

令和元年6月6日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02479

研究課題名(和文) ストレス耐性に向けた母子関係による脳腸関連発達機構の解明

研究課題名(英文) Brain-gut axis mechanisms formed by mother-pup interactions for the resilience to stress

研究代表者

菊水 健史 (Kikusui, Takefumi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90302596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：早期離乳マウスでは恐怖の消去学習が上手く行われず、前頭葉のBDNF mRNA及びBDNF蛋白質が低下した。これらの間には負の相関もみられ、早期離乳による恐怖記憶の消去抵抗性には、前頭葉におけるBDNF mRNAの発現低下を介したBDNF作用の減弱が関与することが想定された。さらに早期離乳マウスの糞便では通常離乳とは異なる細菌叢を示し、またその細菌叢の変化がうつ様行動にかかわることが示された。並行してTregを中心とする腸内免疫叢の変化も確認された。また無菌マウスに細菌叢を定着させる実験を実施したところ、早期離乳マウスの細菌叢はうつ行動を上昇させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幼少期の環境が、個体の成長に与える影響、特に不安行動や社会性の障害における影響は、動物に限らずヒト社会でも危急の課題である。今回の研究で、1) 幼少期環境は前頭葉の神経栄養因子の発達に特異的なエピジェネティック変化を及ぼすこと、3) 並行して腸内細菌叢と免疫系の変化が認められること、4) 腸内細菌叢の変化自体が、中枢発達に強い影響を与えること、5) 腸内細菌叢を改善することで幼少期ストレスの効果を軽減させる可能性があること、が見いだされた。幼児虐待が増加の一途をたどる現代日本において、その分子生物学的な機序の解明は新たな予防法や治療法に資する成果といえる。

研究成果の概要(英文)：In early weaning mice, fear extinction learning was impaired, and BDNF mRNA and BDNF protein in the frontal lobe decreased. A negative correlation was also found between them, and it was postulated that the resistance to extinction of fear memory by early weaning involves the attenuation of the BDNF action through the decrease in expression of BDNF mRNA in the frontal lobe. Furthermore, it was shown that feces of early weaning mice usually show a different bacterial flora from weaning, and that changes in the bacterial flora are involved in depression-like behavior. In parallel, changes in the intestinal immunoplexus centered, such as Tregs were also confirmed. In addition, experiments to establish the bacterial flora in germ-free mice have shown that the bacterial flora of early weaning mice increased depression behavior and was related to an increase in interindividual distance and a decrease in BDNF in the intracerebral lobe.

研究分野：動物行動学

キーワード：マウス 母子間 ストレス 腸内細菌叢 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ストレス情動や社会行動を司る神経回路を世界に先駆けて明らかにしてきた (Nature 2007, Nature 2010)。また通常より1週間早期に離乳され、母性因子を剥奪された動物における不安や攻撃性の上昇、ストレス反応性の亢進が認められた (J. Neuroendocrinol. 2009、他 15 報)。これら行動変化に並行して、情動神経回路における発達障害を見出した。具体的にはストレス情動制御機構に関連する海馬グルココルチコイド受容体の発現量の低下 (Behav. Bran Res. 2007)、不安や攻撃行動に関わる神経栄養因子である脳由来神経栄養因子や神経新生、ミエリン形成の異常化などを見出してきている (Psychoneuroendocrinology, 2009)。特にストレス応答の亢進は永続的に認められ (Behav. Bran Res. 2007)、動物の生産性や管理、感染免疫の観点からも意義が高い。実際に早期離乳マウスでは免疫活性因子である IL-6 の過剰分泌が観察されている。またメス動物においては母性行動の低下とその産仔の発達障害が認められ (Behav. Bran Res. 2006)、単世代における母性因子の剥奪が後世代においても中枢神経や生体機能の変容を引き起こすことが明らかとなった。さらに、この早期離乳によるストレス亢進メカニズムが離乳直後に起こるグルココルチコイドの過剰分泌が原因分子であることを突き止めた。

興味深いことに、早期離乳マウスの腸内細菌叢は通常離乳マウスのものと異なっていた。この腸内細菌叢の役割を調べるため、無菌マウスに早期離乳、通常離乳マウスそれぞれの糞便を生着させたところ、早期離乳マウスの糞便を生着させたマウスでは腸間膜リンパ節とパイエル板における T 細胞に生存分化シグナルを伝達する樹状細胞が増加し、さらに大腸の筋層における炎症性反応が検出された。これらのことから、早期離乳による一過性のグルココルチコイドの上昇が、脳-副腎-腸-腸内細菌叢の機能を変容させ、永続的にグルココルチコイドを過剰分泌させるようになり、脳・身体のエピゲノム修飾を介して、様々な生体機能破綻を引き起こすと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、幼少期母性因子の剥奪によって引き起こされる分子メカニズムの解明と、その分子変化を指標に、動物領域における腸内細菌叢の操作による新たな生体機能の強化手法の確立を目指す。

1) BDNF低下の分子メカニズム解明: 早期離乳マウスにおける不安行動の上昇にかかわる分子メカニズムの同定を目指す。特に注目しているBDNFのエピジェネティック制御機構の解明を目指す。グルココルチコイドが直接BDNFの発現に関与するかどうかを、グルココルチコイド受容体 (GR) とBDNFの共染色にて調べる。さらに早期離乳マウスと通常離乳マウスにおけるBDNFのプロモータ領域のメチル化ならびに遺伝子領域におけるクロマチン修飾の変化を調査する。

2) グルココルチコイド過剰分泌に関与する腸内細菌叢: 早期離乳されたマウスにおける腸内細菌叢の変容を明らかにする。さらに無菌マウスに早期離乳マウスの腸内細菌叢を生着させ、腸内細菌叢がGC過剰分泌に関わるかを実証する。さらに早期離乳された動物に健全な個体に特異的な細菌叢を戻すことで、ストレス応答への改善効果を調べる。

3) 腸内細菌叢-腸管免疫-中枢-副腎 関連の解析: 早期離乳による腸内細菌叢と腸管免疫に与える影響を、特に腸内細菌との関連の報告があり、かつ腸管免疫系の恒常性維持に重要と考えられる制御性T細胞とTh17細胞を中心に調べる。さらにその変化が中

枢、特に情動機能に与える影響を、分子遺伝学的手法を持って実証する。

3. 研究の方法

研究計画・方法(概要) 研究目的を達成するための研究計画・方法について、簡潔にまとめて記述してください。

早期離乳マウスの不安上昇の分子メカニズム解明: BDNF 発現がグルココルチコイド (GC) 過剰分泌により制御を受けるかどうか、グルココルチコイド受容体 (GR) と BDNF の共染色を前頭葉で実施する。さらに早期離乳マウスの BDNF の遺伝子発現制御領域のプロモータ活性を mRNA 発現として解析する。またその部位のメチル化状態をバイサルフェートシーケンス法を用いて調査する。

グルココルチコイド過剰分泌に關与する腸内細菌叢の同定: 早期離乳マウスにおいて特異的な変化を示す腸内細菌叢を同定し、無菌マウスに投与して GC 分泌に与える影響を実証する。またその他の不安行動やうつ様行動を調べ、腸内細菌叢の中枢発達に与える影響を解析する。さらに早期離乳マウスに正常糞便を投与し、GC 過剰分泌が軽減するかを調べる。

腸内細菌叢-腸管免疫-中枢-副腎 相関の解析: 早期離乳は全身性の過剰 GC 状態を生み出す。この伝達機構を明らかにすることを目的に、腸内細菌叢による腸管免疫系の変化、特に制御性 T 細胞と Th17 細胞を中心に調べる。また情動制御中枢である前頭前野に着目し、神経栄養因子の発現変化を明らかにする。

4. 研究成果

早期離乳マウスの不安上昇の分子メカニズム解明: 早期離乳マウスの不安増強効果の永続的な機能を調べるため、恐怖条件付け後の消去抵抗性を評価した。恐怖条件付けを受けた早期離乳マウスでは消去学習が上手く行われず、消去過程の後半における消去の抵抗性が増加した。並行して前頭葉の BDNF mRNA 及び BDNF 蛋白質が低下した。さらに、これらの間には負の相関もみられたことから、早期離乳による恐怖記憶の消去抵抗性には、前頭葉における BDNF mRNA の発現低下を介した BDNF 作用の減弱が関わっていることが想定された。BDNF 発現制御領域である Bis1-7 領域の DNA メチル化状態を精査したところ、予想と逆、つまり早期離乳マウスの CpG アイランドは低メチル化であった。またこのメチル化状態とオープンフィールド試験におけるコーナー滞在時間に相関が認められ、行動に關係する可能性が示された。

これまで早期離乳された雌マウスの母性行動の低下とそれに続く次世代マウスの母性行動の低下を見出していた。この遺伝子によらない伝承機構の解明を目指し、早期離乳マウスが出産した後、通常離乳メスの子と入れ替える里子操作を行った。里子効果が認められ、幼少期環境が母性行動を変化させることが明らかとなった。この時、母親由来の細菌叢の伝達が示唆された。

グルココルチコイド過剰分泌に關与する腸内細菌叢の同定: 幼少期の腸内細菌叢が及ぼす社会不安障害への影響を明らかにするため、無菌マウスを 4 週齢で通常環境に移動し、その後 SPF マウスと成長後の社会性の評価を実施した。無菌マウス由来の個体は、個体間距離が延長し、また他個体に対する不安を呈することが示された。さらにそれに並行して前頭葉の BDNF の発現が低下、ストレス応答因子である FOSB の発現が上昇した。これらの変化が発達期における腸内細菌叢の種によるかを明らかにす

るため、SPF 由来の通常マウスと混飼育を行い、細菌叢の均一化を図った。その結果、無菌マウスで認められていた個体間距離の延長や脳内前頭葉の BDNF の低下、FosB の上昇が改善した。このことは細菌叢による社会不安障害の形成には幼少期特異的な効果があることが示された。また腸内細菌叢を正常化させることで、社会性が改善されることを見出した。

同じように、無菌マウスと SPF マウス、マウスの細菌叢を定着させた無菌マウスにおけるストレス内分泌の発達ならびに生殖内分泌の発達を追跡した。その結果、無菌マウスではグルココルチコイドの分泌が非常に低下していた。同じように、エストラジオールとプロゲステロンの分泌も低下していたことから、細菌叢がステロイド合成能を正常化させる機能を担うことが示された。また無菌マウスでは性嗜好性の発達も障害されていた。無菌マウスに通常のマウスの細菌叢を定着させることで、障害が改善されたことから、細菌叢による改善効果を見出した。

最後に早期離乳マウスの獲得形質における腸内細菌叢の役割を調べた。通常離乳マウスと比較し、Firmicutes 門が増加し、その構成が大きく異なっていることが明らかとなった。幼少期の腸内細菌叢が及ぼす社会不安障害への影響を明らかにするため、無菌子マウスに早期離乳由来の糞便から抽出した細菌叢を生着させ、成長後のストレス応答性や腸管免疫系の変化を解析した。その結果、早期離乳マウスの細菌叢が定着したマウスではうつ傾向が高まり、またストレス応答性が疲弊化していた。さらに胃潰瘍を呈し、大腸ならびに脾臓の Treg 発現が低下した。行動と細菌叢の網羅的解析を実施し、原因菌の候補を同定した。具体的には、バクテロイデスのいくつかの菌種ならびに、Robinsoniella のいくつかの菌種が内分泌応答に、エリユシペロトリクスのいくつかの菌種が不安行動に関係することを見出した。

またこれまで早期離乳された雌マウスの母性行動の低下とそれに続く次世代マウスの母性行動の低下を見出していた。この遺伝子によらない伝承機構の解明を目指し、早期離乳マウスが出産した後、通常離乳メスの子と入れ替える里子操作を行った。里子効果が認められ、幼少期環境が母性行動を変化させることが明らかとなった。この時、早期離乳マウスにおいて、妊娠出産に伴う細菌叢の変動が認められず、ディスバイオシスになっていることが明らかとなった。

腸内細菌叢-腸管免疫-中枢-副腎 関連の解析：早期離乳マウスの糞便から抽出した細菌叢を定着させたノトバイオームマウスの行動、細菌叢、内分泌の相互相関を解析した。CD3+細胞はマーブルバリングテストの移動量と負の相関、Foxp3+Nrp1+ inCD4 cell は尾懸垂テストの不動時間とグルココルチコイドの分泌量と正の相関が得られた。また腸膜間リンパ節では、マーブルバリングテストの移動量と MHCII+CD11c, Foxp3-RORg1, CD11c+CD11b が正の相関を、Foxp3+RORg1-, Foxp3Nrp1-, Foxp3+, Foxp3+Nrp1+が負の相関を示した。グルココルチコイドの分泌は腸内細菌叢との関連解析で、バクテロイデス、Blautia, Robinsoniella など正の相関を示し、マーブルバリングテストの移動量は Dorea, Clostridium XVIII, Lachnospiraceae_incertae, Desulfovibrinaceae と正の相関を示した。これらの相互相関から、腸内細菌叢と免疫系が相互作用することで、中枢の発達に強い影響を与えることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 31 件)

1. Takita, Masatoshi; Kikusui, Takefumi; Early weaning influences short-term synaptic plasticity in the medial prefrontal-anterior basolateral amygdala pathway *Neuroscience research* 103 48-53 2016
2. Takahashi, Tomohisa; Okabe, Shota; Broin, P Ó; Nishi, Akira; Ye, Kenny; Beckert, Michael V; Izumi, Takeshi; Machida, Akihiro; Kang, Gina; Abe, Seiji; Structure and function of neonatal social communication in a genetic mouse model of autism *Molecular psychiatry* 21 9 1208 2016
3. Mogi, Kazutaka; Ishida, Yuiko; Nagasawa, Miho; Kikusui, Takefumi; Early weaning impairs fear extinction and decreases brain derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice *Developmental psychobiology* 58 8 1034-1042 2016
4. Kikusui, Takefumi; Ishio, Yukino; Nagasawa, Miho; Mogil, Jeffrey S; Mogi, Kazutaka; Early weaning impairs a social contagion of pain related stretching behavior in mice *Developmental psychobiology* 58 8 1101-1107 2016
5. Okabe, Shota; Tsuneoka, Yousuke; Takahashi, Aki; Ooyama, Rumi; Watarai, Akiyuki; Maeda, Sayaka; Honda, Yuka; Nagasawa, Miho; Mogi, Kazutaka; Nishimori, Katsuhiko; Pup exposure facilitates retrieving behavior via the oxytocin neural system in female mice *Psychoneuroendocrinology* 79 20-30 2017
6. Saito, Harumi; Nishizumi, Hirofumi; Suzuki, Satoshi; Matsumoto, Hideyuki; Ieki, Nao; Abe, Takaya; Kiyonari, Hiroshi; Morita, Masahiko; Yokota, Hideo; Hirayama, Nozomi; Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT *Nature communications* 8 16011 2017
7. Inokuchi, Kasumi; Imamura, Fumiaki; Takeuchi, Haruki; Kim, Ryang; Okuno, Hiroyuki; Nishizumi, Hirofumi; Bito, Haruhiko; Kikusui, Takefumi; Sakano, Hitoshi; Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odour-induced attractive social responses *Nature communications* 8 15977 2017
8. Hattori, Tatsuya; Osakada, Takuya; Masaoka, Takuto; Ooyama, Rumi; Horio, Nao; Mogi, Kazutaka; Nagasawa, Miho; Haga-Yamanaka, Sachiko; Touhara, Kazushige; Kikusui, Takefumi; Exocrine gland-secreting peptide 1 is a key chemosensory signal responsible for the Bruce effect in mice *Current Biology* 27 20 3197-3201. e3 2017
9. Kikusui, Takefumi; Early weaning increased emotional behavior in mice *J Pharmacol Sci.* 130 3 S63-S63 2016
10. Watarai, Akiyuki; Arai, Natsuki; Miyawaki, Shingo; Okano, Hideyuki; Miura, Kyoko; Mogi, Kazutaka; Kikusui, Takefumi; Responses to pup vocalizations in subordinate naked mole-rats are induced by estradiol ingested through coprophagy of queen ' s feces *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 37 9264-9269 2018
11. Kamimura, Itsuka; Watarai, Akiyuki; Takamura, Takuma; Takeo, Atsushi; Miura, Kyoko; Morita, Hidetoshi; Mogi, Kazutaka; Kikusui, Takefumi; Gonadal

steroid hormone secretion during the juvenile period depends on host specific microbiota and contributes to the development of odor preference
Developmental psychobiology 2019

12. Kikusui, Takefumi; Kanbara, Natsumi; Ozaki, Mariya; Hirayama, Nozomi; Ida, Kumiko; Tokita, Mika; Tanabe, Naho; Mitsuyama, Kuriko; Abe, Hatsuki; Yoshida, Miki; Early weaning increases anxiety via brain-derived neurotrophic factor signaling in the mouse prefrontal cortex Scientific reports 9 1 3991 2019
(他 19 報)

〔学会発表〕(計 40 件)

1. 動物行動の多様性 菊水健史 第 65 回日本実験動物学会総会 20180516 富山県民会館(富山県)
(他 39 報)

〔図書〕(計 4 件)

1. 愛と分子 惹かれあう二人のケミストリー 菊水 健史 東京化学同人 20180331
128 他

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <https://sites.google.com/carazabu.com/lab-kaizai/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 茂木一孝

ローマ字氏名: Mogi, Kazutaka

所属研究機関名: 麻布大学

部局名: 獣医学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 50347308

(2) 研究分担者

研究分担者氏名: 大野 博司

ローマ字氏名: Ohno, Hiroshi

所属研究機関名: 理化学研究所

部局名: 生命医科学研究センター

職名: チームリーダー

研究者番号(8桁): 50233226

(3) 研究分担者

研究分担者氏名: 宮内栄治

ローマ字氏名: Miyauchi, Eiji

所属研究機関名: 理化学研究所

部局名: 生命医科学研究センター

職名: 基礎科学特別研究員

研究者番号(8桁): 60634706