

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09715

研究課題名(和文) 早産児相当の脳発達段階における母子分離が児の神経回路網形成に与える影響

研究課題名(英文) The Influences of maternal separation on neural circuit formation during brain development equivalent to preterm infants in human

研究代表者

太田 健一(OHTA, Ken-ichi)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50403720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト早産児相当の脳発達期における母子分離の影響について、ラットを用いた母子分離モデルで検討を行った。母子分離された仔では成熟後の社会的認知能力の低下が見られ、攻撃性が増加していた。更にこれらに関連の深い扁桃体及び内側前頭前皮質の興奮/抑制バランスを解析すると、抑制性シナプスに関連する因子が低下していることが明らかとなった。このような母子分離による興奮/抑制バランスの不均衡が、内側前頭前皮質や扁桃体の正常機能を狂わせることで過剰な攻撃性や社会性の異常を引き起こしたと考えられる。またこのような母子分離の影響は不可逆的なものではなく、その後の養育環境によって回復する事も示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the influences of maternal separation (MS) during brain development equivalent to preterm infants in human using rat model. Our results showed that MS during brain development increased aggressive behavior and reduced the behavior related to social recognition after maturation. In addition, we found that reduction of various factors (VGAT, Neuroligin-2) related to inhibitory synapse in the amygdala and the medial prefrontal cortex of mature rat exposed to MS. Excitatory/inhibitory imbalance disrupts normal function in these regions, which leads to cause excessive aggression and abnormality of sociability. Our study also revealed these influences of MS are not irreversible, but rather can be recovered depending on nurturing environment after MS.

研究分野：発達神経科学

キーワード：母子分離 扁桃体 内側前頭前皮質 興奮/抑制バランス 攻撃性 社会性

1. 研究開始当初の背景

周産期医療・生殖補助医療の発展等を背景に日本における早産児の出生率は増加傾向にある。早産児では高次機能障害の発生率が高い事が危惧されているが、その分子機序は未だに明らかとなっていない。我々はこの一因として、母子間の身体的接触と脳発達の関係性に注目している。早産児は新生児集中治療室: NICU にて母親と分離された状態で保育器内での厳密な体調管理がなされているが、母親との身体的接触は児のストレス・不安を緩和し予後を改善することが報告されている。ヒトの脳発達から考えても、早産児に相当する妊娠 28 週齢～出生までは樹状突起伸長やシナプス形成等の神経回路網形成の臨界期に相当し、高次機能獲得に重要で感受性の高い時期である。実験動物を用いた研究においてもこの時期の母子間接触の重要性が指摘されており、この時期の母子分離は仔の成熟後の記憶・学習能力の低下や抑うつなどに関連した様々な行動異常を引き起こす事が報告されている。我々は近年ラットを用いた実験で母子分離がヒト早産児相当の脳発達期に相当する時期に神経回路網形成に密接に関連している脳由来神経栄養因子 (BDNF) 及びその下流シグナルが海馬、扁桃体および内側前頭前皮質で一過性に低下していることを見出した。このような時期の一過性の影響が原因となって成熟後の様々な高次機能に影響を与えていることが予測されるが、関連する脳領域がどのように変化するのか、あるいはそれがどのような高次機能の異常へと繋がるかについては未だに知見に乏しい。

2. 研究の目的

上記のような背景とこれまでの当研究室での結果から、本研究では早産児相当の脳発達段階での母子分離が様々な脳部位の神経回路網形成に影響を与え、それが高次機能に影響を与える可能性が極めて高いと考えられる。そのため「早産児相当脳発達時期の母子分離は正常な神経回路網形成を阻害し、それが高次機能の異常へと繋がる」という仮説の下に発達期の母子分離が成熟後の高次機能とその関連脳領域をどう変化させるかについて明らかにするために解析を行った。このような研究はヒトを用いた臨床研究では得がたい早産児における潜在的な脳発達リスクとその機序解明へと繋がるものである。

3. 研究の方法

(1) 母子分離動物の作製

Sprague-Dawley ラットを用い、当研究室で既に確立した母子分離方法にてモデル動物の作製を行った (Int J Dev Neurosci. 2014; 33: 15-21)。具体的には生後 1 日に雄 4 匹、雌 4 匹に間引きした後、ヒト早産児の脳発達期間を含む生後 2-20 日まで仔を母獣から個

別に分離した(3 時間×2 回/日: 9:00-12:00, 13:00-16:00、MD 群: Maternal deprivation group)。対照群は間引き後、母獣と共に通常飼育した(Mother reared control group: MRC 群)。生後 21 日で離乳し、雄のみを 2 匹/ケージで通常飼育し、8~9 週齢で各実験に用いた。本実験はすべて香川大学動物実験委員会の許可を得て、香川大学動物実験規則に従って行われた。

(2) 成熟後の各行動解析

8~9 週齢の各群を用いて以下の社会性・攻撃性に関連した行動解析を行った。

Resident-intruder paradigm test

W35cm×D50cm×H30cm の飼育ケージに各群を単独で 3 日間飼育し慣らした。その後初見で 1 週齢若く小さめのラットを入れて 10 分間のケージ内での行動 (主に攻撃行動) を解析した。この試験は自分の領域内に入ってきた侵入者に対する攻撃性を評価するものである。

Social interaction test

W40cm×D60cm×H30cm の容器に各群ラットを入れた後に初見でかつ同週齢のラットを入れ、臭い嗅ぎ行動等の接触時間を 10 分間で解析した。見知らぬ同種の生体に対する社会的な行動を評価するものである。

Social preference test

W30cm×D50cm×H40cm の各チャンバーが行き来できる形で 3 つ繋がった容器を用いて行った。片側に初見で同週齢のラットを入れたシリンダーを置き、反対側にぬいぐるみの入ったシリンダーを入れて各々のシリンダーへの接触時間を 10 分間測定した。同種の生体と物体に対する反応の差を測定することで、社会行動を評価するものである。

3-chamber sociability and social novelty test

と同様の容器を用いて行った。1 回目は何も無い容器内で 10 分間自由に行動させて慣らした。2 回目は片側に初見で同週齢のラットを入れたシリンダーを置き、反対側に空のシリンダーを置いて各々への接触時間を 10 分間測定した。これはと同じく初見のラットに対する社会的な接触を評価するものである。3 回目は空だったシリンダーに新たに初見で同週齢のラットを追加し、各々への接触時間を 10 分間測定した。これは 2 回目で既に接触したラットと新たに置かれたラットをそれぞれ認識して社会行動を行うかどうかを評価するもので、通常は各々を認識して区別し既に接触したラットよりも初見のラットへの社会的な接触を試みる。

(3) 各脳領域における興奮/抑制性シナプス関連蛋白質の発現量解析

8~9 週齢の各群から様々な脳領域を採取し、超遠心と Triton X-100 に対する溶解性を利用してシナプトソーム画分およびシナ

プトソーム膜画分を回収し、各々の蛋白質が集積する画分を用いてウェスタンブロットにて興奮性シナプス及び抑制性シナプスに関連した蛋白質の発現を比較した。

(4) 関連脳領域の抑制性シナプス評価

8~9 週齢の各群を 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、脳を採取して凍結切片を作製した。(3)におけるウェスタンブロットの結果から、扁桃体及び内側前頭前皮質の抑制シナプス関連蛋白質が特に減少していることが示唆されたため、抑制ニューロンの前シナプスのマーカーである vesicular GABA transporter (VGAT) と抑制シナプスの接着因子であり後シナプスマーカーである neuroligin-2 (NLGN-2) の抗体を用いて免疫組織染色を行って陽性斑を解析ソフト (MetaMorph) を用いて測定した。

(5) 攻撃行動時の扁桃体活性解析

行動解析と組織解析の結果から、MD 群の過剰な攻撃性は扁桃体の興奮/抑制バランス崩壊が原因であることが考えられた。そこで 8~9 週齢の各群を用いて攻撃行動試験を行い 1 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定して脳を採取し、c-fos に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。攻撃行動試験時に活性化した細胞数を c-fos 陽性細胞数を測定することで評価した。

4. 研究成果

(1) 行動解析

Resident-intruder paradigm test において MD 群は MRC 群よりも攻撃性が高いことが見出された (Fig. 1A)。更に興味深い事に、MD 群では MRC 群ではほとんど見られない飛び跳ね行動が有意に見られた (Fig. 1B)。立ち上がり回数増加などの活動量が増大していたこととあわせて過剰な興奮状態になっていると考えられる。

また社会性に関しては、Social interaction test、Social preference test 及び 3-chamber sociability and social novelty test の 2 回目の試験では両群に変化は認められず、少なくともこのような試験で解析できる単純な社会行動には差がないことが示された。一方で 3-chamber sociability and social novelty test の 3 回目の試験で MRC 群は既に接触したラット (Familiar rat) よりも新たに置かれたラット (Novel rat) の周囲に滞在する時間が長く臭い嗅ぎ等で接触を試みる社会行動が多いのに対して、MD 群は両者を区別して接近・接触を試みる時間の比率が MRC 群と比較して有意に低かった (Fig. 2)。これは MD 群の社会的認知能力が低下している事を示唆する結果である。

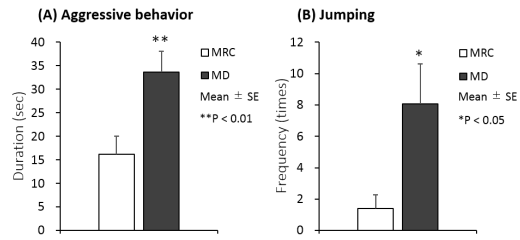


Fig. 1: Resident-intruder paradigm test の結果
MD 群では MRC 群に比べ、攻撃性が高く飛び上がり回数も有意に多い (n = 12)。

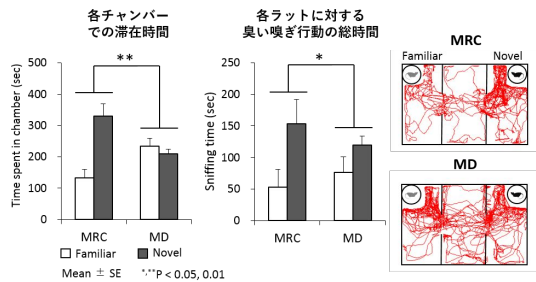


Fig. 2: 3-chamber sociability and social novelty test (3 回目の試験) の結果

MRC 群は既に知っているラットと初見のラットを識別して初見ラットへ多く接触しようとするのに対して、MD 群では初見のラットへの接触時間の比率が MRC 群に比べて有意に低下していた (n = 14)。

(2) 各脳領域における興奮/抑制性シナプス関連の蛋白質発現

MD 群では興奮性シナプスに関連した蛋白質 (vesicular glutamate transporter 1/2, postsynaptic density 95, neuroligin-1, NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット 2A/2B) の発現には顕著な変化は認められなかった。一方で抑制性シナプスに関連した蛋白質 (VGAT, NLGN-2) は扁桃体 (Fig. 3A) と内側前頭前皮質 (Fig. 3B) で有意に減少していた。またその他の抑制性ニューロン (Glutamate decarboxylase 65) およびシナプスに関連する蛋白質の発現 (Glutamate decarboxylase 67, Gephyrin) についても有意に減少が認められた。

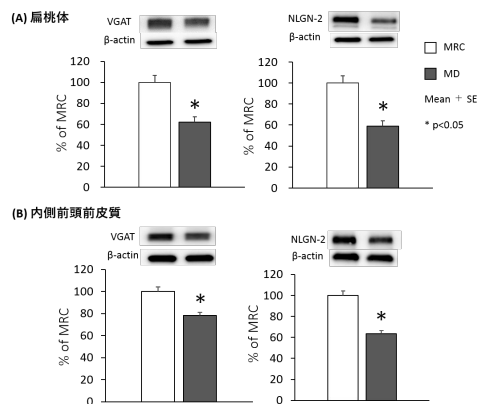


Fig. 3: 抑制性シナプス関連蛋白質の発現
MD 群では扁桃体 (A) 及び内側前頭前皮質 (B) で VGAT と NLGN-2 が有意に低下していた (n = 6-8)。

(3) 扁桃体及び内側前頭前皮質における抑制性シナプスの組織学的解析

蛋白質発現量の解析結果から更に詳しく免疫組織染色で VGAT 及び NLGN-2 の解析を行った。扁桃体では基底外側核、中心核、内側核について各陽性斑をカウントしたところ、MD 群で中心核と内側核の NLGN-2 陽性斑が有意に減少していた (Fig.4)。

一方、内側前頭前皮質では Prelimbic cortex と Infralimbic cortex (IL) に分けてそれぞれ 2-3 層と 5 層を中心に解析を行った。全体的に VGAT あるいは NLGN-2 が減少していることが示されたが、特に IL の 2-3 層で VGAT 及び NLGN-2 の陽性斑が有意に減少していた (Fig.5)。

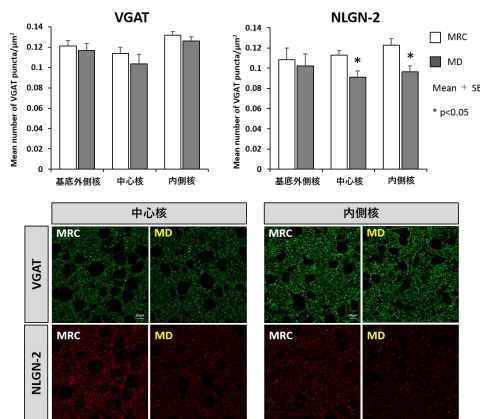


Fig.4: 扁桃体での抑制性シナプスマーカー発現

MD 群では扁桃体中心核および内側核における NLGN-2 陽性斑が有意に減少していた (n = 8)

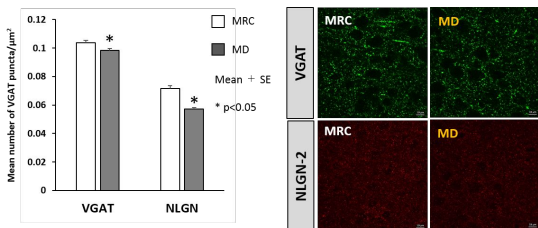


Fig.5: Infralimbic cortex (2-3 層) での抑制性シナプスマーカー発現

MD 群では Infralimbic cortex 2-3 層における VGAT および NLGN-2 陽性斑が有意に減少していた (n = 7)

(4) 攻撃行動時における扁桃体活性

MD 群では、扁桃体中心核において攻撃行動試験後の c-fos 陽性細胞数が有意に増加していた (Fig.6)。これは攻撃行動に応じて活性化された細胞が多いことを示すものである。

扁桃体中心核は視床下部や中心灰白質などに投射する出力核であり、他の垂核と比べて暴力的な攻撃性を有する動物モデルで過剰な活性を示すことが報告されている。そのため、本研究の MD 群でもこの中心核の過剰な活性状態が過度な攻撃性へと繋がったと考えられる。

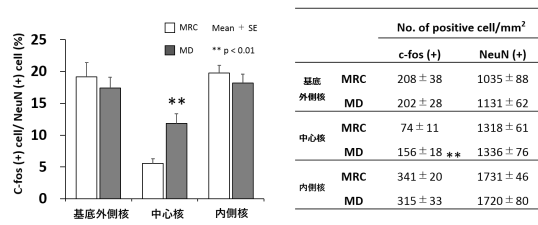
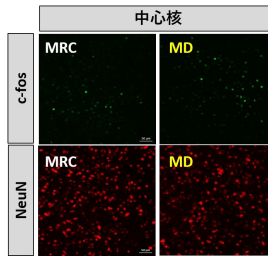


Fig.6: 攻撃行動試験時の扁桃体の活性状態

MD 群では攻撃行動試験後の扁桃体中心核で c-fos 陽性細胞数が増加していた。



(5) 総括

本研究では、発達期に母子分離された仔で成熟後の社会認知能力が低下していることが示唆された。3-chamber sociability and social novelty test で行った試験で両方を物体に置き換えた場合は臭い嗅ぎ行動自体の時間が極端に短く両群に有意差は見られない。またこの試験に参与してくる作業記憶にも差は無いことを確認しており、本研究で MD 群に見られた差は単なる興味の違いや記憶による差ではなく、生体に対する社会的な反応の差であると考えられる。社会的認知能力は他者を認識し理解する能力であり、ヒトにおいてはより複雑に他者の認知、行動・感情予測に繋がる重要なものである。更に MD 群では過剰な攻撃性も認められており、社会的認知能力の低下とあわせて社会生活を行っていく上で不利となる情動の異常が母子分離によって引き起こされることが示唆された。

このような行動異常を引き起こした原因として、今回我々は MD 群で扁桃体及び内側前頭前皮質の興奮/抑制バランスが崩れていることを見出した。特に抑制性シナプスの接着因子である NLGN-2 の低下は顕著であり、このような抑制性シナプスの減少あるいは機能低下が今回見られたような情動異常へと繋がったと考えられる。更に本研究で見られた MD 群の扁桃体中心核の過剰な活性状態は興奮/抑制バランスの不均衡に起因し、それが過剰な攻撃性の発現へと繋がったと考えられる。内側前頭前皮質と各行動との詳しい関係についてはまだ検討中であるが、この部位における抑制性シナプスの機能低下は社会性に重要であることが指摘されており、コンディショナルノックアウトマウスを用いた研究でこの部位の NLGN-2 が社会行動に強く関与することが報告されている。故に本研究で見られた MD 群における社会的認知能力の異常も、内側前頭前皮質の抑制性シナプスの減少あるいは機能低下に起因している可能性が高い。

我々は既に本研究の母子分離中でも特に

ヒトの早産児に相当する脳発達期のみには海馬で BDNF やその下流シグナルが低下していることを報告している。このような母子分離の影響は海馬と同様に扁桃体や内側前頭前皮質でも同じ脳発達時期で確認されており、母子分離による一過性の神経回路形成に関わる因子の低下が成熟後の記憶・学習能力や社会性、攻撃性の異常を引き起こしたと考えられる。しかしながらこのヒト早産児相当の時期に受けた母子分離の影響は必ずしも恒久的なものではない。実際に我々は本研究で用いた母子分離期間(生後 2-20 日)に加えて、よりヒト早産児相当の脳発達期に絞った母子分離期間(生後 2-10 日)で、成熟後にいくつかの空間記憶学習の解析をおこなったが有意差は認められなかった。また更に本研究で用いた母子分離期間(生後 2-20 日)に加えて、離乳後に豊かな環境(右図)に曝露した群を解析したところ、MD 群で低下していた社会認知能がある程度回復することを見出している。このような結果は、早産児相当の脳発達期は確かに母子分離の影響を受けやすく脆弱な時期であるが必ずしもその影響は恒久的なものではなく、むしろその後の環境あるいは発達ケアが重要でありそれ次第で回復しうるものであることを示唆するものである。



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 3 件)

Adachi N, Suzuki S, Matsuoka H, Fushimi S, Ono J, Ohta KI, Hirai Y, Miki T, Koshimizu H. Corticotropin-releasing hormone-binding protein is up-regulated by brain-derived neurotrophic factor and is secreted in an activity-dependent manner in rat cerebral cortical neurons. *J Neurochem*. 2018 (in press). doi: 10.1111/jnc.14310. (査読有り)

Ohta KI, Suzuki S, Warita K, Kaji T, Kusaka T, Miki T. Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the hippocampus during early brain development. *J Neurochem*. 2017; 141(2): 179-194. doi: 10.1111/jnc.13977. (査読有り)

Suzuki S, Koshimizu H, Adachi N, Matsuoka H, Fushimi S, Ono J, Ohta KI, Miki T. Functional interaction between BDNF and mGluR II in vitro:

BDNF down-regulated mGluR II gene expression and an mGluR II agonist enhanced BDNF-induced BDNF gene expression in rat cerebral cortical neurons. *Peptides*. 2017; 89: 42-49. doi: 10.1016/j.peptides.2017.01.007. (査読有り)

[学会発表](計 5 件)

小澤徹、太田健一、鈴木辰吾、三木崇範。母子分離が破綻させる内側前頭前皮質の興奮/抑制バランス。第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2018 年。
Ken-ichi Ohta, Shingo Suzuki, Takashi Kusaka, Takanori Miki. Long-term effects of early life stress on the balance between neural excitation and inhibition in the rat amygdala. 第 40 回日本神経科学学会。2017 年。

太田健一、鈴木辰吾、天雲千晶、日下隆、三木崇範。脳発達期の母子分離による扁桃体の興奮/抑制バランス崩壊。第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2017 年。

太田健一、鈴木辰吾、日下隆、三木崇範。脳発達早期の母子分離は海馬 CA1 領域における BDNF シグナルと樹状突起スパイン形成に影響を与える。第 5 回日本 DOHaD 研究会学術集会。2016 年。

加地智洋、太田健一、鈴木辰吾、三木崇範。母仔分離ラットにおける BDNF 発現と神経回路網の形成異常。日本解剖学会第 70 回中国・四国支部学術集会。2015 年。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 健一 (OHTA, Ken-ichi)
香川大学・医学部神経機能形態学・助教
研究者番号: 50403720

(2) 研究分担者

鈴木 辰吾 (SUZUKI, Shingo)
香川大学・医学部神経機能形態学・講師
研究者番号: 50451430

(3) 研究分担者

三木 崇範 (MIKI, Takanori)
香川大学・医学部神経機能形態学・教授
研究者番号: 30274294

(4) 研究分担者

割田 克彦 (WARITA, Katsuhiko)
鳥取大学・農学部共同獣医学科基礎獣医学講座・准教授
研究者番号: 40452669

(5) 研究分担者

日下 隆 (KUSAKA, Takashi)
香川大学・医学部小児科・教授

研究者番号：50274288

(6)研究分担者

金西 賢治 (KANENISHI, Kenji)
香川大学・医学部付属病院周産期科女性診療科・准教授
研究者番号：10263906

(7)研究分担者

久保 裕之 (KUBO, Hiroyuki)
香川大学・医学部・協力研究員
研究者番号：30564116