

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07270

研究課題名(和文) 母子分離ストレスによる脳内GABA変調で攪乱されるこころの病態解析と治療法の探索

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of mental disorder caused by disturbance of GABAergic system in the brain due to maternal separation stress and search for treatment methods

研究代表者

山田 順子 (YAMADA, JUNKO)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：30334965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：幼児期ネグレクトなどのストレスにより成長後不安障害、うつ、摂食障害など様々な疾患に罹患する確率が高い。本研究はネグレクトモデルとして母子分離マウスを用い母子分離により現れる成長後の不安増加、習慣性、うつ様行動の成因を探り介入による回復効果を解析すること、脳内における変化を解析することを目的として、行動、脳機能、ストレス評価を行い、さらに雌雄差解析も行ったところ、母子分離による影響は雄マウスに強く表れ、抑鬱、ストレスによる多動などがみられた。母子分離時間を長くした場合、雄では成長による体重増加の抑制がみられたが雌では変化はみられなかった。運動介入はうつ様行動の改善に効果があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年児童虐待が社会問題化してきており年々増加傾向にある。幼少期のストレスは成長後様々な精神的、身体的問題を引き起こす。特に精神的虐待及びネグレクトは重度の鬱病を引き起こすと言われている。本研究ではネグレクトモデルとして母子分離マウスを用いた研究を行った。母子分離による影響は雄マウスに強く表れ、不安様行動、体重増加の抑制などが顕著にみられた。自由に運動できる環境におかれた母子分離群では不安様行動は見られなかったことから運動介入が何らかのストレス改善効果に関わっていることがわかった。このことから、母子分離により成長後も行動への影響が残存するが、運動など介入をすることにより改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Stress caused by neglect in early childhood increases the probability of developing various disorders such as anxiety disorders, depression, and eating disorders. In this study, we used maternal separation mice as a model of neglect, and conducted behavioral, brain function, and stress assessments, as well as sex difference analyses, in order to investigate the causes of increased anxiety, addictive, and depressive behaviors that occur after the separation of mother and child, and to analyze the effects of intervention on recovery, and to analyze changes in the brain. The effects of mother-infant separation were strongly observed in male mice, including depression and stress-induced hyperactivity. Longer mother-infant separation time suppressed body weight gain in males, but not in females. Exercise intervention was found to be effective in improving depression-like behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：ストレス 母子分離 雌雄差 社会的孤立

1. 研究開始当初の背景

【生育環境が子供のこころに及ぼす影響と問題点】

ネグレクトなどの幼少期の虐待、環境の劣悪化などのストレスが子供に与える影響は成長に伴い、不安障害、心的外傷後ストレス障害、うつ、摂食障害など様々な疾患に罹患する確率が高い (Pollak et al. 2010, Bos et al. 2011)。こどものこころ、すなわち脳が健康に发育するためには、親や子ども同士の集団での関わりが重要である。ネグレクトを含めた児童虐待の相談件数は年々増加しており (厚生労働省)、痛ましい事件が後をたたない。さらには、2019年3月に虐待加害者として有罪判決を受けた親の75%が子供時代に虐待を受けていたという調査が理研の調べで発表された。つまり、虐待は次の世代にまで引き継がれる可能性があるということを示している。一方で、病態メカニズムを知り、早期に養育や教育に反映させていくことで虐待により受けたストレス症状を緩和できる可能性が高い。

しかし、これら幼少期の虐待により受けたストレスが発達期、成長後の脳に及ぼす影響や病態メカニズムは未だ明らかではない。病態の根源である脳機能研究はヒトを対象として行うには限界があり、発達障害の病態解明、早期治療法の開発にはモデル動物が有用である。

【モデル動物による研究】

幼少期虐待モデル動物である母子分離動物に関する研究では、乳児期の短時間の母子分離により、成長後の不安増加、習慣性、うつ様行動がみられることが報告されている。また、ストレス応答の結果として視床下部-下垂体-副腎皮質系や海馬に影響を及ぼすなど脳に障害を被っている可能性が報告され (Enthoven 2008, Nishi 2014, 2017) 成長後の脳機能や構造に重大な問題を引き起こすことが示唆されている。しかし、これらの基礎をなす機序は未だ明らかではなく、根拠ある養育を行うためには脳機能への影響を鑑みたエビデンスが必要である。

近年、MSを受けたマウスやラットが成長後にストレスを受けた際の影響についての研究が行われているが、ストレス耐性を示す、あるいは脆弱性を示す、といった様々な報告があり、さらなる研究が必要である。特に、長期間社会的関係を築けない不安定な環境を作る、社会的不安定ストレスを受けた際の行動や生体内のストレス反応への影響について評価した報告は少ない。また SIS のような社会的ストレスは、ヒトのうつ病の病因の一つであり MS 後の SIS の影響を検討することは、うつ病のメカニズムを考えるにあたって有用である。

加えて、MS によって生じる影響に対する有用な介入方法は明らかでない。運動介入は神経新生や神経適応、神経保護を促進し、脳内のストレス反応を軽減させ、抑うつ症状や記憶障害を治療する効果があり、薬物治療のような副作用のリスクが少ないことが示されている。近年齧歯類に対して行った研究では、運動介入は MS による記憶障害や不安行動を改善すると報告されている。しかし、MS を受けたマウスに自発的な運動を行った際のうつ様行動や不安様行動および報酬回路系への効果について評価した報告は少なく、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では母子分離マウスに現れる成長後の不安増加、習慣性、うつ様行動の成因を探り介入による回復効果を解析すること、脳内における変化を解析することを目的とし、ストレスを受けたこどもの心に何が起きているのかを知り、根拠ある養育環境の改善のためのエビデンスの確立をめざす。

3. 研究の方法

当初の予定では3時間母子分離を行う予定であったが、これに加え6時間、12時間母子分離も行った

実験動物：雌雄 C57BL/6J マウス

- 母子分離：母子分離は、以下3種類の異なる母子分離時間を行った。
生後2日目から14日目、3時間/日、6時間/日、12時間/日に母マウスや同腹仔から隔離する群を作成。コントロール群として通常飼育のマウスを用いた。
- 社会的孤立ストレス (SI)：離乳後から行動テスト終了までの約2ヵ月間、1ゲージに孤立させ飼育した。飼育室が同一のため他の動物の声を聞いたり嗅いだりすることはできるが、他のマウスとの物理的な相互作用がない状態とした。Control 群は、通常飼育として、1ゲージ3匹で飼育した。
- 社会的不安定ストレス (SIS)：P21~77の間ゲージメイトを3日ごとに変更した。この際、直前のゲージメイトと同じゲージになることがないように、ゲージメイトはランダムにローテーションした。
- 運動介入 (Ex)：P21~77の間、回転かごのあるゲージで3頭を飼育し、自由に自発的な運動をさせた。運動量は3匹分で計測し引数で割ったものを使用した。
- 行動解析：生後21日目で離乳、雌雄とも以下のテストを行った
 - 不安行動解析：Open field test (中央滞在時間、総移動距離) Elevated plus maze (open arm 滞在時間、総移動距離)
 - 記憶学習解析：バーンズ迷路、8方向放射状迷路 (ゴールまでの時間、エラー数)
 - うつ様行動解析：強制水泳テスト (不動時間)、ショ糖嗜好性テスト (グルーミング時間)
 - 社会性テスト：Three-chamber test, Social interaction test

6. **組織評価**: 脳内活性部位を解析するため免疫染色により fos-B 発現を解析した
7. **ストレスホルモン測定**: ストレス評価のため ELISA 法により血中コルチコステロン濃度を測定した

4. 研究成果

MS: 母子分離

MSSI: 母子分離後社会的孤立ストレス負荷

MSSIS: 母子分離後社会的不安定性ストレス負荷

Ex: 運動介入

・3時間母子分離 (MS)

コントロールと比較して MS 群は Splash test グルーミング時間減少、前辺縁皮質での Fos-b 発現量の増加が見られた。

MSSI は MS よりさらにストレス状態にあると仮定していたが、MS と比較してセルフケアはコントロール群の値に近い結果となった。一方、コルチコステロン値はコントロール群より優位に高い結果であった。興味深いことに、MS を行わず SI のみ負荷した群でコントロールと比較して優位にセルフケアの低下、ストレス値の上昇、多動様行動が見られた。

MSSIS はコントロールとの差がほとんど見られなかった半面 SI 同様単独でストレスを与えた SIS は総移動距離の低下、Forced swim test の不動時間上昇、血漿コルチコステロン濃度の上昇が見られ、高ストレス状態にあると考えられる。

・運動介入(Ex)の効果

MS で低下していた Splash test のグルーミング時間は運動介入により増加し、Open fields test の中央滞在時間も上昇したことから、運動介入によりうつ様行動が改善したと考えられる。

・長時間母子分離：6時間 (6hMS)、12時間 (12hMS)

Open field の中央滞在時間は 6hMS ではコントロールと変わらない結果であった一方、12hMS では優位に減少しており強い不安状態にあると推測された。また、興味深いことに、Open field test における活動量を計測した結果、コントロールより 6hMS が優位に活動量が増加し、12hMS は低下していた。Forced swim test では 6hMS、12hMS とも不動時間の上昇がみられ、抑うつ状態にあることが推測された。学習に関しては全群とも学習効果は観察され、違いはみられなかった。

・母子分離の雌雄差

雌マウスはコントロールと比較して雄より母子分離による影響が少ない傾向であった。雌雄差では open field test で 6hMS の中央滞在時間の減少がみられた一方、雄同様多動傾向であった。Forced swim test では 12hMS 群の雄は雌に比べて不動時間が有意に多く ($p < 0.001$)、雄の方が抑うつ状態が強いと推測される。8方向放射状迷路の学習テストにおいて、6hMS は雄が雌に比べて有意にエラー数が高かった。バーンズ迷路テストでは興味深いことにコントロールでの雌雄比較において雌のエラー数が雄に比べ有意に高く、6hMS、12hMS でも有意差はないものの雌の方が空間記憶能力が低いという結果になった。今回、行動テストを行うにあたり雌の性周期を考慮に入れておらず、今後は雌の性周期を考慮する必要があると考えている。全体的に雄の方が MS に対する影響は受けやすい傾向がみられた。成長に伴う体重増加に関しては雄ではコントロールと比較して 6hMS、12hMS とともに母子分離後も生後 4 か月まで体重は有意に低い結果となったが、メスは母子分離直後で 12hMS が低かったほか、母子分離後は体重はコントロールと差がなくなったことから、雄のほうが母子分離による影響を長く継続しているのではないかと推測された。

今回、母子分離時間による成長後の影響と、ストレスが付加された時の影響を解析したが、予想に反して、母子分離を行った群の方が単独でストレスを与えたものよりストレス反応が低いという結果になった。MS によりストレス耐性が生じているのか今回のデータからだけでは推測の域を出ないが、一方で、単独で社会的ストレス (孤立、不安定) を与えるとストレス反応が強いことがわかった。また、運動介入はストレスを改善する傾向にあることも確認できたため、今後は、社会的ストレス単独の影響、運動などの介入の効果などの研究に発展させていきたいと考えている。

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 3件）

1. 著者名 Mikami Misaaki, Hirota Tomoya, Takahashi Michio, Adachi Masaki, Saito Manabu, Koeda Shuhei, Yoshida Kazutaka, Sakamoto Yui, Kato Sumi, Nakamura Kazuhiko, Yamada Junko	4. 巻 52
2. 論文標題 Atypical Sensory Processing Profiles and Their Associations With Motor Problems In Preschoolers With Developmental Coordination Disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Child Psychiatry & Human Development	6. 最初と最後の頁 311 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10578-020-01013-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shuhei Koeda, Jojima Haruna, Misaki Mikami, Chihiro Sato, Manabu Saito, Junko Yamada	4. 巻 56(9)
2. 論文標題 Characteristic of the pronunciation of Japanese children with developmental coordination disorder.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The journal of occupational therapy	6. 最初と最後の頁 1005-1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Masaru Yamaguchi, Takakiyo Tsujiguchi, Tomonori Furukawa, Shuji Shimoyama, Toshiya Nakamura, Yasushi Mariya, Junko Yamada	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Effect of ionizing radiation on the intercellular network of murine cerebral cortical neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiation Environment and Medicine	6. 最初と最後の頁 65-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.51083/radiatenvironmed.12.1_65	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Misaki Mikami, Tomoya Hirota, Masaki Adachi, Michio Takahashi, Tomoko Nishimura, Manabu Saito, Kazuhiko Nakamura, Junko Yamada	4. 巻 133
2. 論文標題 Trajectories of emotional and behavioral problems in school-age children with coordination difficulties and their relationships to ASD/ADHD traits	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Research in developmental disabilities	6. 最初と最後の頁 104-394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ridd.2022.104394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小枝周平, 斉藤まなぶ, 沢中智香, 三上美咲, 照井藍, 吉田和貴, 山田順子
2. 発表標題 視線計測装置 (Gazefinder) を用いた発達性協調運動障害児の視線の向け方に関する予備的研究.
3. 学会等名 第5回日本DCD学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小枝周平, 斉藤まなぶ, 三上美咲, 佐藤ちひろ, 山田順子
2. 発表標題 5歳児の人物画発達の遅れに関連する因子
3. 学会等名 第56回日本作業療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上美咲, 小枝周平, 斉藤まなぶ, 佐藤ちひろ, 山田順子
2. 発表標題 発達に問題を抱える幼児の協調運動能力と運動経験の関連に関する予備的研究
3. 学会等名 第56回日本作業療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上美咲, 小枝周平, 大里絢子, 佐藤ちひろ, 斉藤まなぶ, 山田順子
2. 発表標題 発達障害を有する5歳児の筆記具操作方法の発達と描線運動能力
3. 学会等名 第49回日本脳科学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤ちひろ、山田順子
2. 発表標題 運動様式の違いが脳出血モデルラットの運動麻痺回復に及ぼす影響
3. 学会等名 第49回日本脳科学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田順子
2. 発表標題 「脳の可塑性と機能回復」 GABAは抑制性伝達物質？
3. 学会等名 第32回東北作業療法学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田順子
2. 発表標題 「脳可塑性は可能性 機能回復と脳回復 ～動物を用いた基礎研究から～」
3. 学会等名 第15回日本作業療法研究学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小枝周平、柳町穂実、三上美咲、佐藤ちひろ、山田順子
2. 発表標題 自閉症モデルマウスに対する強制運動の悪影響
3. 学会等名 第55回日本作業療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Koeda , Honami Yanagimachi , Misaki Mikami , Chihiro Sato , Junko Yamada
2. 発表標題 Enrich environment causes the emotional and behavioral changes to the mouse model of autism spectrum disorder
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山郁菜絵、小枝周平、三上美咲、斉藤まなぶ、山田順子
2. 発表標題 発達障害児の間隔特異性と栄養素摂取との関係
3. 学会等名 第55回日本作業療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上美咲・斉藤まなぶ・小枝周平・大里絢子・増田貴人・中村和彦・山田順子
2. 発表標題 5歳における発達性協調運動障害児の筋力
3. 学会等名 第4回本DCD学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上美咲, 小枝周平 , 斉藤まなぶ, 中村和彦, 山田順子
2. 発表標題 幼児期における発達障害児の筆記具操作と描線運動
3. 学会等名 第54回日本作業療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小枝周平, 三上美咲, 斉藤まなぶ, 中村和彦, 山田順子
2. 発表標題 手指の静的触覚機能に皮膚硬度が与える影響
3. 学会等名 第54回日本作業療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤ちひろ, 小枝周平, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットにおける運動種類の違いが運動麻痺回復および脳可塑性関連因子に及ぼす影響
3. 学会等名 第54回日本作業療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤ちひろ, 小枝周平, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 脳出血ラットにおける運動種類の違いが機能回復に与える影響
3. 学会等名 第52回東北生理談話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Mitsuru Chiba, Shuhei Koeda, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The motor recovery synaptic plasticity after stroke were affected by the types of exercise
3. 学会等名 The 43th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Koeda Shuhei, Mana Kishimoto, Shun Mori, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The motor recovery and synaptic plasticity was affected by the types of exercise in the hemorrhage model rat.
3. 学会等名 the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, the 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaki Mikami, Masaki Adachi, Michio Takahashi, Tomoya Hirota, Manabu Saito, Shuhei Koeda, Kazutaka Yoshida, Kazuhiko Nakamura, Junko Yamada
2. 発表標題 Sensory processing abnormalities and their associations with behavioral and emotional difficulties in preschoolers with Developmental Coordination Disorder.
3. 学会等名 The International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions' (IACAPAP) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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	小枝 周平 (Koeda Shuhei) (00455734)	弘前大学・保健学研究科・講師 (11101)	
研究分担者	富山 誠彦 (Tomiya Masahiko) (40311542)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	
研究分担者	佐藤 ちひろ (Sato Chihiro) (70757468)	弘前大学・保健学研究科・助教 (11101)	

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
---------	---------