

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460321

研究課題名(和文) 妊娠 - 出産 - 子育てによる学習機能向上の分子基盤

研究課題名(英文) The molecular basis of improving learning function with maternal experiences of pregnancy-delivery- pup rearing

研究代表者

長谷 都 (Nagatani, Miyako)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20450611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：産後ラットで、性周期が回帰する産後5週齢の経産群、対照群として未経産ラットを用いて、海馬依存性学習としてY字型迷路、海馬CA1細胞のパッチクランプ法によるLTPの記録、海馬AMPA受容体のサブユニットの構成をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、経産群は、対照群と比較し海馬依存性学習の成績が良好であり、海馬シナプスでのAMPA受容体GluR2の発現が多いことを確認した。また、未経産群では、LTPが誘導できない低頻度刺激で、経産群ではLTPが誘発された。これら結果は、経産群の学習機能の向上には、AMPA受容体のサブユニットの構成の変化によるシナプス伝達効率の変化が関与する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Behavioral changes during postpartum period are well documented in rats. In previous study, we demonstrated that changes in sensitivity to estrogen after delivery by comparing experimental groups of primiparity rats and nulliparity controls at the same age. In this study consisting of the similar groups, five-weeks postpartum rats that resumed estrus cycle after weaning were subjected in Y-maze tests. In electrophysiological study, we used a protocol for inducing long-term potentiation using whole-cell recording to pair low-frequency synaptic stimulation with a depolarizing voltage-clamp pulse. Furthermore, the expression level of GluR 1 and 2 was analyzed in the hippocampus by western blot. Improved performance of primiparous rats was found in Y maze. The expression of GluR 2 level was increased in the hippocampus of primiparous rats. Taken together, reproductive experience could change hippocampal function leading to improve spatial learning.

研究分野：行動神経内分泌

キーワード：妊娠 出産 子育て 学習 海馬 AMPA

### 1. 研究開始当初の背景

『妊娠、出産、子育て経験後の学習記憶に関する行動の変化』

妊娠期および産後の女性は、未経産かつ同年齢の女性と比較して学習、記憶力が低下するという報告がある (Janes et al., 1999)。一方、妊娠期の女性では記憶力の低下がみられるが、産後速やかに回復するという報告もある (Buckwalter et al., 1999)。これらヒトの研究は、被験者数が少ない上、妊娠、出産、子育て後の行動変化を長期間観察した研究ではなく、メカニズムの詳細についても明らかでない。ラットを用いた研究では、経産ラットは、未経産ラットと比較して有意に空間学習の成績が良好であり、その変化は、長期間観察されることが報告されている (a, b)。また、経産マウスでは空間学習の成績向上に伴って、海馬内のシナプス長期増強 (Long-term potentiation: LTP) が確認されたという報告もある (Tomizawa et al., 2003)。申請者の先行研究においても、経産ラットは、同週齢の未経産ラットと比較して Y 迷路テストにおける空間学習の成績が有意に良好であった。

『AMPA 受容体のシナプスへの移行が神経の可塑的变化に關与』

新しいことを経験することによって、神経系に起こる可塑的な変化として LTP という現象が知られており、LTP 誘導刺激により興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体、AMPA 受容体がシナプスに移行し、これが長期増強のメカニズムの一つであることが明らかになってきた (Takahashi et al., 2003)。AMPA 受容体は、GluR1 ~ GluR4 のサブユニットから構成される 4 量体であり、通常 GluR2 を含んでいる。しかし、近年、GluR2 を欠いた GluR2-lacking AMPA 受容体の存在が報告され、その受容体 1 分子あたりの電流応答が大きい、すなわちシナプスの伝達効率が上昇するという特徴が明らかとなっている (Liu et al., 2010)。また、連携研究者の雌性ラットを用いた研究では、エストロゲンにより AMPA 受容体のサブユニット構成が変化し、性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロンのシナプス伝達効率を変化させることを発見している (Tada et al., 2013)。海馬においても、エストロゲンにより AMPA 受容体のサブユニ

ット構成が変化することを発見している (連携研究者投稿中、図 2 中段)。しかし、妊娠、出産、子育て後に、AMPA 受容体のサブユニット構成が変化することを見いだした報告はない。

### 2. 研究の目的

申請者は、先行研究で経産ラットは未経産ラットと比較して空間学習の成績が良好であったが、海馬神経のシナプスには、形態学的な有意な差はないことを明らかにしている。そこで本研究では、妊娠、出産、子育て後の学習機能の向上は、AMPA 受容体のサブユニットの構成の変化によるシナプスの伝達効率の変化が關与する、という全体の仮説を立てた。本研究の目的は、先行研究で得た、妊娠、出産、子育て後の海馬依存性空間学習の成績の変化は、海馬シナプスの AMPA 受容体サブユニット構成の変化により、伝達効率の良い GluR2-lacking AMPA 受容体の移行が關与しているという仮説をもとに、経産ラット、未経産ラットを用いて電気生理学的、生化学的、行動学的手法を用いて明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### 平成 25 年度 電気生理学的解析

同週齢の経産ラット (N=20、Long Evans; LE 系、産後 5 週齢かつ生後 16 週齢、発情前期) と未経産ラット (N=20、LE 系、生後 16 週齢、発情前期) にイソフルランにて麻酔を施した後、脳の急性スライスを作成する。顕微鏡下 (研究室既存、FN-S2N NICON 社) で海馬 CA1 の単一細胞を用いてパッチクランプ膜電位固定法を行う。

#### (1) AMPA 受容体のサブユニットの構成の解析

電気刺激により -60 mV 時の EPSC と +40 mV の EPSC を記録し、前者の値を後者の値で除した Rectification Index (RI) は、雄ラットでは約 1.6 を示すことがわかっている。+40 mV に固定時の電流に GluR2 には特徴がある。従って、RI 値によって、シナプスに挿入された AMPA 受容体のサブタイプが通常のものなのか、どうなのかが明らかとなる。ピクロトキシン (GABA<sub>A</sub> 受容体の阻害剤) APV (NMDA 受容体阻害剤) 存在下で行う。

## (2) 飽和試験に伴う GluR2-lacking AMPA 受容体の解析

LTP がこれ以上誘導されない状態を観察する (LTP の飽和 ; occlusion) 飽和試験を行う。生体では、LTP の飽和状態に陥ることで、学習、記憶が障害される。テタヌ刺激は、0 mV、3~10Hz、90 秒間の paired 刺激で行う。先行研究にて、0 mV、3Hz、90 秒間の paired 刺激で行った実験では、未経産ラットにおいて LTP が誘発できなかったが、経産ラットでは誘発できた可能性がある。そこで、本研究では、結果をさらに確かめるためにテタヌ刺激の頻度を上げる。

## 生化学的解析

### (3) GluR1-2 及び GluR1 のリン酸化 (831 および 845) のタンパク定量

電気生理学的解析の結果を確認するため、生化学的解析を行う。同週齢の経産ラット (N=8、LE 系、産後 5 週齢かつ生後 16 週齢) と未経産ラット (N=8、LE 系、生後 16 週齢) にイソフルランにて麻酔を施した後、両側の海馬をブレインスライサーで 2mm 切り出し、シナプトソーム分画を施した後、GluR2 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロットを行い、GluR2 と結合している GluR1 サブユニットを定量する。分画の場合、組織サンプルを、シナプトソーム分画用バッファー (1 M HEPES:pH7.4、500 mM EDTA、100 mM EGTA、100 mM DTT、300  $\mu$ M Microcystin、100 mg/ml Leupeptin、Phosphatase Inhibitor、Protease Inhibitor) にてホモジナイズを行い、フィルターを通して採集する。3600x で遠心後、上清を捨て、ペレットを再度シナプトソーム分画用バッファーにて溶解する。また、後シナプスマーカー、GluR1 のリン酸化 (831 と 845) の定量も行う。

その詳細なメカニズム明らかにするために、\*iTRAQ 法 (Ross et al., 2004) を用いて海馬内タンパク質の存在量を網羅的に比較した。

## 平成 26 年度以降 学習成立後の解析

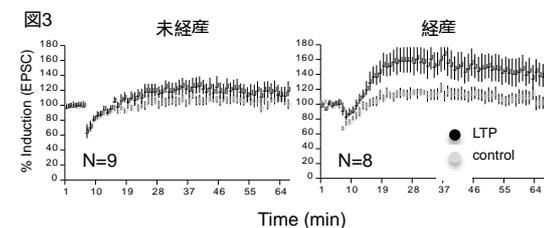
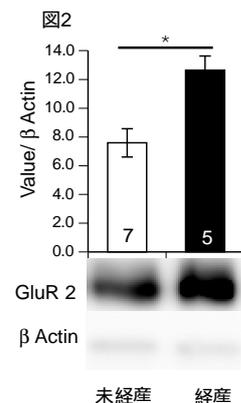
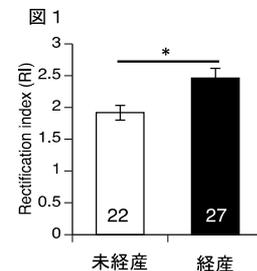
### (4) 受動的回避学習成立後の海馬サンプルを用いての生化学的解析

受動的回避学習 (IA task) 成立に伴い、ラットによる海馬学習依存的な AMPA 受容体の

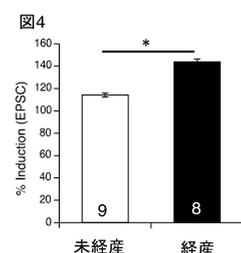
シナプス移行が確認されている。明るい部屋に入ると、速やかに暗い部屋へ移動する。移動した時に電気ショックを与える。ラットをケージに、戻し、30 分後に明るい部屋に入れても暗い部屋に移動しないことで、学習成立と評価する。学習成立の有無に関係なく、妊娠、出産、子育て後に、シナプスの機能への影響が検出できる場合と、検出できない場合とを想定していたが、IA task を行わなくとも、本研究では GluR2 の発現に影響がみられた。しかし、本実験により AMPA 受容体への影響がよりダイナミックになる可能性を考え、IA task 成立後の経産 (N=5、LE 系、産後 5 週齢かつ生後 16 週齢) 未経産ラット N=5、LE 系、生後 16 週齢) の海馬サンプルを用いて、生化学的解析を行う。ウェスタンブロット法にて、pGluR1 (831, 845) および GluR2 の発現を確認した。

## 4. 研究成果

経産ラットは、未経産ラットと比較して、AMPA 受容体サブユニット GluR2 の発現が多く、AMPA 受容体を多く移行させることを、海馬 CA1 の単一細胞におけるパッチクランプ法 (図 1) およびウェスタンブロット法を用いて明らかにしている



(図 2)。また、未経産ラットでは飽和状態となった海馬での電気刺激によって、経産ラットでは LTP を誘導することが出来た (図 3、4)。その詳細なメカニズム



を明らかにするために、iTRAQ法 (Ross et al., 2004) を用いて海馬内タンパク質の存在量を網羅的に比較したところ、14-3-3protein が、未経産ラットと比較し経産ラット海馬内で有意に増加していることが分った。受動的回避学習成立後の海馬サンプルをウェスタンブロット法にて、pGluR1 (831,845) および GluR2 の発現を確認したが、未経産ラットと比較して経産ラットで有意な発現の違いはみられなかった。

#### 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 7件)

Furuta M, Ninomiya-Baba M, Chiba S, Funabashi T, Akema T, Kunugi H.  
Exposure to social defeat stress in adolescence improves the working memory and anxiety-like behavior of adult female rats with intrauterine growth restriction, independently of hippocampal neurogenesis. *Hormones and Behavior* 2015; 70(1): 30-37. (査読有)

Fukushima A, Ogura Y, Furuta M, Kakehashi C, Funabashi T, Akema T.  
Ketogenic diet does not impair spatial ability controlled by the hippocampus in male rats. *Brain Res.* 2015; S0006-8993 (15) 00487-4. (査読有)

Fukushima A, Hagiwara H, Fujioka H, Kimura F, Akema T, Funabashi T.  
Sex differences in feeding behavior in rats: the relationship with neuronal activation in the hypothalamus. *Front Neurosci.* 2015; 9:88. Review. (査読有)

Tada H, Koide M, Ara W, Shibata Y, Funabashi T, Suyama K, Goto T, Takahashi T.  
Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic AMPA Receptors in Rats. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0131359. (査読有)

Furuta M, Numakawa T, Chiba S, Ninomiya M, Kajiyama Y, Adachi N, Akema T, Kunugi H.

Estrogen, predominantly via estrogen receptor  $\alpha$ , attenuates postpartum-induced anxiety- and depression-like behaviors in female rats. *Endocrinology* 2013; 154: 3807-3816. (査読有)

Fukushima A, Furuta M, Kimura F, Akema T, Funabashi T.  
Testosterone exposure during the critical period decreases corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of female rats. *Neuroscience Letters* 2013; 534: 64-68. (査読有)

Tada H, Kuroki Y, Funabashi T, Kamiya Y, Goto T, Suyama K, Sano A, Mitsushima D, Etgen AM, Takahashi T.  
Phasic synaptic incorporation of GluR2-lacking AMPA receptors at gonadotropin-releasing hormone neurons is involved in the generation of the luteinizing hormone surge in female rats. *Neuroscience.* 2013; 248: 664-669. (査読有)

[学会発表](計 7件)

古田 都、福島 篤、明間 立雄、舩橋 利也、雌性ラットの幼弱期ニコチン投与ならびに母性行動が成体期の母性行動および空間学習に及ぼす影響、第93回日本生理学会大会、2016年3月23日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)

古田 都、福島 篤、舩橋 利也、明間 立雄、妊娠、出産、子育て経験後の学習機能の向上と AMPA 受容体サブユニットの構成の変化、第42回日本神経内分泌学会学術集会、第23回日本行動神経内分泌研究会、2015年9月18日、仙台市戦災復興記念館(宮城県、仙台市)

研究者番号：20450611

古田 都、福島 篤、舩橋 利也、明間立雄、妊娠-出産-子育て後の海馬の神経可塑性と空間学習への影響、第38回日本神経科学会、2015年7月29日、神戸コンベンションセンター（兵庫県、神戸市）

(2)研究分担者

福島 篤 (FUKUSHIMA, Atsushi)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10442716

古田 都、福島 篤、舩橋利也、明間立雄。妊娠-出産-子育ては海馬の神経可塑性に影響し、空間学習を向上させる、シンポジウム、第92回日本生理学会大会、2015年3月22日、神戸コンベンションセンター（兵庫県、神戸市）

(3)連携研究者

舩橋 利也 (FUNABASHI, Toshiya)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70229102

古田 都、福島 篤、舩橋利也、明間立雄、妊娠、出産、子育て後の学習機能の向上-AMPA受容体サブユニットに着目して、第41回日本神経内分泌学会学術集会、2014年11月1日、都道府県会館（東京都、千代田区）

古田 都、福島 篤、掛橋千彰、舩橋利也、明間立雄、妊娠-出産-子育てが海馬の神経可塑性に影響する、第37回日本神経科学会、2014年9月12日、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

Kubota T, Furuta M, Fukushima A, Kakehashi C, Funabashi T, Akema T, Fasting decreases tuberoinfundibular dopaminergic neurons and induces PRL secretion. The 43<sup>rd</sup> Society of Neuroscience, 2013年11月、Sandiego (U.S.A)

〔図書〕(計 1件)

古田 都  
第5章 視覚・ラットの行動解析ハンドブック高瀬堅吉・柳井修一・山口哲生監訳，西村書店，東京，2015 1: 41-48. (査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷 都 (NAGATANI, Miyako)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授