

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08575

研究課題名(和文)次世代の育児行動に及ぼす胎児期/子宮内環境の解析：育児放棄の原因の解明とその回復

研究課題名(英文)Analysis of the fetal/uterine environment on nurturing behavior in the next generation: understanding the causes of neglect and its recovery

研究代表者

下川 哲昭 (Shimokawa, Noriaki)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：90235680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Cin85欠損(KO)母マウスから誕生した仔達は正常に成熟して子を産むが育児行動が強く阻害されていた。Cin85-KOマウスでは脳内のドーパミンシグナルが過剰になり下垂体ホルモンであるプロラクチン(PRL)の分泌が低下していた。KOマウスの卵管に野生型胚を移植すると、成体になってからの養育行動も抑制された。一方、野生型の卵管にCin85-KO胚を移植すると、正常な育児行動を示した。妊娠後期にKO母マウスにPRLを投与したところ、誕生した雌は成体になってから育児行動の割合が高くなった。これらの結果は、胎児期/子宮内環境が次の世代における育児行動の発現を決定する上で重要であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は将来(次世代)の育児行動の発現には胎児期の神経内分泌環境、特に母体からのprolactin受容が不可欠であり、ネグレクトはその機構の破綻によって起こることを示している。これまで育児行動は、妊娠中の母体の変化や出産後の親子関係によつての発現するとされてきた。これに対して我々の研究結果は、将来、子育てするか?しないか?は従来から考えられてきた母親の妊娠や出生後ではなく、母親自身がその母親の子宮内にいた胎児期の内分泌環境によつてその方向性が決定することを実験的に明らかにした。この成果は年々増加するネグレクトに対する科学的理解とその対処において意義のある成果と考える。

研究成果の概要(英文)：We found that a mother's nurturing behavior is regulated by factors present during her own fetal development. The offspring of Cin85-deficient (KO) mice matured normally and produced their own pups; however, nurturing behaviors such as nursing were inhibited. Cin85-KO mice had reduced pituitary hormone prolactin (PRL) secretion. When wild-type embryos were transplanted into the fallopian tubes of Cin85-KO, they also demonstrated inhibited nurturing behavior as adults. Conversely, when Cin85-KO embryos were transplanted into the fallopian tubes of wild-type mice, the resultant pups exhibited normal nurturing behaviors as adults. When PRL was administered to Cin85-KO mice during late pregnancy, a higher proportion of the resultant pups exhibited nurturing behaviors as adults. These results suggest that the prenatal period is important in nurturing behaviors in the subsequent generation, and that maternal PRL is one of the critical factors.

研究分野：環境生理学、神経内分泌学

キーワード：CIN85 ネグレクト prolactin 育児行動

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kD)は膜受容体の内在化 (Internalization)を介して Downregulation を促進する分子である。この分子の個体での意義を明らかにする目的で、CIN85 ノックアウト(KO)マウスを作製した。この CIN85 KO マウスは「多動性」と「育仔放棄 (ネグレクト)」の表現型を示した。多動性の原因は CIN85 欠損による脳線条体ドパミン受容体のエンドサイトーシスの破綻がドパミン刺激の過剰を招き多動を誘発していることを明らかにした (Shimokawa, Haglund *et al.*, *EMBO J.*, 2010)。しかしながら、育仔放棄に関しては未だその原因が同定されていなかった。研究開始当初、新生仔の胃内に乳汁が確認されなかったため、CIN85 の欠損により母親が乳汁を産生できないためにネグレクトを起こしていると想定した。しかし、CIN85 KO 母親における乳腺の構造とミルクの産生能は野生型と比べて正常であった。我々は CIN85 欠損による脳機能を介した育児行動の発現機構の研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は「ネグレクト」の原因を同定し育児行動の発現メカニズムを解析することにある。

3. 研究の方法

1. 胎仔期 (子宮) 環境の違いによる育仔行動の獲得を解析するために 2 細胞期の胚を使って交換移植を行った。CIN85 KO の卵管に野生型 (WT)の胚を移植、反対に WT の卵管に CIN85 KO の胚を移植し、誕生した仔は成熟後、交配・分娩させ育仔行動を観察した。
2. 胎仔期における母体からの脳下垂体ホルモンの1つであるプロラクチン (prolactin, PRL) の影響を検討するために、妊娠後期から出産まで毎日 1 日 2 回 PRL 70 ng/g・マウス体重を投与した。出生後 10 週で雌の産仔を交配し、出産後の育仔行動を観察した。
3. 育仔行動の神経回路である視床下部内側視索前野 (MOPA)から側坐核(NA)を介して後腹側核 (VP)の神経活動を c-Fos 発現を指標として評価した。
4. ネグレクトとそのレスキューが遺伝子変異のない正常なマウスでも起こりうることを示すために、マウス妊娠後期に PRL 分泌を低下させる薬物である bromocriptine(ドーパミンアゴニスト)を投与して誕生した仔らの将来の育児行動への影響を解析した。

4. 研究成果

1. 膜受容体のエンドサイトーシスをコントロールする CIN85 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作成した。このマウスは、正常なマウスと同様に妊娠し同程度の数の仔を産むが、生まれた子供達はミルクも与えられず 2~3 日後に死んでしまう。当初、母親がミルクを産生できないことを想定して乳腺の構造と機能を調べたが、出産したネグレクトマウスは十分なミルクを産生していた。次に胎子期環境の違いを解析するため胚の交換移植を行った。ネグレクトマウスの卵管に正常マウスの二細胞期胚を移植し、反対に正常マウスの卵管にネグレクトマウスの胚を移植した。それぞれ誕生した仔を成熟後、妊娠・分娩させ育児行動を観察した。ネグレクトマウス代理母より生まれた正常マウス胚由来の仔は成熟後、正常マウスにもかかわらず強いネグレクトを示した。一方、

正常マウス代理母より生まれたネグレクトマウスの胚由来の仔は成熟後、正常な育児行動を示した。次に胎児期のどの因子が将来の育児行動に関わっているかを特定するために、脳下垂体ホルモンの一つであるプロラクチン (prolactin, PRL) の動態を調べた。PRL は授乳や保温など育児行動の発現に必要なホルモンであると考えられている。妊娠後期におけるネグレクトマウスの血中 PRL 濃度を測定すると、正常マウスに比べ著しく低いことが分かった。また、胎子期における母体からの PRL の影響を検討するために、妊娠後期に PRL 分泌が低下しているネグレクトマウスに出産まで PRL を投与した。その結果、PRL を投与したネグレクトマウスから生まれた子供達はネグレクトせず正常マウスと同程度に育児行動を示した。以上の結果は、将来 (次世代) の育児行動の発現には胎児期の神経内分泌環境、特に母体からの PRL 受容が不可欠であり、ネグレクトはその機構の破綻によって起こることを示している。本研究成果は Maternal prolactin during late pregnancy is important in generating nurturing behavior in the offspring として *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* に掲載された。

2. このネグレクトとそのレスキューが遺伝子変異のない正常なマウスでも起こりうることを示すために、マウス妊娠後期における母体 PRL の動態と薬物による PRL 分泌低下に対する将来の育児行動への影響を解析した。高プロラクチン血症の治療薬でドパミンのアゴニストであるブロモクリプチン (Bromocriptine) を投与 (200 μ g/マウス \times 2回/日) すると母体血中のプロラクチン濃度は顕著に減少した。その母親から生まれた子供達は分娩後、予想に反してネグレクトにならずほぼ正常に仔育てを行った。この結果は、育児行動とネグレクトの差を胎児期における PRL シグナルの受容だけで説明できないことを示している。CIN85 KO は血中炎症性サイトカインの濃度が高く免疫系が賦活されている。プロラクチンは体内炎症を抑制するので、プロラクチンの減少は炎症を惹起させ、それが育児行動の障害 (ネグレクト) に関連していると思われる。

3. 胎児期の内分泌や免疫環境だけでなく、分娩後の乳汁成分の育児行動発現機能を解析するために、マウス乳汁中の胎盤性ラクトゲン (Placental lactogen, PL) の同定を試みた。マウス乳汁中の PL はごく微量で、市販されている測定キットの検出限界に達していない。そこで液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS/MS) で測定するための条件検討を行った。PL は妊娠マウスにのみ発現するので、その血清と成熟オスの血清 (コントロール) を比較し、いくつかのピークから Sylene ソフトウェアで候補ペプチドを探索し Blast P で特異性を確認した。その結果、マウス胎盤性ラクトゲンのペプチド配列の一部 (EKVTSLPNYRLP) を標準物質としてマウス血清・乳汁からの測定法を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yajima H, Haijima A, Khairinisa MA, Shimokawa N, Amano I, Takatsuru Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Early-life stress induces cognitive disorder in middle-aged mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neurobiolaging.2017.12.021.	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 該当する

1. 著者名 Farenia R, Lesmana R, Uchida K, Iwasaki T, Koibuchi N, Shimokawa N.	4. 巻 458
2. 論文標題 Changes in biomarker levels and myofiber constitution in rat soleus muscle at different exercise intensities.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 79-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-019-03532-9.	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 該当する

1. 著者名 Sonoda H, Iizuka H, Ishiwata S, Tsunoda D, Abe M, Takagishi K, Chikuda H, Koibuchi N, Shimokawa N.	4. 巻 120
2. 論文標題 The retinol-retinoic acid metabolic pathway is impaired in the lumbar spine of a rat model of congenital kyphoscoliosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 15007-15017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.28762.	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 -

1. 著者名 Sairenji TJ, Ikezawa J, Kaneko R, Masuda S, Uchida K, Takanashi Y, Masuda H, Sairenji T, Amano I, Takatsuru Y, Sayama K, Haglund K, Dikic I, Koibuchi N, Shimokawa N.	4. 巻 114
2. 論文標題 Maternal prolactin during late pregnancy is important in generating nurturing behavior in the offspring.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 13042-13047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1621196114.	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 該当する

1. 著者名 Srouf M, Shimokawa N, Hamdan FF, Nassif C, Poulin C, Al Gazali L, Rosenfeld JA, Koibuchi N, Rouleau GA, Al Shamsi A, Michaud JL.	4. 巻 100
2. 論文標題 Dysfunction of the Cerebral Glucose Transporter SLC45A1 in Individuals with Intellectual Disability and Epilepsy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 824-830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2017.03.009.	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 該当する

1. 著者名 Haijima A, Lesmana R, Shimokawa N, Amano I, Takatsuru Y, Koibuchi N.	4. 巻 42
2. 論文標題 Differential neurotoxic effects of in utero and lactational exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB 106) on spontaneous locomotor activity and motor coordination in young adult male mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Toxicol Sci.	6. 最初と最後の頁 407-416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.42.407.	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 該当する

1. 著者名 Sato T, Vargas D, Miyazaki K, Uchida K, Ariyani W, Miyazaki M, Okada J, Lizcano F, Koibuchi N, Shimokawa N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 EID1 suppresses lipid accumulation by inhibiting the expression of GPDH in 3T3-L1 preadipocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Cell. Physiol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29567.	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Oh KE, Masuda S, Sairenji T, Shimokawa N, Koibuchi N.
2. 発表標題 Insufficient in utero prolactin exposure causes impaired expression of maternal behavior in the offspring.
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Sairenji T, Masuda S, Kadohira S, Shirakawa Y, Yamasaki C, Shimokawa N, Koibuchi N.
2. 発表標題 Uterine environment regulates nurturing behavior in the offspring with prolactin as a key factor.
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Sato t, Valgus D, Kawano S, Maeyama T, Maruyama A, Uchida K, Koibuchi N, Shimokawa N,
2. 発表標題 EID1 inhibits adipogenesis through reduction of GPDH expression
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Shimokawa N, Sairenji TJ, Masuda S, Uchida K, Koibuchi N,
2. 発表標題 Impaired dopamine-prolactin signaling in pregnant mothers causes neglect-like behavior in the offspring.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下川哲昭, 西連寺拓
2. 発表標題 プロラクチンは育児行動の発現における母子間のコミュニケーション分子として次世代のネグレクトを抑制する.
3. 学会等名 化学コミュニケーションのフロンティア 第6回公開シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西連寺拓, 増田真之佑, Oh Kwan Ee, 金子涼輔, 池澤淳, 大津義晃, 荒川浩一, 下川哲昭, 鯉淵典之
2. 発表標題 妊娠後期のプロラクチンが胎仔の将来の養育行動発現を制御する.
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sairenji JT, Masuda S, Oh KE, Ohtsu Y, Arakawa H, Shimokawa N, Koibuchi N.
2. 発表標題 Uterine environment regulates nurturing behavior in the offspring with maternal prolactin during late pregnancy as a key factor.
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 鯉淵典之、荻野祐一、門井雄司、下川哲昭、堀雄一、丸山芳夫、南沢亨	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 388
3. 書名 症例問題から学ぶ生理学	

1. 著者名 Shimokawa N.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 157
3. 書名 Regucalcin: Metabolic Regulation and Disease (Ed.: M. Yamaguchi)	

〔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	鯉淵 典之 (Koibuchi Noriyuki) (80234681)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	