

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07265

研究課題名(和文) ネグレクトの抑制における分子作用機序の解明：乳汁成分とエピゲノム修飾の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the inhibition of neglect behavior: analyses of milk components and epigenetic modifications.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：育児行動発現に必要と思われるオキシトシン(Oxt)の授乳中の濃度の変化をELISAで測定した。分娩8日から12日にかけて母乳中のOxt濃度は有意に高値を示した。この上昇は次世代の育児行動の発現に必要であると考えている。

母乳中のOxtの育児行動発現への影響を調べるためOXT抗体を使って母乳中のOXTの約70%を除去した低OXT母乳を作成した。低OXT母乳で人工哺育した新生仔は分娩後、仔への育児行動が強くネグレクトすることを見出した。この低Oxt母乳にOxtを添加した母乳で哺育された雌マウスは有意にネグレクトを回避した。母乳中のOxtは次世代の育児行動の発現に必要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代の育児行動の発現に内分泌物質であるホルモン(Oxt)が、母乳中に外分泌されることが必要であるという研究結果を通して、内分泌物質が外分泌される生理学的理由の一つを明らかにできたことが、本研究の学術的意義である。

育児放棄(ネグレクト)は社会的に重大なインシデントであるにも関わらず、発生事例や現象の羅列、社会的な機構の不備を指摘しているだけに過ぎず、分子基盤や発生メカニズムは未だ明らかでない。本研究では、母乳中のOxtが次世代の育児行動の正常な発現に必要であることを明らかにした。Oxtシグナルの破綻によるネグレクトの発生とその回避の方途を示せたことが社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：Changes in the concentration of oxytocin (Oxt) in breast milk of lactating mice, which appears to be necessary for the expression of nurturing behavior, were measured by ELISA. Oxt concentration was significantly higher from 8 to 12 days of lactation. We believe that this increase is necessary for the expression of nurturing behavior in offspring.

To investigate the effect of Oxt in mother's milk on the expression of nurturing behavior, low Oxt breast milk was prepared by removing about 70% of Oxt in mother's milk using Oxt antibody. We found that newborns artificially nursed in low OXT milk showed strong neglect of their offspring after parturition. Addition of Oxt to low Oxt milk significantly avoided neglect.

Taken together, Oxt in breast milk is necessary for the expression of nurturing behavior of their offspring.

研究分野：神経内分泌学、行動生理学

キーワード：育児行動 オキシトシン 母乳

1. 研究開始当初の背景

育児行動を発現させる分子基盤に関する理解は未だ充分ではない。我々は、育児行動の発現には胎児期に母体からの下垂体前葉ホルモンであるプロラクチン (Prolactin, PRL) シグナルが必要であると報告した。この PRL シグナルが充分でない母親から生まれた子は、将来ネグレクトになる。また、脳下垂体後葉で合成され、血中に分泌後、分娩時の子宮収縮や乳汁分泌、さらに育児行動の発現に働くオキシトシン (oxytocin, Oxt) が、母乳にも分泌されていることが明らかになった。母乳の影響を受けるのは新生児である。我々は母乳中に Oxt が含まれる理由として、Oxt の作用の一つである将来の育児行動の発現を新生児期に母乳を介して開始させるためと考えた。

2. 研究の目的

- 2-1. 母乳中の Oxt が、授乳されている新生児の将来の育児行動にいかなる影響を与えるのかを解明する。ホルモンによる育児行動の発現メカニズムを解析し、育児放棄 (ネグレクト) を回避するための方途を探る。
- 2-2. 内分泌物質であるホルモン (Oxt) が外分泌される意義を理解する。

3. 研究の方法

3-1. 低 OXT 母乳の作製

Polysciences 社製のマイクロビーズの表面のカルボキシル基をカルボジイミドにより活性化させて OXT 抗体を結合させたビーズを作成した。このビーズを充填したカラムを通過した母乳中の OXT は 71% が除去された。これを「低 OXT 母乳」として以下の実験に使用した。

3-2. 人工哺育による次世代の育児行動発現の解析

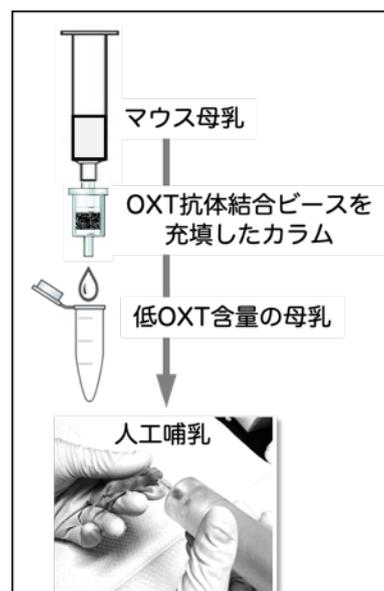
新生仔に「低 OXT 母乳」を誕生から 2 週間人工授乳させた。3 ヶ月で交配・分娩後、育児状況を観察した。さらに、「低 OXT 母乳」に正常の母乳と同量の Oxt を添加した「OXT 添加母乳」で人工授乳させた新生仔についても将来の育児行動を観察・解析した。

4. 研究成果

4-1. 母乳中のオキシトシンによるネグレクト抑制効果

母乳に含まれる新生仔の将来の育児行動発現に必要なと思われるホルモンであるオキシトシン (Oxt、下垂体後葉ホルモンの一つ) の授乳中の濃度の変化を ELISA で測定した。分娩後 16 日間で、分娩 3 日後と 8 日から 12 日にかけて母乳中の Oxt 濃度は有意に高値を示した。分娩 3 日後の高値は分娩の際の子宮筋収縮のための大量分泌の影響によるものと思われる。一方、分娩後 8 日から 12 日までの間の上昇は血中 Oxt が母乳に外分泌される生理的意義の一つであり、次世代の育児行動の発現に必要な (必然的な) 上昇と考えている。

Oxt を含まないマウス母乳は、Oxt 抗体を結合させたビーズを充填したカラムにマウスから搾乳した母乳を通す事により Oxt 含量の低下した母乳 (低 Oxt 母乳、71% の Oxt 除去) を作製した (右上図参照、発表準備中)。この「低 Oxt 母乳」で人工哺育された雌マウスは、交配・分娩後、次世代 (仔) への育児行動が強くネグレクトすることを見出した (発表準備中)。この「低 Oxt 母乳」



に Oxt を添加した母乳で哺育された雌マウスは将来有意にネグレクトを回避した。現在、「無 Oxt 母乳」で哺育された雌マウスの育児行動の解析のため、オキシトシン遺伝子欠損マウス (Oxt^{-/-}) からの母乳と人工母乳を調整している。

4.2. 胎児期プロラクチンによる体内炎症抑制を介したネグレクト抑制効果の可能性

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は十分な母乳を産生していたにもかかわらず子育放棄をする。これは CIN85 欠損のため、胎児期における母体からのプロラクチン(PRL、下垂体前葉ホルモンの一つ)の正常な受容の破綻による。

この育児放棄が遺伝子欠損のない正常なマウスでも起こりうることを調べるために、マウス妊娠後期に高プロラクチン血症の治療薬であるブロモクリプチン (Bromocriptine) を投与し、母体血中の PRL 濃度を減少させた (図 1A)。その母マウスから生まれた仔供達は分娩後、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 (図 1B)。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 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。PRL は体内炎症を抑制するので、PRL の減少は炎症を惹起させ、それが育児放棄に関連していると思われる。本研究成果は国際学術雑誌に掲載された。研究発表等の入力【雑誌論文】に記載した。

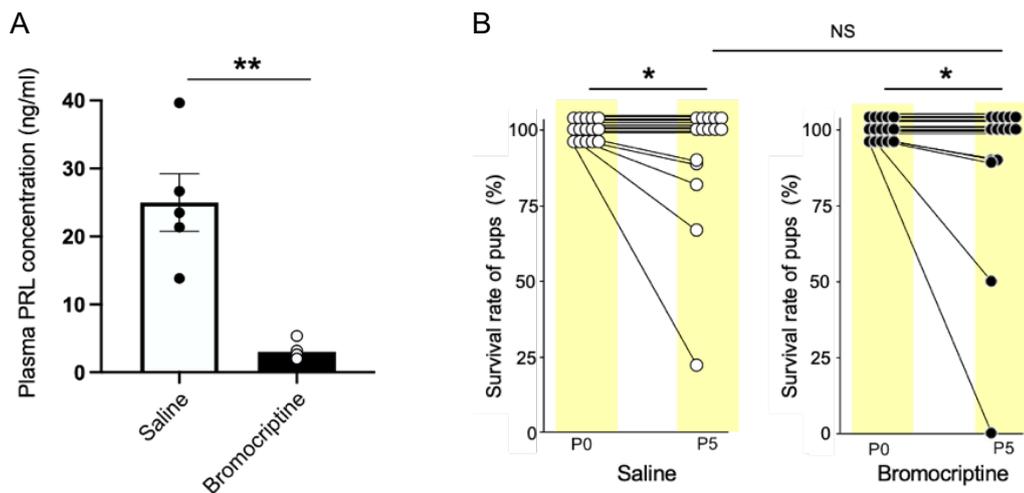


図1 ブロモクリプチン投与による血漿中 PRL 濃度への影響

妊娠マウスにブロモクリプチン (Bromocriptine) または生理食塩水 (Saline) を妊娠 15 日目から 20 日まで皮下注射した。(A) 血漿 PRL 濃度は最後のブロモクリプチン投与後に採血し ELISA で測定した: 生理食塩水 (□, n=5)、ブロモクリプチン (■, n=6)。データは、平均値±SEM で表した。個々のデータ (●) は、ヒストグラムにプロットした。生理食塩水を注射した妊娠マウスの血漿 PRL 濃度と比較して有意に減少していた (**、 $P=0.0043$; Mann-Whitney 検定)。(B) 生理食塩水投与マウス (○, n=15)、あるいはブロモクリプチン投与マウス (●, n=15) から生まれた母親の仔の P0 (生後 0 日) から P5 (生後 5 日) 間の生存率の変化 (* $P < 0.05$; Mann-Whitney 検定、NS、有意ではない)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuda S, Kwan E O, Sairenji T, Sato S, Yajima H, Amano I, Koibuchi N, Shimokawa N.	4. 巻 64
2. 論文標題 Maternal prolactin levels during late pregnancy and nurturing behavior of offspring in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Psychobiology	6. 最初と最後の頁 e22264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dev.22264	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 Shimokawa N, Takahashi I, Iizuka H.	4. 巻 123
2. 論文標題 Spinal malformation - A biochemical analysis using congenital kyphosis rats.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 501-505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.30206	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 Sato T, Vargas D, Miyazaki K, Uchida K, Ariyani W, Miyazaki M, Okada J, Lizcano F, Koibuchi N, Shimokawa N.	4. 巻 235
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 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 6725-6735
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
1. 著者名 Ishiwata S, Iizuka H, Sonoda H, Tsunoda D, Tajika Y, Chikuda H, Koibuchi N, Shimokawa N.	4. 巻 475
2. 論文標題 Upregulated miR-224-5p suppresses osteoblast differentiation by increasing the expression of Pai-1 in the lumbar spine of a rat model of congenital kyphoscoliosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 53-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-020-03859-8.	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下川哲昭
2. 発表標題 ネグレクトの原因の解明とその回避に向けて - 生理学の立場から -
3. 学会等名 日本家政学会 第73回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N. Shimokawa, I. Takahashi, H. Iizuka
2. 発表標題 Comprehensive analysis of the gene expression in the lumbar spines of congenital kyphosis rats
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 I. Takahashi, D. Vargas, T. Sato, M. Miyazaki, K. Uchida, I. Amano, R. Kaneko, F. Lizcano, N. Koibuchi, N. Shimokawa
2. 発表標題 Properties and in vivo functions of EID1 in the suppression of lipid accumulation
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Miyazaki, N. W. Miyazaki, N. Shimokawa
2. 発表標題 Can EID1, a fat accumulation inhibitor in adipocytes, also suppress fat accumulation in hepatocytes?
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野洋一、下川哲昭、鯉淵典之
2. 発表標題 ラットに対する長期的な運動負荷が酸化ストレスおよび抗酸化力に与える影響の検証
3. 学会等名 第58回 日本リハビリテーション医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 樹、渡辺 悠介、下川 哲昭
2. 発表標題 脂肪細胞分化抑制因子EID1の機能解析
3. 学会等名 第17回 環境生理学プレコンgres
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 N. Shimokawa, I. Takahashi, Y. Watanabe, I. Amano, N. Koibuchi
2. 発表標題 Calcium signaling is impaired in the lumbar spine of a rat model of congenital kyphosis
3. 学会等名 日本生理学会大会 第100回記念大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Y. Watanabe, I. Takahashi, K. Uchida, I. Amano, W. Miyazaki, N. Koibuchi, N. Shimokawa
2. 発表標題 Alteration of oxytocin levels in breast milk of lactating mice
3. 学会等名 日本生理学会大会 第100回記念大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 I. Takahashi, Y. Watanabe, T. Sato, M. Miyazaki, I. Amano, T. Nakanishi, N. Koibuchi, N. Shimokawa
2. 発表標題 The in vivo function of EID1 in lipid metabolism
3. 学会等名 日本生理学会大会 第100回記念大会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 下川哲昭：第23, 36, 37章訳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 662
3. 書名 リップニコット イラストレイデッド 生理学 原著2版	

〔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)	

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			
ドイツ	Goethe University School of Medicine			
ノルウェー	University of Oslo			
コロンビア	Universidad de La Sabana			

共同研究相手国	相手方研究機関			
インドネシア	Universitas Padjadjaran			