

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650161

研究課題名(和文)概日時計が情動をコントロールする作用基盤の解析

研究課題名(英文)Analysis of mechanisms by which circadian clocks affect mood

研究代表者

眞田 佳門 (Sanada, Kamon)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50431896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：生物時計は、生物の生理や行動の24時間のリズムを司る。マウスの養育行動は概日時計に駆動されており、日内リズムを示す。重要なことに、養育の質や量は、仔の情緒に影響を及ぼすことが知られる。本研究により、概日時計に異常を呈する母マウス(Clock変異マウス)は、その養育活動の日内パターンが変化していることを見出した。さらに、Clock変異マウスに養育された野生型マウスは、不安レベルが顕著に亢進していた。また、脳の不安回路の形成に重要である脳内セロトニン量を測定したところ、この仔マウスでは、顕著に減少していた。以上、母親の概日時計の破綻は、仔の情緒に大きく影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks control physiological and behavioral rhythms. In mice, nursing behavior show a clear diurnal rhythm that is governed by the circadian clock. Importantly, maternal care influences the development of emotional behavior of the offspring. We found that circadian clock-disrupted mutant mice (Clock mutant mice) display the altered daily pattern of nursing behavior. Wild-type mice fostered by Clock mutant mice exhibit increased anxiety-related behavior. This is coupled with reduced levels of brain serotonin at postnatal day 14, a critical regulator for maturation of normal anxiety-modulating circuits during the postnatal development. Thus, disruption of the circadian clock in mothers has an adverse impact on establishing normal anxiety levels, which may suggest the increased risk of anxiety disorders in offspring of mothers with diurnal rhythm disturbance.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：概日時計 養育活動 セロトニン

1. 研究開始当初の背景

概日時計は、生物の生理や行動の日内リズムを司る。近年、概日時計の破綻と気分障害が密接に関連していることが知られる。実際、概日時計の中核分子である *Clock* タンパク質に変異を持つマウスは、概日リズムの異常と共に情動行動の異常を呈する。

ヒトにおいて、幼少期における養育環境が子供の情緒に生涯にわたって影響を及ぼすことがよく知られている。実際、幼児虐待や育児放棄によって、子供の不安障害が表出する危険性が顕著に上昇する。サルやげっ歯類においても、母親が育児放棄した場合や子供から母親を頻繁に引き離すことを繰り返すことによって、仔の不安様行動が亢進する。また、ラットを用いた研究により、グルーミングや授乳をあまり行わない母ラットに養育された仔ラットは、養育活動をより頻繁に行う母ラットに養育された仔ラットに比べて、不安様行動が亢進すると共にストレスに対して脆弱になるという報告がある。このように、生後初期における養育の質や量は、子供の不安を司る神経回路の形成に大きな影響を与えると考えられている。

夜行性のげっ歯類の養育行動は日内リズムを示し、授乳活動は主に明期（休息期）に行われる。重要なことに、母マウスの概日時計が破たんすると、養育活動の日内パターンに異常をきたす。従来より、概日時計の破綻がその個体の情動に及ぼす影響およびそのメカニズムに関する知見は集積しているが、養育者の概日時計が破綻した場合に、その仔の情動に及ぼす影響については、ほとんど知見がない。

2. 研究の目的

母親の養育活動の量や質は子供の不安レベルに影響を及ぼすことが知られる。概日時計の破綻がその個体の養育活動リズムに影響を及ぼすことを考え合わせると、概日時計に異常を示す母親に養育された子供は、成長後の不安様行動が異常を呈する可能性が考えられた。そこで本研究では、概日時計に異常を示す *Clock* 変異マウスに養育された仔マウスの不安レベルについて調べた。

3. 研究の方法

Clock 変異マウスによる養育が仔マウスに及ぼす影響を調べるため、本研究では *heterozygous Clock* 変異マウスを母マウスとして用いた。その理由は、*homozygous Clock* 変異マウスは生殖機能に不具合があること、さらに母乳の量が少ないため、仔の発

育が悪いためである。この *Clock* 変異マウスの行動および授乳活動等をビデオ撮影し、活動リズムや授乳活動リズム等を詳細に検討した。また、出生直後の野生型マウス（同腹）を2つのグループにわけて、それぞれを野生型母マウスおよび *Clock* 変異母マウスに里親保育させ、仔マウスが成長後に、情動（不安様行動およびうつ様行動）を解析した。これと並行して、母マウスの情動も解析した。不安様行動の解析には、オープンフィールドテスト（Open field test）と高架式十字迷路試験（Elevated plus maze test）を用いた。うつ様行動の解析には、強制水泳試験（Forced swim test）と尾懸垂試験（Tail suspension test）。

また、授乳期間中の仔マウスから前脳を摘出し、セロトニン含量を ELISA 法により測定した。また、母マウスから母乳を搾乳し、セロトニン前駆体の量を ELISA 法によって測定した。

4. 研究成果

Clock 蛋白質は概日時計発振の中核をなす転写因子である。本研究で用いた *Clock* 変異マウスでは、恒暗条件下における活動リズムの周期が、野生型マウスと比較して1時間（*heterozygous*）もしくは3-4時間（*homozygous*）長くなる。一方、明暗サイクル条件下においても、*homozygous Clock* 変異マウスは野生型マウスと比較して、明期における活動量が顕著に上昇するなど、活動の日内パターンが異常を呈する。そこでまず、12時間毎の明暗サイクル条件下における *heterozygous Clock* 変異マウスの活動パターンを調べた。その結果、*homozygous Clock* 変異マウスと同様に、野生型に比べて明期の活動量が上昇するなど、活動の日内パターンが異常を呈することが判明した。

Clock 変異マウスによる養育が仔マウスに及ぼす影響を調べるため、以下の実験では *heterozygous Clock* 変異マウスを母マウスとして用いた。まず、*heterozygous Clock* 変異マウス（以下、*Clock* 変異マウスと呼ぶ）の授乳活動の日内パターンを調べた（図1）。その結果、野生型マウスは暗期（活動期）に断続的に授乳し、明期（休息期）には継続的（授乳活動1回当たりの継続時間が長い）に授乳するという日内パターンを示すが、*Clock* 変異マウスは一日を通して断続的（授乳活動1回当たりの継続時間が短い）に授乳するという、異なる日内パターンを示した（図1A, C）。他方、一日の総授乳時間に有意な差は認められなかった（図1B）。

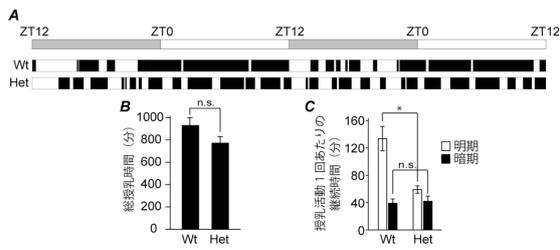


図 1. (A) 上バー：明暗条件を白色と灰色のバーで示した。ZT は、明期の開始を 0、暗期の開始を 12 とした時刻の単位。下バー：授乳活動をしている時間帯を黒バーで示した。Wt: 野生型。Het: heterozygous. (B) 一日の総授乳時間。(C) 明期および暗期における授乳活動 1 回あたりの継続時間。* $p < 0.05$ 。n.s. 有意差なし。

Clock 変異マウスに養育されたマウスの情動を調べるために、出産直後の雌マウスに、1 日齢の雄マウス (野生型) を里親保育させ、7 週齢において不安様行動・うつ様行動を測定した。不安様行動の測定には、オープンフィールドテスト (図 2A) と高架式十字迷路試験 (図 2B) を用いた。いずれのテストでも、不安感を誘発する領域 (オープンフィールドの中央領域や高架式十字迷路の壁のないアーム部) での滞在時間を測定し、不安の指標とした。その結果、Clock 変異マウスに養育されたマウスは不安様行動が亢進することが示唆された。一方、強制水泳試験 (Forced swim test) と尾懸垂試験 (Tail suspension test) を用いてうつ様行動を測定した。いずれのテストでも、“behavioral despair”の指標となる無動時間には差がなく、うつ様行動には変化が認められなかった。

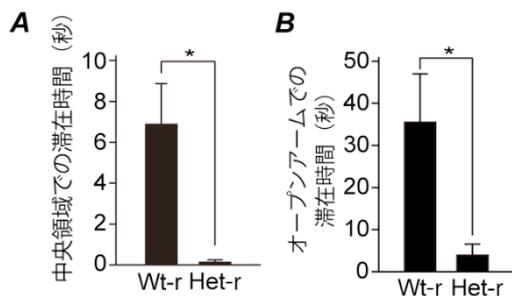


図 2. (A) オープンフィールド中央領域での滞在時間。(B) 高架式十字迷路試験におけるオープンアームでの滞在時間。Wt-r: 野生型マウスに養育されたマウス。Het-r: heterozygous Clock 変異マウスに養育されたマウス。* $p < 0.05$ 。

本研究において、Clock 変異マウスに養育されたマウスでは不安レベルが亢進するという見出し。このことは、概日時計システムが破綻した母親による養育が、子供の不安症の危険因子になることを示唆している。

従来の研究から、homozygous Clock 変異マウスは躁様の行動を示すことが知られる。母マウスの情動が異常を呈することによって、仔マウスの情動が変化している可能性を排除するため、heterozygous Clock 変異マウスの情動を調べた。しかしながら、不安様行動およびうつ様行動のいずれも野生型との違いが検出できなかった。そのため、本研究で母マウスとして用いた heterozygous Clock 変異マウスの情動は正常であるといえる。

そこで、仔マウスの不安様行動が亢進する原因を調べるため、脳内セロトニン量を測定した。授乳期の仔マウスにおいて、脳内セロトニン量が適切に保たれることが不安回路の正常発達に重要であることが知られる。生後 14 日目において、野生型仔マウスの脳内セロトニン量を測定した結果、Clock 変異マウスに養育されたマウスでは、脳内セロトニン量が顕著に低下していた。セロトニンはトリプトファンから生合成される。セロトニン自体は Blood brain barrier を透過しないことから、セロトニンの合成は脳内でおこると考えられる。しかし、その前駆体であるトリプトファンは母親の乳を介して仔マウスに供給される可能性はある。そこで、Clock 変異マウスの乳および授乳期の仔マウスの血中に含まれるトリプトファン量を測定した。その結果、いずれのトリプトファン量も減少していなかった。このことから、Clock 変異マウスに養育された仔マウスでは、脳におけるセロトニンの合成もしくは分解が異常を呈していることが示唆された。

本研究の結果、Clock 変異マウスの授乳活動の日内パターンが大きく異なることを考えると、授乳などの養育行動が適切なタイミングで実施されることが、子供の情動の正常発達に重要であると推察できる。現代社会においては、深夜勤務、シフトワークや断眠などにより、私共の概日時計システムが異常を呈する危険性が増大している。従来の研究により、概日時計システムの乱れが自身の身体的・精神的な異常を誘発することが明らかになっているが、概日時計システムの乱れが育児者に起こった場合に、その子供に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。本研究は、概日時計の乱れが世代を超えて負に作用する可能性を示唆しており、本研究で得られた知見は、幼少期の不安障害を誘発する危険因子の理解を前進させると共に、その治療戦略を考える上でも重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① So-ichi Tamai, Keisuke Imaizumi, Nobuhiro Kurabayashi, Minh Dang Nguyen, Takaya Abe, Masatoshi Inoue, Yoshitaka Fukada & Kamon Sanada (2014) Neuroprotective role of the basic leucine zipper transcription factor NFIL3 in models of amyotrophic lateral sclerosis. **J Biol Chem** 289:1629-38. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.524389

② Nobuhiro Kurabayashi & Kamon Sanada (2013) Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. **Genes Dev** 27:2708-2721. 査読有
DOI: 10.1128/MCB.01047-09

③ Nobuhiro Kurabayashi, Minh Dang Nguyen, & Kamon Sanada (2013) The G protein-coupled receptor GPRC5B contributes to neurogenesis in the developing mouse neocortex. **Development** 140:4335-4346. 査読有
DOI: 10.1242/dev.099754

④ Hiroko Koizumi, Nobuhiro Kurabayashi, Yuto Watanabe & Kamon Sanada (2013) Increased anxiety in offspring reared by circadian *Clock* mutant mice. **PLoS One** 12:e66021. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0066021

⑤ Camille Belzil, Gernot Neumayer, Alex P Vassilev, Kyoko L Yap, Hiroaki Konishi, Serge Rivest, Kamon Sanada, Mitsuhiko Ikura, Yoshihiro Nakatani, & Minh Dang Nguyen (2013) A Ca²⁺-dependent mechanism of neuronal survival mediated by the microtubule-associated protein p600. **J Biol Chem** 288:24452-24464. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.483107

[学会発表] (計 4 件)

① Kamon Sanada: G protein-coupled

receptor signaling required for neurogenesis in the developing neocortex. 第 85 回日本生化学会大会 2012.12.15、福岡国際会議場 (福岡)

② 小泉皓子、玉井総一、眞田佳門: 概日時計に異常を呈する母マウスによる養育が仔の情動に及ぼす影響. 第 85 回日本生化学会大会 2012.12.15、福岡国際会議場 (福岡)

③ Yasuki Naito, Kamon Sanada: AMP-activated protein kinase regulates neuronal migration in the developing neocortex. 第 85 回日本生化学会大会 2012.12.15、福岡国際会議場 (福岡)

④ 倉林伸博、玉井総一、眞田佳門: 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける Nfil3 の神経保護作用. 第 85 回日本生化学会大会 2012.12.15、福岡国際会議場 (福岡)

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/mgr1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞田 佳門 (SANADA YOSHIKADO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号: 50431896