

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2009

課題番号：18591220

研究課題名（和文）

養育環境が脳発達に及ぼす影響－母子間相互作用の発達神経科学的解明

研究課題名（英文）

Effects of maternal care on brain development: molecular mechanism of mother-infant interactions

研究代表者

三木 崇範 (MIKI TAKANORI)

香川大学・医学部・准教授・

研究者番号：30274294

研究成果の概要（和文）：

Wistar 系雄新生仔ラットを、10–15 日齢、3 時間/日、母獣から分離した。母仔分離動物では、BDNF/TrkB の発現量が mRNA と蛋白質の両方のレベルで増加していたが、NGF/TrkA 系には変化がなかった。一方、ミエリン構成蛋白質は増加していた。神経栄養因子は、母仔分離に対して特異的応答を呈し、髄鞘形成にも影響を及ぼすことを示唆する。栄養因子発現量の正常から逸脱した変動は、神経回路網形成に至るものを惹起し、最終的に機能的な異常に至るものと推測できる。

研究成果の概要（英文）：

Wistar male rats were separated from their mothers for 3 hours each day between PND10 and 15 (MD group). Nurotrophin ligand and receptor expressions were analyzed. The expression of BDNF/TrkB in MD rats was enhanced in both mRNA and protein levels. In contrast, no significant difference in NGF/TrkA expression level was observed between these groups. On the other hand, OMgp expression was elevated in MD animals. Abnormal fluctuations in those trophic factors cause organic changes, and ultimately lead to functional disturbance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,600,000	480,000	4,080,000

研究分野：発達神経科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：母仔分離、ストレス、養育環境、母子間相互作用、脆弱性分子基盤、神経栄養因子、脳・神経発達、精神神経機能

1. 研究開始当初の背景

| 近年、子供の問題行動（きれる、いじめ、

引きこもり、暴力行為、殺人、自殺等)に起因する事件や犯罪が後を絶たず、深刻な社会問題になっている。この問題の原因は、予想をはるかに超えた複雑な要因が絡み合って発生しているものと推測されるが、申請者はその一原因として、生後早期(=脳発達時期)における良くない養育環境(ストレス曝露)が、正常な脳神経回路網形成障害を惹起したことによると推測した。

つまり、母親による「愛情のこもった働きかけ」に、その子の成長とその後の母性確立・維持に、想像を超えた影響力(母子間相互作用)が秘められていると推測した。本研究では、成育早期の虐待やネグレクト、母性剥奪といった「不遇な養育環境」=「ストレス環境」を正常な脳発達を妨げる因子と捉え、出生後に「母仔分離」された実験動物モデルを用いて、脳の発達障害に起因する行動異常・養育行動の発現機序を解明し、母子にとって必要な母子間相互作用を神経科学的に解明し、よりよい母子関係の構築・養育形態を探りたい。そして精神的・身体的に健やかな子供の成長に寄与する目的で研究を推し進めた。

## 2. 研究の目的

近年、豊かな環境下で飼育された実験動物の海馬神経細胞の新生数が増加することが報告された。この事実は、養育環境が脳発達に重要な意義を有することを示唆する。また、出生早期に母親から引き離された(=悪い養育環境)サルやラットにおいては、成熟後に攻撃的な性格を呈したり、不安行動が出現し易いとされる。これは、内分泌環境、特に視床下部-下垂体-副腎系のストレス応答機構が活性化され、腎皮質刺激ホルモンやグルココルチコイド(コルチコステロン)が上昇し、海馬・扁桃体などの大脳辺縁系の神経細胞の傷害を惹起するためとされている。この系以外にも、神経栄養因子、神経ステロイド、生理活性アミン(セロトニン・ノルアドレナリン)等も重要な役割を果たしていると推測される。

一方、「母親からよく養育された子は、また子をよく養育する」と言われる。これは、現在「養育の非遺伝的伝達」と解釈されている。この事実は、子供の頃に受けた、養育が何らかの形で生涯に亘って脳に継続的に記憶されていることを示している。この機序として、養育に関与する非遺伝的記憶にDNAのメチル化などの関与が提唱されてはいるが、その詳細はほとんど解明されていない。

そこで、申請者らは生後早期の母仔分離を、幼若期のストレスと捉え、母仔分離ストレスによる脳発達異常を、神経回路網の形成障害と仮定した。脳発達の脆弱基盤の発達精神神経病理学的解析を分子生物学的手法で、母仔

分離された仔の脳を経時的に解析することで、発達時期脳のストレス脆弱性の分子基盤を探り、養育環境が脳の発達に与える影響についての知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 母仔分離実験動物モデル作製

申請者らが先に確立した、母仔分離モデル動物の作製法に準じてモデル動物を作製する(Kuma et al., 2004)。分離期間は、3h/day、10-15日齢とする。16日齢と30日齢で動物の脳を採取する。

### 2. 神経栄養因子とその受容体の解析- RNA、タンパク質レベルでの検討

母仔分離による、神経栄養因子(NGF、BDNF、GDNF等)とその受容体(Trk-A、Trk-B、GDNF-R等)mRNAとたんぱく質の発現レベルを解析する。解析部位として、記憶や学習機能と深く関与する海馬を中心に、小脳、中隔核、扁桃体、大脳皮質、視床下部なども解析対象とする。

#### 《 RNAレベルでの解析 》

1) 脳メタカーン固定→パラフィン包埋後一切片作製。

2) Laser Capture Microdissection (LCM)を用いて、解析部位を正確に採取する。

3) RNA単離法により、total RNAを抽出する。

4) cDNAを合成して、上記神経栄養因子・受容体のプライマーを用いてreal-time RT-PCR解析する。

#### 《 たんぱく質レベルでの解析 》

上記の栄養因子のリガンド/レセプターの発現量をたんぱく質レベルで解析するために、Western blot解析を行う。

### 3. ストレス応答性の評価- 視床下部-下垂体-副腎系評価

母仔分離されて養育された動物の、ストレス応答性を評価することを目的として、上で実施した行動実験の後、以下のホルモン・サイトカインを測定(定量)する。

・ストレスホルモン(ラットの場合コルチコステロン)

・サイトカイン(IL-1, 2, 4, 6, 10, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ,  $\alpha$ など)

以上を通して、養育環境が脳の発達に与える影響をストレス脆弱性の観点から解明する。

## 4. 研究成果

母仔分離動物では、白色脂肪組織中のprohibitin (PHB)の発現レベルが増加し、しょうらいの脂肪細胞の増殖を惹起したものと推測できる。これが母仔分離後、成長後の肥満の原因の1つと推測した。また、正常から逸脱した神経栄養因子リガンド/レセプターの発現変化が海馬領域で見られることが明らかになった。

母仔分離動物の、神経栄養因子リガンドとレセプターの mRNA 並びに蛋白質の発現動態の変化を real-time RT-PCR と Western Blotting 解析を行った。神経栄養因子のうち、NGF nerve growth factor, BDNF brain-derived neurotrophic factor とこれらリガンドに対するレセプター TrkA, TrkB の発現レベルを解析した。母仔分離動物では、BDNF/TrkB の発現量が mRNA と蛋白質の両方のレベルで増加していたが、NGF/TrkA 系に有意な変化は見られなかった。一方、ミエリン構成蛋白質 Oligodendrocyte myelin glycoprotein OMgp が有意に増加していた。この結果は、神経防御因子としての神経栄養因子は、有害刺激（母仔分離ストレス）に対して特異的応答を呈することを示している。さらに、OMgp のデータは、母仔分離ストレスは、神経線維の髄鞘形成に影響を及ぼしていることを示唆している。現在、神経突起、棘にいかなる変化を惹起しているのか形態学的に解析が今後の課題である。

発達途上にある脳は、母仔分離ストレスにより神経栄養因子とその受容体に経時的変動を惹起することが示された。脳では、厳密なタイムテーブルに沿って、神経回路網が複数部位で、同時進行起こっていることを鑑みると、一過性であろうと正常から逸脱した神経栄養因子/受容体発現レベルの変動は、神経回路網形成に影響を及ぼすものと推測できる。このような、構造的ひずみが機能的ひずみを生み最終的に精神神経機能の異常にいたることが推測できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 27 件）

①Jamal M, Ameno K, Miki T, Tanaka N, Ohkubo E, Kinoshita H. Effects of Systemic Nicotine, Alcohol or Their Combination on Cholinergic Markers in the Frontal Cortex and Hippocampus of Rat. *Neurochem Res.*, in press, 2010. 査読有

②Ueno T, Miki T, Wang ZY, Yokoyama T, Lee KY, Kusaka T, Warita K, Sumitani K, Matsumoto Y, Yakura T, Liu JQ, Bedi KS, Takeuchi Y. Effects of short-term ethanol ingestion on the expression of neurotrophins and their receptors: No changes in the expression of the glial-derived neurotrophic factor in the mouse hippocampus. *Current Neurobiol.*, 1, 40-45, 2010. 査読有

③Fusumada K, Yokoyama T, Miki T, Matsumoto Y, Warita K, Wang ZY, Yakura T,

Liu JQ, Takeuchi Y. GABA expression in c-Fos immunoreactive neurons of the rat periaqueductal gray induced by electroacupuncture at the point of Zusanli. *Current Neurobiol.*, 1, 10-13, 2010. 査読有

④Wang ZY, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Kusaka T, Sumitani K, Warita K, Matsumoto Y, Yakura T, Hosomi N, Ameno K, Bedi KS, Takeuchi Y. Short-term exposure to ethanol causes a differential response between nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor ligand/receptor systems in the mouse cerebellum. *Neuroscience*, 165, 485-491, 2010. 査読有

⑤Jamal M, Ameno K, Miki T, Wang W, Kumihashi M, Isse T, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama K, Ijiri I, Kinoshita H. Cholinergic alterations following alcohol exposure in the frontal cortex of Aldh2-deficient mice models. *Brain Res.*, 27, 37-43. 2009. 査読有

⑥Kusaka T, Ueno M, Miki T, Kuboi T, Nakamura S, Koyano K, Ijichi S, Yasuda S, Okubo K, Kawada K, Namba M, Nishida T, Imai T, Isobe K, Itoh S. Relationship between cerebral oxygenation and phosphorylation potential during secondary energy failure in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res.*, 65, 317-22, 2009. 査読有

⑦Miki T, Kuma H, Yokoyama T, Sumitani K, Matsumoto Y, Kusaka T, Warita K, Wang ZY, Hosomi N, Imagawa T, Bedi KS, Itoh S, Nakamura Y, Takeuchi Y. Early postnatal ethanol exposure induces fluctuation in the expression of BDNF mRNA in the developing rat hippocampus. *Acta Neurobiol Exp.*, 68, 484-493, 2008. 査読有

⑧Miki T, Yokoyama T, Sumitani K, Kusaka T, Warita Y, Matsumoto Y, Wang ZY, Wilce PA, Bedi KS, Itoh, S, Takeuchi Y. Ethanol neurotoxicity and dentate gyrus development. *Congenital Anomalies*, 48, 110-117, 2008. 査読有

⑨Ishii Y, Matsumoto Y, Watanabe R, Elmi M, Fujimori T, Nissen J, Cao Y, Nabeshima YI, Sasahara M, Funa K, Characterization of neuroprogenitor cells expressing the

PDGF beta-receptor within the subventricular zone of postnatal mice. *Mol Cell Neurosci.*, 37, 507-518, 2008. 査読有

⑩三木崇範 母性剥奪症候群 (Maternal Deprivation Syndrome) の発達神経科学的アプローチ 日本未熟児新生児学会雑誌 第20巻 第1号 35-40頁 2008年 査読有

⑪Warita K, Okamoto K, Mutoh KI, Hasegawa Y, Yue ZP, Yokoyama T, Matsumoto Y, Miki T, Takeuchi Y, Kitagawa H, Sugawara T, Hoshi N. Activin A and equine chorionic gonadotropin recover reproductive dysfunction induced by neonatal exposure to an estrogenic endocrine disruptor in adult male mice. *Biol Reprod.*, 78, 59-67, 2008. 査読有

⑫三木崇範 子供の脳発達と養育環境—母性剥奪症候群のエピジェネティック解析 財団法人成長科学協会研究年報 第31巻 189-190頁 2007年 査読なし

⑬Jamal M, Ameno K, Ameno S, Morishita J, Wang W, Kumihashi M, Ikuo U, Miki T, Ijiri I, Changes in cholinergic function in the frontal cortex and hippocampus of rat exposed to ethanol and acetaldehyde. *Neuroscience*, 144, 232-238, 2007. 査読有

⑭Miki T, Yokoyama T, Sumitani K, Wang ZY, Yang W, Kusaka T, Matsumoto Y, Warita K, Lee NS, Fukui Y, Takeuchi Y, The effect of prenatal X-irradiation on the developing cerebral cortex of rats. A quantitative assessment of glial cells in the somatosensory cortex. *Int J Dev Neurosci.*, 25, 293-297, 2007. 査読有

⑮Okamoto H, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Kuma H, Wang ZY, Gu H, Li HP, Matsumoto Y, Irawan S, Bedi KS, Nakamura Y, Takeuchi Y, Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) in rat hippocampus is depleted by chronic ethanol consumption. *Neurosci Lett.*, 406, 76-80, 2006. 査読有

⑯Matsumoto Y, Tsukamoto Y, Miki T, Ogawa K, Lee KY, Yokoyama T, Satriotomo I, Li HP, Gu H, Wang ZY, Karasawa S, Ueda S, Sasaki F, Takeuchi Y. Age-related changes in growth hormone-immunoreactive cells in the anterior pituitary gland of Jcl: Wistar-TgN (ARGHGEN) 1Nts rats (Mini rats). *Congenit Anom. (Kyoto)*, 46, 188-93, 2006.

査読有

[学会発表] (計19件)

①三木崇範、汪 治宇、横山俊史、日下 隆、住谷和則、割田克彦、松本由樹、矢倉富子、劉 俊騫、王 朝暉、竹内義喜 短期間アルコール摂取マウス小脳の神経栄養因子リガンド/レセプター系の特異的応答性 第115回日本解剖学会 岩手県民会館 2010年3月28日-30日

②Yakura T, Matsumoto Y, Miki T, Warita K, Wang ZY, Liu JQ, Mamoru F, Takeuchi Y. Non-vesicular synaptic transport: WGA-HRP and Rab3A-siRNA studies 第115回日本解剖学会 岩手県民会館 2010年3月28日-30日

③Takeuchi Y, Matsumoto Y, Miki T, Warita K, Wang ZY, Yakura T, Liu JQ. A protein conjugation of WGA essential for transsynaptic tracer in neuronal system: application for Amyloid- $\beta$  in vivo. International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia, 岡山大学, 2009年12月11日-12日

④松本由樹、三木崇範、割田克彦、汪治宇、矢倉富子、劉俊騫、竹内義喜 WGA結合タンパクがもたらすシナプス膜輸送機構の新展開第64回日本解剖学会地方会 高知大学 2009年10月24日-25日

⑤竹内義喜、松本由樹、三木崇範、横山俊史、割田克彦、汪治宇、矢倉富子、藤田守 WGA-HRPによる順行性シナプス輸送: ラット迷走神経へのRab3A-siRNA投与 第32回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 2009年9月16日-18日

⑥Matsumoto Y, Miki T, Tsukamoto Y, Warita K, Wang ZY, Yakura T, Karasawa S, Ueda S, Takeuchi Y. Modulation of hypothalamopituitary axis in Mini rat: further studies with hypophysiotropic somatostatin and gonadotroph. The 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones, 北九州国際会議場, 2009年9月4日-8日

⑦竹内義喜、三木崇範、横山俊史、松本由樹、割田克彦、汪治宇、上野貴士、藤田守 Reevaluation of anterograde synaptic transport of WGA-HRP in the rat. 第114回日本解剖学会 岡山理科大学 2009年3月

28日-30日

⑧松本由樹、三木崇範、谷賀、割田克彦、汪治宇、竹内義喜 Early postnatal ethanol exposure alters the BDNF and neural interactions in the olfactory bulb. 第113回日本解剖学会 大分大学 2008年3月27日-29日

⑨Wang ZY, Miki T, Yokoyama T, Matsumoto Y, Warita K, Sumitani K, Lu F, Takeuchi Y Short-term ethanol exposure caused changes in neurotrophins and its receptors expression in mice cerebellum. 第62回日本解剖学会地方会 川崎医科大学 2007年10月27日-28日

⑩Takeuchi Y, Xie Q, Matsumoto Y, Warita K, Miki T. Fos-immunoreactive neurons in the lateral central nucleus of amygdala activated by hypotension with special reference to the parabrachial nucleus in the rat. Italian Society of Neuroscience, Palazzo della Ragione e Palazzo della Gran Guardia, Verona, Italy, 27th-30th September 2007

⑪Matsumoto Y, Kaneko M, Yang W, Watt F, Warita K, Miki T, Takeuchi Y, Funa K A novel enhancer of the PDGF beta-receptor gene activated during the differentiation of neuroblastoma through GATA factor. Italian Society of Neuroscience, Palazzo della Ragione e Palazzo della Gran Guardia, Verona, Italy, 27th-30th September 2007

⑫三木崇範 母性剥奪症候群 (Maternal Deprivation Syndrome) の発達神経科学的アプローチ 第52回日本未熟児新生児学会 サンポート高松 2007年11月24日-26日

⑬三木崇範、横山俊史、植木正明、汪治宇、割田克彦、松本由樹、前川信博、竹内義喜 中枢神経発達時期におけるイソフルラン曝露の影響：嗅球における神経栄養因子の変化 第47回日本先天異常学会学術集会 名古屋国際会議場 2007年7月7日-9日

⑭Takeuchi Y, Yokoyama T, Miki T, Wang ZY, Yang W, Ueno M. Neuroprotective Effects of Rare Sugar against Ethanol Toxicity; An Electron Microscopic Study in Mice Hippocampus. Rare Sugar Congress 2006 in Kagawa, The 3rd Symposium of International Society of Rare Sugars, かがわ国際会議場,

2006年11月21日-24日

⑮Yang W, Kaneko M, Matsumoto Y, Wang ZY, Yokoyama T, Miki T, Watt F, Funa K, Takeuchi Y. Activity of a novel PDGF beta-receptor enhancer during the cell cycle and upon differentiation of neuroblastoma. 第61回日本解剖学会地方会 広島大学 2006年11月11日-12日

⑯三木崇範、横山俊史、日下隆、汪治宇、松本由樹、楊衛文、伊藤進、竹内義喜 母子間相互作用の発達神経科学解析；母性剥奪による脳発達への影響 第6回日本赤ちゃん学会 福井商工会議所 2006年11月11日-12日

⑰三木崇範 組織定量解析法 (ステレオロジ) を用いた中枢神経系の機能解析 第46回日本先天異常学会学術集会 山形テルサ 2006年6月29日-30日

⑱Kaneko M, Yang W, Matsumoto Y, Watt F, Funa K. Activity of a novel PDGF beta-receptor enhancer during the cell cycle and upon differentiation of neuroblastoma. The 2nd IFOM-IEO, IFOM-IEO Campus, Milano, Italy, 5th-8th May 2006

⑲三木崇範、横山俊史、李京烈、岡本華代、山岡一平、襖田和敏、今川智敬、竹内義喜 長期アルコール摂取によるラット海馬のミエリン構成たんぱく質mRNAの発現量変化 第111回日本解剖学会 北里大学 2006年3月29日-31日

[図書] (計1件)

Touge T, Gonzalez D, Miki T, Hiramane C, Takeuchi H. Effects of electric or magnetic brain stimulation on cortical and subcortical neuron functions in rats. In Complex Medical Engineering, Springer 2007. 515-516.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三木 崇範 (MIKI TAKANORI)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号：30274294

### (2) 研究分担者

横山 俊史 (YOKOYAMA TOSHIFUMI)  
神戸大学・農学部・助教  
研究者番号：10380156

松本 由樹 (MATSUMOTO YOSHIKI)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号：90335844

割田 克彦 (WARITA KATSUHIKO)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号：40452669

竹内 義喜 (TAKEUCHI YOSHIKI)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：20116619

日下 隆 (KUSAKA TAKASHI)  
香川大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50274288

伊藤 進 (ITOH SUSUMU)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：80145052