子 Bcl-2/促進因子 Bax 比の相対的低下) が提唱され, PTSD モデル動物における海馬神経細胞のアポトーシス増加が報告されている。しかしながら, 重篤なストレス曝露後に GR がどのようにしてアポトーシス関連遺伝子の発現調節に影響するかは明らかになっていない。本論文では, PTSD モデルである Single Prolonged Stress (SPS) ラットを用いて, ストレス負荷後急性期における核内 GR 量と GR を介したアポトーシス関連遺伝子の発現変動が検討された。さらに, ストレス負荷後に GR 阻害薬が投与され, SPS ラット海馬におけるアポトーシスの増加や行動異常に対する効果が検討された。</p> <p>本論文では全ての実験が雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて行われた。SPS として, 拘束ストレス 2 時間, 強制水泳 20 分, エーテル深麻酔の連続曝露が行われた。SPS 負荷後急性期の海馬における核内 GR 量の解析には, 抽出した核タンパク質の western blot 解析が用いられた。アポトーシス関連遺伝子として, ストレスでの変動が多数報告されている Bcl-2 および Bax 遺伝子が評価された。GR は転写因子として機能するため, 両遺伝子のプロモーター領域への GR の結合をクロマチン免疫沈降法と real time PCR 法により, 遺伝子発現変化を real time RT-PCR 法により解析された。SPS 直後に GR 阻害薬である RU486 を皮下投与することで, SPS 負荷後急性期の核内 GR 量, Bcl-2 および Bax の遺伝子発現変化における GR の寄与が検証された。さらに, SPS 負荷 1 週後に SPS ラットで生じる海馬神経細胞のアポトーシスに対する RU486 の効果が, TUNEL 法を用いて解析された。PTSD の主要な症候と提唱されており SPS ラットが呈する恐怖記憶の消去の障害に対する RU486 の影響が, 文脈的恐怖条件付け試験を用いて検証された。</p> <p>核内 GR 量は SPS 直後に増加し, 2 時間後にピークとなった。その際, SPS ラットの Bcl-2 遺伝子プロモーター領域への GR の結合が亢進し, Bcl-2 の mRNA レベルも低下した。これに対して Bax 遺伝子プロモーター領域への GR の結合および mRNA レベルはともに有意な変化を認めなかった。RU486 投与により, SPS ラットにおける核内 GR 量の増加と Bcl-2 mRNA レベルの低下が阻害された。さらに, RU486 投与により, SPS の 1 週間後の SPS ラットにおける海馬神経細胞のアポトーシスの増加と恐怖記憶消去の障害が阻害された。</p>			

本研究における一連の実験結果から、SPS ラットで生じる海馬神経細胞アポトーシスの増加には、SPS 直後の GR の核内移行および Bcl-2 遺伝子上のグルココルチコイド応答配列 (glucocorticoid response element : GRE) への結合増加を介した Bcl-2 遺伝子発現低下が関与することが示唆された。核内 GR による遺伝子発現調節には亢進と抑制の双方向への機序が存在し、抑制には negative GRE と呼ばれる配列が関与するとされる。Bcl-2 遺伝子はこの negative GRE を有し、グルココルチコイドの投与でその発現が抑制されることが報告されており、本研究でも GR 阻害薬投与で SPS ラットにおける海馬のアポトーシス増加が抑制されたことから、この経路を介した Bcl-2 の発現低下がアポトーシス制御機構の恒常性の変化につながったと考えられた。海馬は扁桃体や内側前頭前野皮質などの脳部位と共に恐怖記憶の消去を担う神経回路を形成しており、GR 阻害薬による海馬のアポトーシス抑制が SPS における恐怖記憶の消去障害の改善に関連したと考えられた。

PTSD と副腎皮質ホルモンの関連は広く認識されているが、本研究は GR 系の亢進から海馬のアポトーシスに至る PTSD の病態形成過程を初めて示すとともに、GR 阻害薬投与によって PTSD の発症を予防できる有望な可能性を提示した。

以上のように、本論文は PTSD の病態形成過程を明らかにし、新規予防法の開発に寄与する優れた論文である。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。