

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08531

研究課題名(和文) 妊娠、出産、子育て経験による海馬可塑性の分子基盤の解明

研究課題名(英文) The effect of maternal experiences on spatial learning and hippocampal neural plasticity

研究代表者

長谷 都 (Nagatani, Miyako)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20450611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：行動解析の結果、妊娠、出産、子育て後の経産ラットと出産のみ経験したラットは、未経産ラットと比較し空間学習にて良好な成績であった。電気生理学的解析では、経産ラットでのみ、LTPが誘発され、AMPA/NMDA ratio およびRI値ともに未経産ラットと比較し高値であった。詳細なメカニズムを明らかにするために、iTRAQ法にて海馬内で増加していた14-3-3proteinの発現を、ウェスタンブロット法で確認したが変化はなかった。これらより、生殖経験後の空間学習の成績向上は、全ての生殖経験により海馬AMPA受容体サブユニットの構成変化が起こり、シナプス伝達効率の上昇が関与している可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

授乳期以降のラットを用いた研究は、報告が少なく、エストロゲン濃度変動に依存しAMPA受容体の構成に変化がみられることから、性周期を明確にした研究を行っている点、AMPA受容体に関する研究は、雄性ラットの研究が主で、経産ラットを用いた研究はないという点から学術的意義がある。生殖イベント全ての経験が顕著に可塑的变化をもたらす、経産ラットの空間学習の成績と海馬内のAMPA受容体のサブユニット構成の変化に14-3-3proteinは関与が低いことを示唆する結果となった。これらの結果は、少子化、子供への虐待問題を抱えている日本では、科学以外の場で注目されることも予想され、社会的にも意義ある研究である。

研究成果の概要(英文)：To distinguish the role of each maternal event in the development of working memory, we established four experimental groups of nulliparity control, nulliparity with experience of rearing foster pups, primiparity without the rearing experience, and primiparity with all maternal events of pregnancy, delivery, lactation and rearing. Those rats were subjected to the Y-maze test for spatial learning assessments. We then used a protocol to induce LTP by using a whole-cell recording to pair low-frequency synaptic stimulation with a depolarizing voltage-clamp pulse. The present study revealed that primiparity showed a higher % induction of LTP level, RI, AMPA/NMDA ratio and the score of spatial learning than the nulliparity control. However, there was no significant difference in the expression of 14-3-3 protein between the four groups. Taken together, reproductive experience could change the subunit composition of synaptic AMPA receptors leading to improved spatial learning.

研究分野：行動神経内分泌

キーワード：妊娠 出産 子育て 海馬 AMPA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

『妊娠、出産、子育て経験後の学習記憶に関する行動の変化』

ヒトをはじめとする哺乳類では、出産と同時に乳児の世話および授乳が開始され、子育て行動が始まる。この子育て行動は、哺乳類を通じて共通点が多く、その行動を制御している神経基盤においても共通点が多いと考えられる。妊娠期および産後の女性は、未経産かつ同年齢の女性と比較して学習、記憶力が低下するという報告がある (Janes et al., 1999)。一方、妊娠期の女性では記憶力の低下がみられるが、産後速やかに回復するという報告もある (Buckwalter et al., 1999)。これらヒトの研究は、被験者数が少ない上、妊娠、出産、子育て後の行動変化を長期間観察した研究ではなく、メカニズムの詳細についても明らかでない。ラットを用いた研究では、経産ラットは、未経産ラットと比較して有意に空間学習の成績が良好であり、その変化は、長期間観察されることが報告されている (Lemaire et al., 2006)。また、経産マウスでは空間学習の成績向上に伴って、海馬内のシナプス長期増強 (Long-term potentiation: LTP) が確認されたという報告もある (Tomizawa et al., 2003)。申請者の先行研究においても、経産ラットは、同週齢の未経産ラットと比較して Y 迷路テストにおける空間学習の成績が有意に良好であった。空間学習の成績の変化は、子育て行動を効率よく遂行するための妊娠、出産の経験によって起こる変化であり、子育て行動の経験によって強化される神経系の可塑的变化によるものであると考えている。

『AMPA 受容体のシナプスへの移行が神経の可塑的变化に関与』

新しい経験によって、神経系に起こる可塑的な変化として LTP という現象が知られており、LTP 誘導刺激により興奮性神経伝達物質グルタミン酸受容体、AMPA 受容体がシナプスに移行し、これが長期増強のメカニズムの 1 つであることが明らかになっている (Takahashi et al., 2003)。AMPA 受容体は、GluR1~GluR4 のサブユニットから構成される 4 量体であり、通常 GluR2 を含んでいる。連携研究者の雌性ラットを用いた研究では、エストロゲンにより AMPA 受容体のサブユニット構成が変化し、性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロンのシナプス伝達効率を変化させることを発見している。海馬においても、エストロゲンにより AMPA 受容体のサブユニット構成が変化することを発見している。しかし、妊娠、出産、子育て後に、AMPA 受容体サブユニットの構成が変化することを検討した報告はない。

『14-3-3protein と海馬機能との関係』

14-3-3protein は、神経細胞に多く発現しており脳内では海馬錐体細胞に多く発現しており、ラットの発育過程では、神経系とリンパ系組織を中心に早期(E13)に発現し、成長とともに発現量が増大し、成体で減少する (Watanabe et al., 1993)。また、アポトーシス (Masters et al., 2001) や細胞応答に関与する分子 (CaMKII など) を組織化してシグナル伝達複合体を形成するコーディネーター分子として、細胞内シグナル伝達の活性、迅速化に関与している報告がある (Ichimura et al., 1988)。上述した、LTP の誘発にも 14-3-3protein の関与が報告されている (Simsek-Duran et al., 2004)。しかし、妊娠、出産、子育て後の海馬内の 14-3-3protein の変化についての検討や AMPA 受容体との関与についての報告もない。我々の先行研究にて、経産ラット海馬で 14-3-3protein の発現が未経産ラットと比較し有意に高いことを iTRAQ 法で検出した。

2. 研究の目的

研究代表者の先行研究で経産ラットは、未経産ラットと比較し空間学習の成績が良好であり、その発現機序に、AMPA 受容体のサブユニットの構成の変化によるシナプスの伝達効率の変化が関与する可能性も示唆した。本研究計画の目的は、1.どの生殖イベントが影響を及ぼし、2.何のバイオマーカー(候補バイオマーカーの 1 つが、14-3-3protein)が関与しているのかを、明らかにすることである。そこで本研究では、1.妊娠、出産および子育て経験のどの生殖イベントも AMPA 受容体のサブユニットの構成の変化によるシナプスの伝達効率の変化させることで学習機能が向上する。2.その発現機序に海馬内の 14-3-3protein の発現量の増加が関与するという研究全体の仮説をもとに、実験計画を立てた。そのために実験群には、子育て経験のある経産ラット、未経産ラットおよび子育て経験の無い経産ラット、未経産ラットを用いて、行動学的、電気生理学的、生化学的、行動薬理学的手法を用いて解析を行った。

3. 研究の方法

行動学的解析

(1) 海馬依存性空間学習

Y 迷路テスト (5 分間、Alternation rate を解析し、研究室既存小原医科産業 Time YM1) によって空間学習能を観察する。Alternation rate が高い値は、空間学習の成績が良好であることを示す。

電気生理学的解析

ラットに、イソフルランにて麻酔を施した後、脳の急性スライスを作成する。顕微鏡下（研究室既存、FN-S2N NICON）で海馬 CA1 の単 1 細胞を用いてパッチクランプ膜電位固定法を行った。

(2) AMPA/NMDA 比の解析

電気刺激により -60 mV 時の電流応答 (EPSC) と +40 mV の EPSC を記録し、NMDA 受容体の数に変化がないと仮定すると、-60 mV の EPSC (AMPA 受容体成分) を電気刺激 150 msec 後の +40 mV の EPSC (NMDA 受容体成分) で除した値が大きいと、シナプスに挿入された AMPA 受容体が多いことを示唆する。

(3) AMPA 受容体のサブユニットの構成の解析

電気刺激により -60 mV 時の EPSC と +40 mV の EPSC を記録し、前者の値を後者の値で除した Rectification Index (RI) は、AMPA 受容体では約 1.6 を示し、GluR2-lacking AMPA 受容体では、約 2.0 を示すことがわかっている。従って、RI 値によって、シナプスに挿入された AMPA 受容体のサブタイプが通常のものなのか、GluR2-lacking AMPA 受容体なのか明らかとなる。ピクロトキシン (GABA_A 受容体の阻害剤)、APV (NMDA 受容体阻害剤) 存在下で行った。

(4) 飽和試験に伴う LTP 誘発

LTP がこれ以上誘導されない状態を観察する (LTP の飽和 ; occlusion)、飽和試験を行う。海馬神経活動が飽和状態に陥ることで、学習、記憶が障害される。テタヌス刺激は、0 mV、10 Hz、90 秒間の paired 刺激で行った実験では、未経産ラットにおいて LTP が誘発できなかったが、経産ラットでは誘発できた。本研究では、生殖イベントを経験した 3 群 (未経産子育て無し群以外) で、ラット海馬の AMPA 受容体サブユニットの構成が変化してシナプス伝達効率の良い GluR2-lacking AMPA 受容体の割合が多くなった場合は、occlusion が起こりにくいと考えた。

平成 29 年 (2017) 度以降 生化学的解析

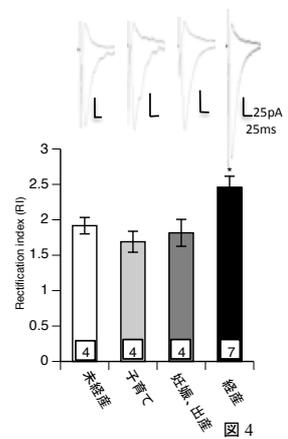
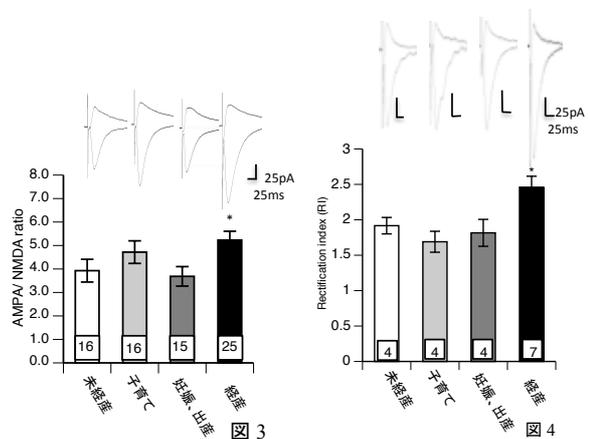
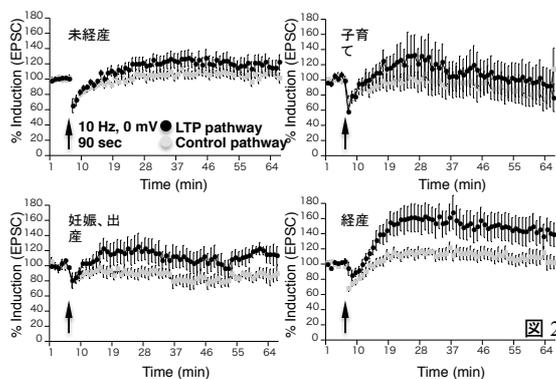
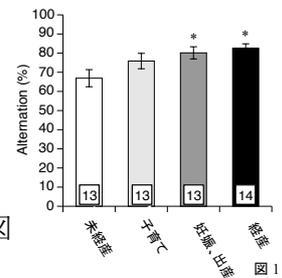
(5) GluR1-2、14-3-3protein、PSD95、及び GluR1 リン酸化 (831 および 845) のタンパク定量

電気生理学的解析の結果を確認するため、生化学的解析を行う。ラットに、イソフルランにて麻酔を施した後、両側の海馬をブレインスライサーで 2mm 切り出し、シナプトソーム分画を施した後、GluR2 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロットを行い、GluR2 と結合している GluR1 サブユニットを定量する。分画の場合、組織サンプルを、シナプトソーム分画用バッファーにてホモジナイズを行い、フィルターを通し採集後、3600x で遠心し、上清を捨て、ペレットを再度シナプトソーム分画用バッファーにて溶解する。また、14-3-3protein、後シナプスマーカー、PSD95 と GluR1 リン酸化 (831 と 845) の定量を行う。

4. 研究成果

行動解析の結果、妊娠、出産、子育て後の経産ラットと出産のみ経験したラットは、未経産ラットと比較し空間学習にて良好な成績であった (図 1)。

海馬内のシナプスの機能の変化 (シナプスの伝達効率の変化) に着目して、電気生理学的解析を行った。経産ラットでのみ、LTP が誘発され (図 2)、AMPA/NMDA ratio (図 3)、および RI 値 (図 4) とともに未経産ラットと比較し高値であった。



詳細なメカニズムを明らかにするために、先行研究で* iTRAQ 法を用いて海馬内タンパク質の存在量を網羅的に確認したところ、14-3-3protein の増加がみられた。そこで、ウェスタンブロット法で何度も確認したが、14-3-3protein の変化はみられなかった (図

5)。これら結果より、妊娠、出産、子育て後の空間学習の成績向上は、全ての生殖経験により海馬 AMPA 受容体サブユニットの構成の変化が起こり、シナプス伝達効率の上昇が関与している可能性を示唆した。しかし、このメカニズムには、14-3-3protein の関与が低いことも明らかとなった。

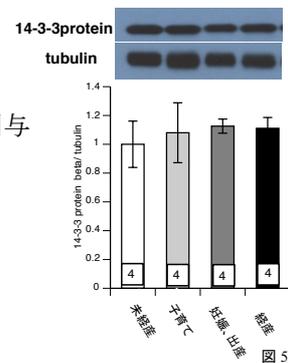


図 5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kubota T, Fukushima A, Hagiwara H, Kamiya Y, Furuta M, Miyazaki T, Fujioka H, Fujiwara SE, Funabashi T, Akema T.	4. 巻 10 (671)
2. 論文標題 Short-term fasting decreases excitatory synaptic inputs to ventromedial tuberoinfundibular dopaminergic neurons and attenuates their activity in male mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 70-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.02.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Furuta M, Fukushima A, Akema T, Funabashi T
2. 発表標題 The effect of maternal experiences on spatial learning and hippocampal neural plasticity.
3. 学会等名 The 48th Society for Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田 都、明間 立雄、船橋 利也
2. 発表標題 妊娠、出産、子育て経験後の学習機能とAMPA受容体サブユニットの構成の変化
3. 学会等名 第45回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田都、福島篤、船橋利也
2. 発表標題 妊娠・出産・子育て経験による視床下部TIDAニューロンへの興奮性シナプス入力への影響
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古田都
2. 発表標題 幼弱期雌性ラットにおけるニコチン投与および母性様行動の成体期における母性行動と空間学習に及ぼす影響
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 福島篤
2. 発表標題 視床下部PDGF受容体 を介した摂食調節作用に関する研究
3. 学会等名 第43回日本神経内分泌学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 古田都
2. 発表標題 妊娠 - 出産 - 子育ての経験が視床下部TIDAニューロンへの興奮性シナプス入力へ及ぼす影響
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会（
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福島篤
2. 発表標題 マウス中枢神経系のPDGFR 系を介する摂食調節作用は、末梢とは異なる
3. 学会等名 第12回環境生理学プレコングレス
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	福島 篤 (Fukushima Atsushi) (10442716)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師 (32713)	生化学的解析。