

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04189

研究課題名(和文) 幼年期のストレスによる記憶・学習障害と亜鉛の抗酸化作用に関する研究

研究課題名(英文) Studies on antioxidant action of zinc in memory and learning disorders due to early-life stress

研究代表者

東 超 (AZUMA, CHO)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：90326322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：早期母子分離のストレス負荷における亜鉛とセレン抗酸化作用を明らかにするために、早期母子分離群と対照群のマウスを作成し、生後13週で海馬の亜鉛、セレン、血清の酸化損傷マーカーであるカルボニル化蛋白と8-OHdG量を測定した。その結果：1. 早期母子分離群に海馬のセレン含量が有意に低下したことが分かった。しかし、両群の海馬の亜鉛、銅とマンガン含量は有意差が認められなかった。2. 早期母子分離群に血清のカルボニル化蛋白と8-OHdG量が有意な上昇が認められなかった。以上の結果から早期母子分離により海馬のセレン含量に影響を与えるが、海馬の亜鉛、銅、マンガン含量に有意な影響を与えていないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of antioxidant action of zinc and selenium in the early-life stress of maternal separation, the mouse pups in the maternal separation group and control group were prepared. The hippocampal selenium and zinc contents, serum protein carbonyl and 8-OHdG concentration were analyzed in 13 postnatal weeks.

It was found that the hippocampal selenium content was extremely significantly decreased in the maternal separation group compared with the control group. However, no significant differences were found in the hippocampal zinc, copper, and manganese contents between the maternal separation and control groups. Whereas the serum carbonylation protein and 8-OHdG concentration were not increased significantly in the maternal separation.

These results suggest that the maternal separation may affect the hippocampal selenium content, but does not affect other mineral contents, such as zinc, copper, and manganese in the hippocampi.

研究分野：ミネラルと組織・器官の加齢変化、機能、疾患との関わりについての研究

キーワード：早期母子分離 海馬 亜鉛 セレン

### 1. 研究開始当初の背景

現代社会における家族構成の変化は、親子関係、特に母子関係中心とした社会環境に大きな影響を与えており、幼年期の養育放棄や虐待などのストレスは、成人が患う多くの精神疾患の最高レベルの危険因子であるとも言われている。

近年、病気の発生機序として酸化ストレスによる細胞障害が注目されてきている。また、酸化する仕組みは活性酸素( $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ など)と深く関わっている。一方、亜鉛(Zn)、セレン(Se)、銅(Cu)、マンガン(Mn)など微量元素は活性酸素を無害化する抗酸化酵素(SOD, GPx, CAT)の活性に関与し、抗酸化酵素の構造形成・維持に必要な元素である(図1)。近年の微量元素と記憶・学習との相関関係に関する報告では、母マウスの亜鉛補充により子マウスの空間記憶を向上させることが報告されている(A. Piechal et al., Trace Elem Res. 147:299-308, 2012)。しかし、母子分離ストレス負荷と海馬の亜鉛などの微量元素や DNA・蛋白・脂質の過酸化物との相関については未だ検討なされていない。

そこで、本研究では、海馬に亜鉛が濃縮していることと、亜鉛欠乏による記憶・学習障害に注目する。そして、マウスの海馬の亜鉛及び DNA・蛋白・脂質の過酸化物と母子分離ストレス負荷による発達期および成長後の記憶・学習能力との関係について検討する。さらに、母子分離ストレスが記憶・学習能力に影響する因子とそのメカニズムを明らかにし、母マウス妊娠中と子マウスに硫酸亜鉛を投与することによって記憶・学習能力への影響を調査し、幼年期の記憶・学習障害の治療法について検討する。

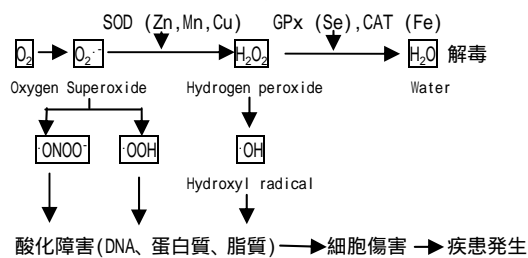


図 1. 抗酸化酵素(GPx, SOD, CAT)と微量元素(Se, Zn, Mn, Cu)の役割

### 2. 研究の目的

幼年期の養育放棄や虐待などのストレスが海馬と深く関係し、記憶・学習に対して長期的な影響を与えることが分かってきた。しかし、幼年期の一過性のストレスが生涯にわたって記憶・学習能力に影響及ぼす分子基盤は十分には明らかにされていない。そこで本研究では、抗酸化作用のある亜鉛が海馬に濃縮されていることと、亜鉛欠乏による記憶・学習障害に注目する。母子分離ストレス負荷モデルマウスを用い、幼年期のストレス負荷によって、発達期及び成長後の記憶・学習能力への影響度や海馬の亜鉛含量および血中

の DNA・蛋白・脂質の過酸化物との関係を明らかにする。

これによって、幼年期の記憶・学習能力に亜鉛の抗酸化作用がどのような関わりを持っているか、さらに、母マウスと子マウスに亜鉛を投与し、記憶・学習能力への影響を調査し、幼年期の記憶・学習障害の治療法について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1)幼少期ストレス負荷マウスの作成

本研究では、早期母子分離群と対照群に分けて以下の実験を行う。

早期母子分離群の作成：生後 2 日～14 日、3 時間/日の母子分離を行う。

対照群の作成：離乳まで母子分離せずにホームケージで飼育する。

2 群とも生後 22 日で離乳し、雄雌を分けて 4 匹毎をホームケージで飼育する。

#### (2)海馬の亜鉛、セレン、銅、マンガン含量および血中 DNA、蛋白質の酸化マーカーの測定

生後 13 週において海馬と血液を採取する。

海馬の亜鉛、セレン、銅、マンガン、カルシウム含量の測定：海馬は蒸留水で十分洗浄し、100℃、3 時間で乾燥後、秤量する。乾燥した海馬を 60%硝酸で 24 時間灰化し、超純水で希釈し、灰化物を誘導結合プラズマ質量分析装置(島津製 ICPM-8500)により、海馬の亜鉛、セレン、銅、マンガン、カルシウム含量を測定する。

血中 DNA、蛋白質の酸化マーカーの測定：ELISA 法で DNA 酸化マーカーである血清 8-OHdG と蛋白質酸化マーカーである血清カルボニル化蛋白を測定する。

#### (3)相関の分析

早期母子分離のストレス負荷マウスの海馬の亜鉛、セレン、銅、マンガン、カルシウム含量と DNA、蛋白の過酸化物との関係を分析し、早期母子分離のストレスは海馬の亜鉛、セレン、銅、マンガン、カルシウムの抗酸化作用との関係があるか否かを調べる。

### 4. 研究成果

#### (1)研究の主な成果

海馬の亜鉛含量の比較：分離群の平均 Zn 含量は 39.27  $\mu g/g$  であり、対照群の平均 Zn 含量は 38.18  $\mu g/g$  であった。両組の有意差が認められなかった( $p = 0.6843$ )。

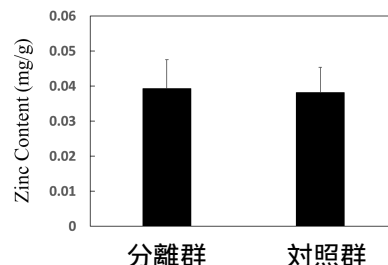


図 2. 分離群と対照群の海馬の Zn 含量

海馬のセレン含量の比較：分離群の平均 Se 含量は 0.1043  $\mu\text{g/g}$  であり、対照群の平均 Se 含量は 0.3034  $\mu\text{g/g}$  であった。対照群は分離群より三倍近い高かった。両組の有意差が認められた ( $p < 0.0001$ )。

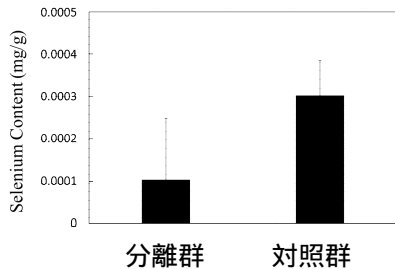


図 3. 分離群と対照群の海馬の Se 含量

海馬の銅含量の比較：分離群の平均 Cu 含量は 16.20  $\mu\text{g/g}$  であり、対照群の平均 Cu 含量は 17.38  $\mu\text{g/g}$  であった。両群間に有意差が認められなかった ( $p = 0.1510$ )。

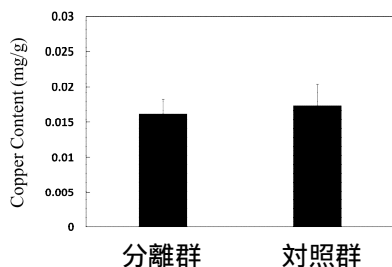


図 4. 分離群と対照群の海馬の Cu 含量

海馬のマンガン含量の比較：分離群の平均 Mn 含量は 1.913  $\mu\text{g/g}$  であり、対照群の平均 Mn 含量は 1.796  $\mu\text{g/g}$  であった。両群間に有意差が認められなかった ( $p = 0.1642$ )。

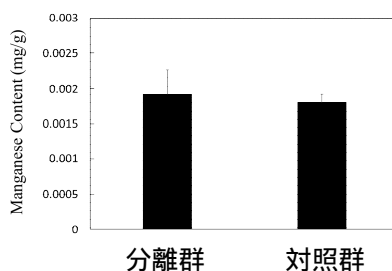


図 5. 分離群と対照群の海馬の Mn 含量

海馬のカルシウム含量の比較：分離群の平均 Ca 含量は 3.781 mg/g であり、対照群の平均 Ca 含量は 1.636 mg/g であった。両群間に有意差が認められなかった ( $p = 0.4230$ )。

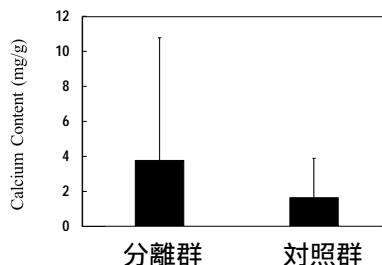


図 6. 分離群と対照群の海馬の Ca 含量

血清のカルボニル化蛋白濃度の比較：分離群の平均カルボニル化蛋白濃度は 0.01032 nmol/mg であり、対照群の平均カルボニル化蛋白濃度は 0.001496 nmol/mg であった。分離群は対照群より 6 倍以上高かった。しかし、有意差が認められなかった ( $p = 0.4809$ )。

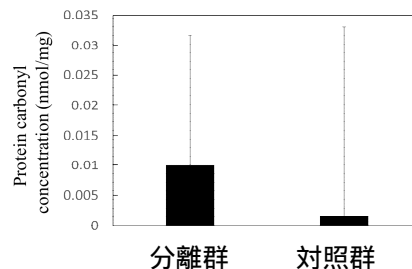


図 7. 分離群と対照群の血清のカルボニル化蛋白濃度

血清の 8-OHdG 濃度の比較：分離群の平均 8-OHdG 濃度は 0.1993 ng/ml であり、対照群の平均 8-OHdG 濃度は 0.1665 ng/ml であった。分離群は対照群より高かった。しかし、有意差が認められなかった ( $p = 0.3889$ )。

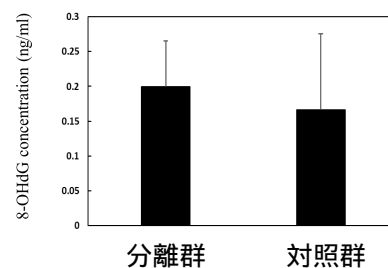


図 8. 分離群と対照群の血清の 8-OHdG 濃度

まとめ：対照群の海馬の平均セレン含量は早期母子分離群より三倍近い高かった。両群の海馬の平均セレン含量はきわめて有意な差が認められた。しかし、海馬の亜鉛、銅およびマンガン平均含量は有意差が認められなかった。2. 早期母子分離のストレス負荷により血清のカルボニル化蛋白と 8-OHdG 濃度が上昇したが、両群の血清のカルボニル化蛋白と 8-OHdG 濃度は有意差が認められなかった。3. 早期母子分離群の海馬カルシウム含量は対照群より 2 倍以上高かった。しかし、両群の海馬のカルシウム含量は有意差が認められなかった。以上の結果から早期母子分離のストレス負荷により海馬のセレン含量に影響を与えるが、海馬の亜鉛、銅、マンガンおよびカルシウム含量に有意な影響を与えていないことが分かった。

(2) 得られた成果のご国内外における位置づけとインパクト

近年のセレンと記憶・学習障害との相関関係に関する報告では、セレンは GPx 活性などを介して SCOP 誘発性認知症の老齢ラットにおける血液および脳の酸化ストレスを弱めることが報告されている (Metab Brain Dis

32:321-329, 2017)、アルツハイマー病モデルマウスのセレン補充により大脳の抗酸化酵素(GPx, TrxR)が増加し、過酸化脂質(MDA)が低下する (Sci Rep. 2016 Dec 23;6:39290. doi: 10.1038/srep 39290)。また、高度アルツハイマー型認知症患者における赤血球のセレン含量が低下することも報告されている(Biol Trace Elem Res. 2017 May 13. doi: 10.1007/s12011-017 -1042-y)。しかし、母子分離ストレス負荷による記憶・学習障害と海馬のセレン含量、海馬の抗酸化酵素(GPx)の活性、および DNA・蛋白・脂質の過酸化物との相関については未だ検討なされていない。

本研究によって、早期母子分離のストレス負荷により海馬のセレン含量が有意に減少したことが分かった。セレンは活性酸素を無害化する抗酸化酵素(GPx)の活性に関与する。活性酸素( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  など)は過剰に生じるとタンパク質・脂質・核酸などを酸化し、さまざまな障害を引き起こす原因になる。抗酸化酵素(GPx)は活性酸素を無害化する作用があり、セレンは GPx の活性に関与し、疾患発生の抑制と関わりがあると考えられる。また、幼年期の養育放棄や虐待などのストレスが海馬と深く関係し、記憶・学習に対して長期的な影響を与えることが分かってきた。すなわち、海馬の微量元素(セレン)減少は幼年期の一過性のストレスが生涯にわたって記憶・学習障害の発生、進展に影響する可能になる。以上を踏まえて、本研究は記憶・学習障害の原因究明が可能になり、幼年期および成長後の記憶・学習障害の治療法の開発に結びつけることも可能であり、医学・生物学に与えるインパクトは大きいものと確信する。

### (3)今後の展望

今後の研究計画では、亜セレン酸ナトリウム投与によって記憶・学習能力への影響を分析し、発達期および成長後の記憶・学習障害に対する治療法の開発を目指す。

幼年期のストレス負荷により発達期及び成長後の記憶・学習能力とセレン含量および蛋白・脂質の酸化との関係をさらに明らかにする。

早期母子分離群と対照群のモデルマウスを作成し、生後 13 週でマウスの海馬と血液を採取し、血清の脂質酸化マーカーであるマロンジアルデヒド(MDA)、海馬の活性中心にセレンを有する抗酸化酵素である GPx の測定を行う。

セレンの投与による記憶・学習障害の改善に対する治療の試み

現在までの実験結果、早期母子分離のストレス負荷により抗酸化作用を有する微量元素であるセレン、亜鉛、銅、マンガンの 4 元素のうち、海馬のセレン含量のみが有意に低下したことが分かった。これからセレンを投与することによって記憶・学習能力への影響

を分析し、幼年期の記憶・学習障害に対する治療法の開発を目指す。

亜セレン酸ナトリウム投与量によって 3 群(正常、欠乏、および過剰)にわけて以下の実験を進め、各群間の比較検討を行う。早期母子分離マウスモデルを作成し、母マウス出産 3 週間前から子マウス行動実験まで亜セレン酸ナトリウムを投与する。生後 13 週において恐怖条件付け試験の記憶・学習の行動実験を行い、さらに海馬と血液を採取し、海馬のセレン含量、血清 8-OHdG 濃度、血清マロンジアルデヒド濃度、血清カルボニル化蛋白濃度、海馬の GPx 活性を測定する。以上の試験結果から亜セレン酸ナトリウムの投与によって記憶・学習能力の改善、海馬のセレン含量と GPx 活性の上昇、血清の DNA・蛋白質・脂質の酸化マーカーの減少があるか否かを調べる。

### 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Cho Azuma, Takeshi Minami, Mayumi Nishi, Mineral changes in mouse hippocampus after maternal separation. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018 年 3 月 28~30 日、日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)

Cho Azuma, Takeshi Minami, Mayumi Nish, Trace element changes in mouse hippocampus after maternal separation. 5th International Conference on Nutrition and Growth, 1-3 March 2018, Paris (France)

Cho Azuma, Takayo Sasagawa, Takeshi Minami, Mayumi Nishi, Quantitative changes of hippocampal selenium and plasma protein carbonyl in mice after maternal separation. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年 3 月 28~30 日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市)

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

東 超(AZUMA CHO)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師  
研究者番号: 90326322

#### (2)研究分担者

西 真弓(NISHI MAYUMI)

奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40295639