

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34306

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22777

研究課題名（和文）神経シナプス接着分子の異常を基盤とした育児放棄・虐待の分子機構の解明

研究課題名（英文）Establishment and analysis of a mouse model of maternal neglect based on the dysfunction of synaptic adhesion molecule

研究代表者

関根 勇一（Sekine, Yuichi）

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20396295

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：育児放棄の神経機構の解明のため、ヒトにおける育児放棄の原因を反映したモデルマウスの確立を目的として、Lrrn4遺伝子欠損雌マウスの養育行動解析を行った。その結果、仔運び行動の低下、及び新規環境における探索行動の亢進を示し、感覚機能には異常を認めなかった。これらの結果から、これまでの「仔の認識が障害された」育児放棄モデルマウスとは異なり、「仔への関心が低下した」育児放棄モデルマウスであることが示唆された。脳における組織学的解析と神経細胞におけるLrrn4結合分子の探索結果より、海馬神経回路におけるLrrn4のシグナル伝達が、正常な養育行動の維持に関連している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス接着分子であるLrrn4は海馬神経回路に高発現し、その遺伝子欠損が母マウスの仔に対する注意力を低下させ、養育行動低下を惹起している可能性が示唆された。今後、本研究をさらに発展させ、海馬神経回路におけるLrrn4のシグナル伝達異常が養育行動異常を惹き起こす分子メカニズムを解明していく。本研究により、ヒトでなぜ不適切な養育行動をするのかという親側の要因に関して最も重要と考えられる「意識を仔に向けるか否かの選択」の神経基盤に、シナプス接着分子の異常が関連していることが明らかとなり、神経基盤に基づいたヒトの育児放棄の予防や治療法の開発へつながる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the molecular mechanisms of maternal neglect, we tried to establish a mouse model of maternal neglect and analyzed the maternal behaviors in Lrrn4 knockout (KO) mice. Lrrn4 KO mice had a normal sensory function, however, showed reduction of pup retrieval behavior and enhancement of exploration behavior in a novel environment. These results indicate that Lrrn4 KO mouse is a novel mouse model of maternal neglect, which exhibits normal recognition but reduced interest in pups. Histological analyses of brain and in vitro experiments of Lrrn4-binding proteins in neurons revealed that Lrrn4 signal transduction in the hippocampus may be involved in the normal maternal behaviors.

研究分野：社会医学、神経組織学、行動生理学

キーワード：育児放棄 シナプス接着分子 養育行動

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

①研究代表者らのグループは、ロイシンリッチリピート(leucine-rich repeat: LRR)膜タンパク質ファミリーに属する細胞接着分子 Lrrn4 を同定し、Lrrn4 遺伝子が脳において海馬を含む大脳辺縁系や視床下部、小脳などに広く発現し、特に海馬依存性の記憶の保持に必須の分子であることを明らかにしてきた (文献①)。LRR 膜タンパク質ファミリーは神経系においてシナプス接着分子としてシナプスの形成や可塑性の維持に関連し、その遺伝子変異は精神疾患にも関連していることが知られている (文献②)。

②養育行動は子を認識し、親の状況から養育行動を起こすか否か (意識を子に向けるか否か) 選択し、実際の行動の遂行により実行される。ヒトもマウスも養育行動がみられることから、遺伝子改変マウスを用いて育児放棄の神経機構に関する研究が行われてきている。マウスの育児放棄の原因として (1) 知覚 (特に嗅覚) による仔の認識が障害、(2) 親の状況から仔への関心が低下、(3) 養育行動の実行が障害されることが考えられる。多くの遺伝子改変マウスは嗅覚異常 (G<sub>olf</sub> 欠損マウスや Adcy3 欠損マウス) や嗅覚による個体認識 (社会性記憶) 障害 (オキシトシン欠損マウスや CD38 欠損マウス等) を示す (文献③-⑥) ことから、(1) の仔の認識に異常をきたす育児放棄モデルである。しかし、ヒトの育児放棄の原因として中心的役割を果たすのは、(2) の親の状況から仔への関心が低下することと考えられるが、そのモデルマウスに関しては、ほとんど報告がない。

## 2. 研究の目的

児童虐待相談の件数は年々増加しており、その対策は社会的急務である。これまで虐待を受けた子供の神経発達に関しては多くの研究が行われてきたが、親側の要因に関しては報告が少なく、親側の育児放棄の神経分子機構を解明することが、その予防や治療に不可欠である。研究代表者らのグループは、シナプス接着分子 Lrrn4 の神経系における機能について Lrrn4 遺伝子欠損型マウスを用いて検討してきた。その過程で、Lrrn4 遺伝子欠損型母マウスにおいて、養育行動の低下と養育以外の探索行動等の亢進 (仔に対する注意力の低下) を認めた。

本研究は、育児放棄の親側の主要因と考えられる「仔への関心が低下した」育児放棄モデルマウスとして Lrrn4 遺伝子欠損型マウスを確立し、仔への関心低下の原因となる神経回路、及びシナプス部位を同定し、シナプス接着分子の欠損による育児放棄の神経分子機構の解明につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳における Lrrn4 発現細胞の同定

①LacZ 染色: Lrrn4 のプロモーター下に LacZ 遺伝子を組み込んだ Lrrn4 ヘテロマウスを、イソフルラン麻酔下で Zamboni 固定液 (2%パラフォルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸) により還流固定を行う。脳を採取して3分割し、3時間の浸漬固定後、20%シュクロースへ置換し、16時間浸漬する。OCT コンパウンドにより包埋し、n-ヘキサンにて凍結ブロックを作成する。凍結ブロックからクリオスタットにて 16  $\mu$ m の切片を作成する。切片に X-gal 溶液 (5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml X-gal) を添加し、37°C で 16 時間インキュベート後、Nuclear Fast Red 染色 (室温、10 分間) を行う。

②蛍光二重染色: ①と同様に脳の凍結ブロックを作成し、クリオスタットにて 6  $\mu$ m に薄切する。切片に  $\beta$ -galactosidase (LacZ) 検出蛍光試薬である SPiDER- $\beta$ Gal 溶液 (2.5  $\mu$ mol/L) を添加し、室温で 2 時間インキュベートする。次に、抗原賦活化のために、切片を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) でマイクロウェーブにて 5 分間処置した後、5%正常ロバ血清を添加し、室温で 1 時間インキュベートする。神経細胞マーカー (Neuronal nuclei; NeuN, ionotropic glutamate receptor 2/3; GluR2/3,  $\gamma$ -aminobutyric acid; GABA) やグリア細胞マーカー (glial fibrillary acidic protein; GFAP, 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; CNPase, ionized calcium binding adapter molecule-1; Iba-1) に対する抗体を添加し、4°C で 16 時間インキュベートする。各一次抗体に対するビオチン化二次抗体を添加し、室温で 1 時間インキュベートする。Alexa Fluor 647 標識ストレプトアビジンを添加し、室温で 30 分間インキュベートする。4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) にて核染色を行う。染色した組織像は、共焦点レーザー顕微鏡により観察し撮影する。

(2)Lrrn4 遺伝子欠損型未經産雌マウスにおける養育行動解析: 母性行動を検討するために、未經産雌マウスを用いて仔運びテストを行う。テストの 3 日前に巣材を与えて巣作りを行わせ、仔運びテストでは、生後 3 日齢の野生型マウスの仔をケージの角 (巣を除く) 3 箇所において (図 1A)、野生型、及び Lrrn4 遺伝子欠損型の未經産雌マウスが、仔を口にくわえて巣まで運ぶ行動

をビデオで録画し、3匹を巣に運び入れるまでに要する時間を各々計測する。

(3) *Lrrn4* 遺伝子欠損型未経産雌マウスの養育行動に関連する認知機能、活動性、及び情動（不安）行動の解析

① 認知機能：視覚は視覚性置き直しテスト、聴覚は音響驚愕反射、嗅覚は嗅覚弁別テストにより検討する。嗅覚弁別テストでは、野生型と *Lrrn4* 遺伝子欠損型雌マウスに、アーモンドフレーバーやバナナフレーバーの希釈液に浸した綿棒を各々2分間ずつ3回提示し（図1B）、綿棒についた匂いを嗅いでいる時間を計測する。

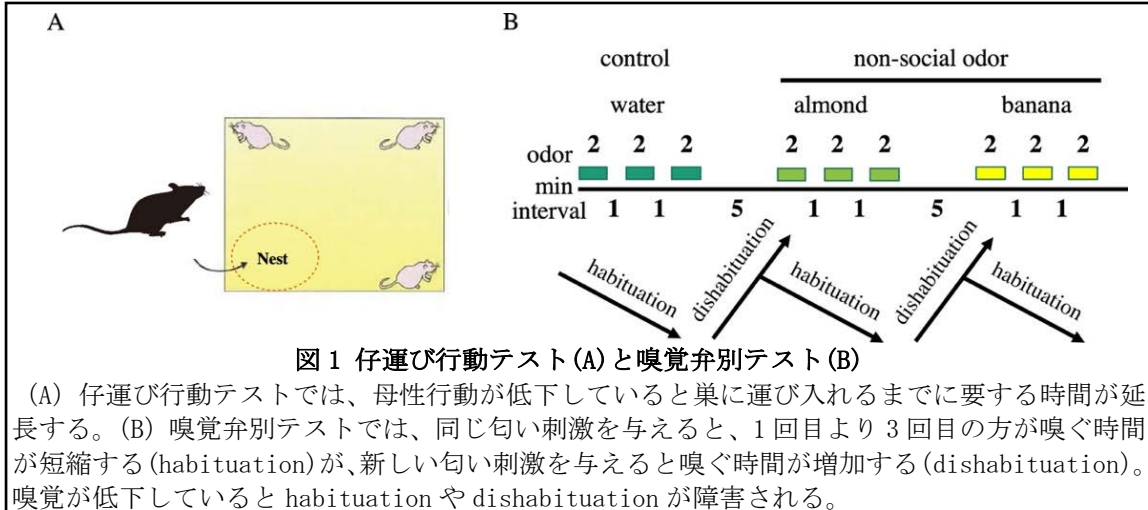


図1 仔運び行動テスト(A)と嗅覚弁別テスト(B)

(A) 仔運び行動テストでは、母性行動が低下していると巣に運び入れるまでに要する時間が延長する。(B) 嗅覚弁別テストでは、同じ匂い刺激を与えると、1回目より3回目の方が嗅ぐ時間が短縮する(habituation)が、新しい匂い刺激を与えると嗅ぐ時間が増加する(dishabituation)。嗅覚が低下していると habituation や dishabituation が障害される。

② 活動性：新規環境における活動性（移動距離、立ち上がり行動の回数）をオープンフィールドテストにより検討する。ホームケージにおける行動をビデオで録画し、立ち上がり行動の回数をカウントする。

③ 不安行動：新規環境における不安行動（中心区域滞在時間）をオープンフィールドテストにより、高所における不安行動（オープンアーム滞在時間）を高架式十字迷路テストにより検討する。

(4) *Lrrn4* のシグナル伝達機構の解明：*Lrrn4* のリガンド、レセプター、結合分子の同定を行う。*Lrrn4* 特異的抗体を用いてマウス脳サンプルから *Lrrn4* を免疫沈降し、結合してきた分子を質量分析解析により同定する。さらに神経細胞に *Lrrn4* を過剰発現させる目的で、神経特異的プロモーター-*Lrrn4* 発現コンストラクトを作成し、初代神経培養系にて発現させ、免疫沈降法等による結合タンパク質同定やウェスタンブロット法によるシグナル伝達経路の解明を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脳における *Lrrn4* 発現細胞の同定

① LacZ 染色：養育行動や探索行動との関連が報告されている内側視索前野核や大脳辺縁系における *Lrrn4* の発現を、*Lrrn4* のプロモーター下に LacZ 遺伝子を組み込んだ *Lrrn4* ヘテロマウスの LacZ 染色により検討した。その結果、大脳辺縁系の中でも特に海馬 (CA1, CA2, CA3、歯状回、脳梁灰白層；図2) と視床下部の乳頭上核に *Lrrn4* 発現細胞が多く見られた。乳頭上核から海馬への投射回路は新規性情報の伝達に関与することが報告されていることから、*Lrrn4* がそれらの神経回路に発現している可能性が示唆された。

② 蛍光二重染色：海馬の CA1、及び歯状回において、*Lrrn4* 発現細胞が神経細胞かグリア細胞かを同定するため、 $\beta$ -galactosidase (LacZ) 検出蛍光試薬である SPiDER- $\beta$  Gal と神経細胞やグリア細胞マーカーとの組織二重染色法を行った。その結果、*Lrrn4* 発現細胞は NeuN 陽性 (図 3A, 3E)、GFAP 陰性 (図 3B, 3F)、CNPase 陰性 (図 3C, 3G)、Iba-1 陰性であった (図 3D, 3H) ことから、*Lrrn4* は神経細胞に発現し、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアには発現していないことが示唆された。海馬の CA1、及び歯状回において *Lrrn4* 陽性神経細胞がグルタミン酸作動性神経細胞か GABA 作動性神経細胞かを同定するために、SPiDER- $\beta$  Gal と GluR2/3、及び GABA との組織二重染色法を行った。*Lrrn4* 発現細胞は GluR2/3 陽性 (図 4A, 4C)、GABA 陰性 (図 4B, 4D) であったことから、*Lrrn4* は興奮性神経回路 (歯状回-CA3-CA1) のグルタミン酸作動性神経細胞に発現していることが示唆された。

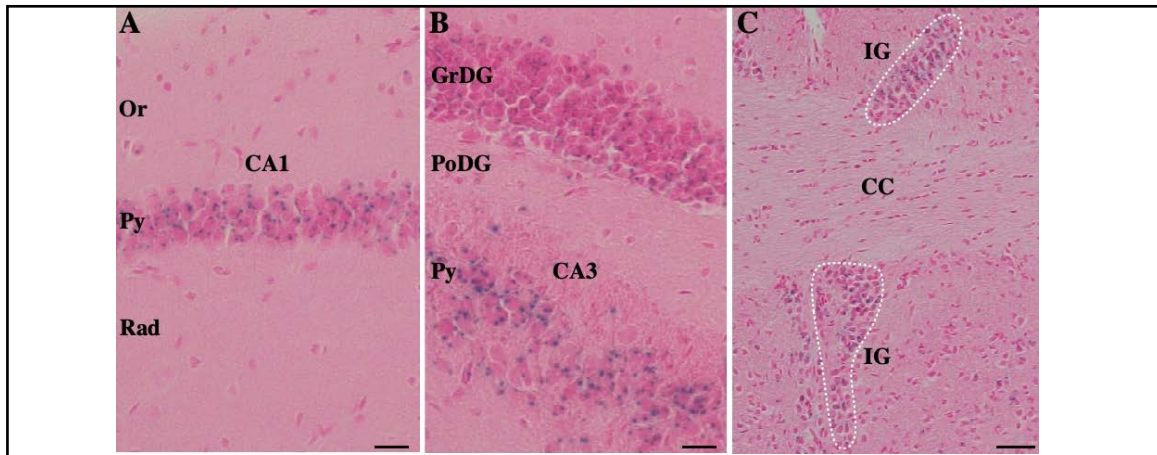


図2 海馬のCA1 (A)、CA3 (B)、歯状回 (B)、脳梁灰白層 (C)における *Lrrn4* の発現  
 LacZ 染色像 (青) が CA1・CA3 の錐体細胞層 (A)、歯状回の顆粒細胞層 (B)、脳梁灰白層 (C)に見られる。CA1, CA1 field of the hippocampus; CA3, CA3 field of the hippocampus; CC, corpus callosum; IG, indusium griseum; GrDG, granular layer of the dentate gyrus; Or, oriens layer of the hippocampus; PoDG, polymorphic layer of the dentate gyrus; Py, pyramidal cell layer of the hippocampus; Rad, radiatum layer of the hippocampus. スケールバー ; 20  $\mu$ m (A, B), 50  $\mu$ m (C)。

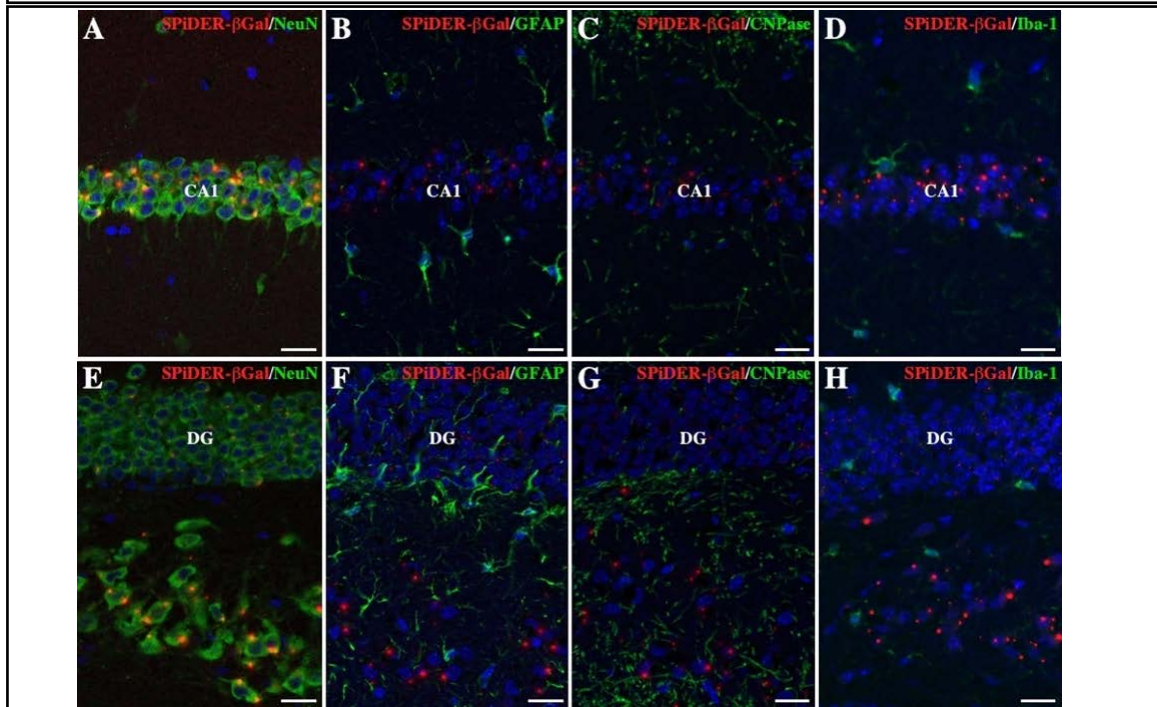


図3 海馬 CA1 (A-D)、及び歯状回 (E-H)における SPiDER- $\beta$ Gal (A-H; 赤)と NeuN (A, E; 緑)、GFAP (B, F; 緑)、CNPase (C, G; 緑)、Iba-1 (D, H; 緑)との蛍光二重染色  
 全てのパネルが DAPI (青)との重ね合わせ画像。CA1, CA1 field of the hippocampus; DG, dentate gyrus. スケールバー ; 20  $\mu$ m。

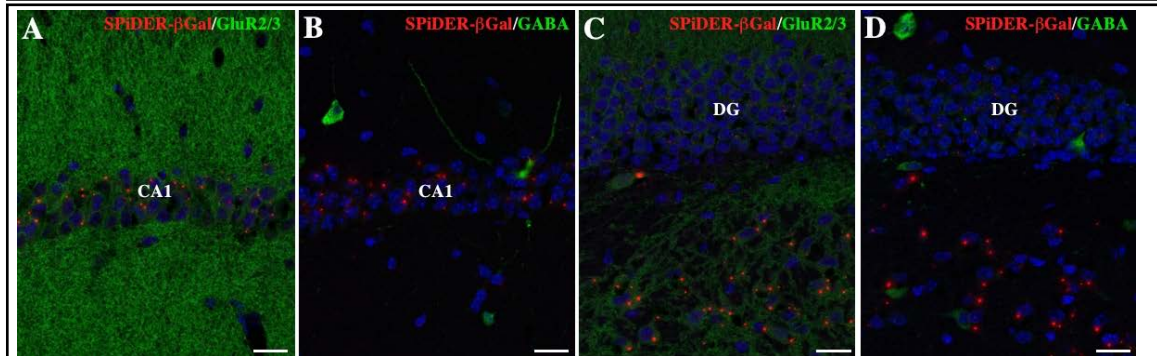


図4 海馬 CA1 (A, B)、及び歯状回 (C, D)における SPiDER- $\beta$ Gal (A-D; 赤)と GluR2/3 (A, C; 緑)、GABA (B, D; 緑)との蛍光二重染色  
 全てのパネルが DAPI (青)との重ね合わせ画像。CA1, CA1 field of the hippocampus; DG, dentate gyrus. スケールバー ; 20  $\mu$ m。

## (2)Lrrn4 遺伝子欠損型雌マウスにおける養育行動

母性行動を検討するために、未経産雌マウスを用いて仔運びテストを行った。未経産の野生型と Lrrn4 遺伝子欠損型雌マウスが、生後 3 日齢の WT の仔 3 匹を各々、巣に運び入れるまでに要する時間を計測した結果、野生型マウスと比べ、Lrrn4 遺伝子欠損型マウスにおいて仔を巣に運び入れるまでに要する時間が有意に延長していた。

## (3)Lrrn4 遺伝子欠損型未経産雌マウスにおける認知機能、活動性、及び情動（不安）行動

①認知機能：仔の認識に必要な視覚機能を視覚性置き直しテストにより検討した結果、野生型マウスとの間に有意な差は見られなかった。また、聴覚機能を音響驚愕反射により、嗅覚機能を嗅覚弁別テストにより検討した結果、野生型マウスとの間に有意な差は見られなかった。

②活動性：新規環境における活動性をオープンフィールドテストにて検討した結果、活動性の指標である移動距離に有意な差は認めなかったが、探索行動や繰り返し行動の指標である立ち上がり行動が Lrrn4 遺伝子欠損型マウスにおいて有意に増加していた。一方、ホームケージにおける立ち上がり行動に有意な差は見られなかった。したがって、Lrrn4 遺伝子欠損型マウスは新規環境での探索行動が亢進している可能性が示唆された。

③不安行動：オープンフィールドテストの中心区域滞在時間、高架式十字迷路テストのオープンアーム滞在時間を指標に検討した結果、オープンフィールドテストの中心区域滞在時間が Lrrn4 遺伝子欠損型マウスで低下傾向を示し、高架式十字迷路テストでのオープンアーム滞在時間が有意に増加していたことから、不安傾向が低い可能性が示唆された。

これらの結果より、Lrrn4 遺伝子欠損型マウスが、新規環境における不安傾向の低下と探索行動の亢進により、仔への関心や注意力が低下し、仔運び行動低下を惹き起こした可能性が考えられ、Lrrn4 遺伝子欠損型マウスは育児放棄の親側の主要因と考えられる「仔への関心が低下した」育児放棄モデルマウスであると示唆された。

## (4)Lrrn4 のシグナル伝達機構の解明

抗 Lrrn4 抗体を用いてマウス海馬より免疫沈降法により結合分子の同定を試みた。しかし、内在性 Lrrn4 の特異的な沈降物を認めることが出来なかった。そのため、神経特異的プロモーター下流に FLAG タグ付加した Lrrn4 発現コンストラクトを作成し、初代神経培養細胞に過剰発現させて発現を観察した。抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降反応物を、ウェスタンブロット法にて解析すると抗 FLAG 抗体により Lrrn4 タンパク質の発現が確認できた。そこで、抗 FLAG 抗体による Lrrn4 共沈物を SDS-PAGE 後、ゲルを銀染色法により染色し特異的なバンドを質量分析により解析することで Lrrn4 結合タンパク質の同定を試みた。その結果、約 50kDa の膜タンパク質が同定され、Lrrn4 と結合する分子であることが示唆された。今後、両者の結合をウェスタンブロット法により確認し、その結合の意義について解析していく予定である。

### <参考文献>

- ①Bando T et al., Mol Cell Biol 25: 4166-4175, 2005.
- ②de Wit J et al., Trends Neurosci 37: 539-550, 2014.
- ③Belluscio L et al., Neuron 20: 69-81, 1998.
- ④Wang Z et al., Neuropsychopharmacology 36: 772-781, 2011.
- ⑤Pedersen CA et al., Genes Brain Behav 5: 274-281, 2006.
- ⑥Jin D et al., Nature 446: 41-45, 2007.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	久岡 朋子  (Hisaoka Tomoko)  (00398463)	和歌山県立医科大学・医学部・助教    (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関