

令和元年5月10日現在

機関番号：33703

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07213

研究課題名(和文) 妊娠期ストレスが仔の脳の脆弱性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of prenatal stress on brain vulnerability in adult offspring

研究代表者

鈴木 あゆみ (Suzuki, Ayumi)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：10804643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において妊娠期ストレスを受けた仔の海馬でGR発現量が対照群に比し有意に減少し、新規拘束ストレスにより視床下部室傍核でCRH発現量が対照群より有意に増加した。一方、妊娠期ストレス中に咀嚼運動をさせた母体から生まれた仔の海馬におけるGR発現量の減少が有意に改善され、室傍核でCRHの発現量の増加が有意に抑えられた。結果から、妊娠期ストレス中に咀嚼運動を行うことで母体のHPA系の活性が低下しGCの分泌が抑えられ、仔へのGCによるプログラミングを防いでいることが示唆された。妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動は仔のストレスへの過敏反応を抑制し、ストレス脆弱脳の形成を防止できる可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咀嚼刺激を与えることで妊娠期ストレスを受けた仔において海馬GRの減少が抑制され、HPA axisの機能不全を最小限に留め、その結果、新規ストレスに対して起こる過敏反応を減弱し、妊娠期ストレスによる子どものストレス脆弱脳形成は軽減することが出来る。つまり、出生前～出生後に至る咀嚼刺激を与えることにより、ストレス脆弱脳の形成を抑制することという新しい学問分野を開拓できる可能性があり、学術的波及効果は極めて大きい。また、妊婦が「咀嚼運動」という日常的な行為を積極的に行うことによって、産まれる子どものストレス脆弱脳形成の予防に有効であることを世界に発信する。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we found that hippocampal glucocorticoid receptor(GR) mRNA expression level was significantly decreased in the prenatal stress mice and hypothalamic corticotropin-releasing hormone(CRH)mRNA expression levels were significantly increased after novel stress exposure. Maternal chewing during prenatal stress exposure attenuated stress-induced decrease in hippocampal GRmRNA expression and increased hypothalamic CRHmRNA expression after novel stress exposure in young adult offspring. Our results demonstrated that maternal chewing during prenatal stress ameliorated stress-induced hippocampal GR expression and hypothalamic CRH expression. These findings suggest that maternal chewing during prenatal stress enhances the negative feedback efficiency of the HPA axis, thereby suppressing the HPA axis in the offspring. Maternal chewing during prenatal stress could be an effective strategy for preventing stress-induced brain vulnerability in the offspring.

研究分野：小児歯科

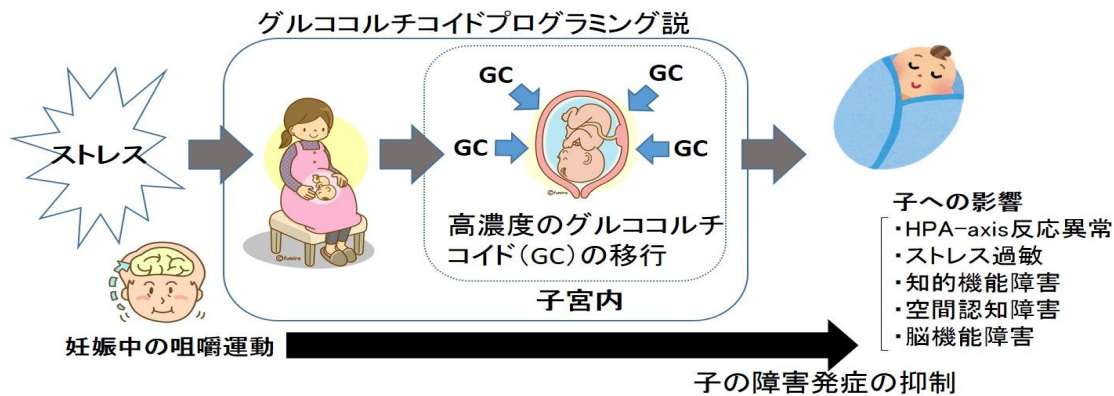
キーワード：妊娠期ストレス 咀嚼運動 海馬 HPA-axis GR 新規急性拘束ストレス PVN ストレス脆弱脳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

出産前の母体の環境が子供においてストレス関連障害の形成に関与していることが多数報告された (Talge NM et al., J Child Psychol Psychiatry. 48:245-61, 2007. Abe H et al., Neurosci Res. 59:145-151, 2007. Gilbert Me et al., Toxicol Sci. 86:365-374, 2005. Lemaire V et al., PNAS. 97:11032-11037, 2000. Wadhwa PD et al., Prog Brain Res. 133:131-142:2001.)。子供の健康や成長発育の観点から妊娠期の母体環境に注目が集まっている。

近年の研究において、妊娠中に強いストレス、或いは弱くても持続的にストレスに暴露された母親から生まれた子供は、脳高次機能回路形成の発達が遅延し、学習・記憶などの胎児性高次脳機能障害が解明された (Weinstock M. Prog Neurobiol. 65:427-51, 2001. Fujita T et al., Nat Med. 7:598-604, 2001. Vogel G. Science. 290:258-9, 2000.)。これは、ストレスを被った母体から胎盤を通じて胎児に移行したGCが原因であるというグルココルチコイドプログラミング説が有力である (Seckl JR and Meaney MJ. Ann NY Acad Sci. 1071:351-378, 2006. Kapoor A et al., Brain Res Rev. 57:586-595, 2008.)。



母体がストレスを受けると、母体から胎児に移行したGCが海馬のGCレセプター (GR) のダウンレギュレーションを引き起こし、海馬 (記憶の司令塔であり、情動調節に不可欠な脳部位) から視床下部へのネガティブフィードバック機構を障害し、仔の視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA-axis) を攪乱し、ストレス脆弱脳が形成される。さらに、仔のHPA-axisが障害されると、仔の脳は新たなストレスに対し視床下部室傍核 (PVN) で過剰な副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) を分泌するようになり、軽度なストレスに対しても過敏な反応を呈するストレス脆弱脳が形成される。したがって、出生仔に新規ストレスを負荷し、そのストレス反応を調べる必要がある。

我々は、母体の妊娠期ストレスによる仔の空間認知機能障害、情動障害及び海馬の神経細胞新生障害が、妊娠期の母体に「ストレス+咀嚼運動」を与えることにより有意に改善されることを明らかにした (Onishi et al., INTECH, 115-132, 2013. Neuroscience. P4-I14, 2011. Neuroscience. P2-k13 & P4-i01, 2012)。この事実は、母体の積極的な咀嚼運動が一代を超えて効果があると示され、咀嚼運動が妊娠期ストレスに起因した仔の脳機能障害の予防医学的対応にきわめて有効であることを示している。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠期ストレス中に咀嚼運動を行わせた母体と咀嚼運動を行わせた母体から生まれた仔の海馬 GR の変化に着目し、母体の咀嚼運動が仔の妊娠ストレス性脳障害を抑制するかどうか、新規ストレス時の視床下部 CRH の変化から仔のストレス脆弱脳形成が抑制されているかどうか、つまり、妊娠期ストレスによって仔のストレス脆弱脳形成が咀嚼運動による影響を検討し、脆弱脳形成の解除機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 妊娠 DDY マウスの飼育

ストレス感受性は個体差が大きいため、実験動物の作成には細心の注意が必要である。朝日大学口腔科学共同研究所・動物飼育施設 CR 室で妊娠 DDY マウスおよび仔マウスの飼育・繁殖を行う。感染予防のため CR 飼育室でマウスを飼育する。

(2) ストレス負荷

ストレス負荷は、我々がこれまで行ってきた (Kubo K et al., Neurosci Lett. 466:109-113, 2009.) いわゆる“拘束ストレス法”を用い妊娠マウスをストレス負荷用チューブに出産までの 1 週間・1 日 3 回・1 回 45 分間の拘束を実施した。

(3) 咀嚼運動刺激

上述のストレス負荷中に木製の爪楊枝を前歯に近づけ、マウス自ら積極的に咀嚼運動を始める。この咀嚼運動の程度はストレス状態が高いほど増強する (Kubo K et al., Neurosci Lett. 466:109-113, 2009.)

(4) グルココルチコイド受容体 (GR) の定量解析

精製プローブを用いて、海馬におけるグルココルチコイド受容体 (GR) mRNA の定量解析を行う。GR は GC の受容体で、海馬に豊富に存在し、海馬から HPA axis へフィードバック機能を行っている (Maccari S et al., Neurosci Biobehav Rev. 27:119-127, 2003.)

(5) 仔の新規ストレス負荷によるストレス過敏反応の解析

仔の HPA axis が障害されると、仔の脳は新たなストレスに対し視床下部室傍核 (PVN) で過剰な副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) を分泌するようになり、軽度なストレスに対しても過敏な反応を呈するストレス脆弱脳が形成される。そのため、出生仔に新規急性拘束ストレスを負荷し、視床下部室傍核における CRH mRNA 発現を in situ hybridization 法を用いて解析した。

(6) データ解析

得られたデータは ANOVA 分析と多重比較分析を用いて統計学的有意性を解析した。

4. 研究成果

グルココルチコイド受容体 (GR) の定量解析

GR の検索には in situ hybridization 法およびリアルタイム PCR 法を用いた。in situ hybridization 法による組織像において、stress 群では GR mRNA の発現量が他の 2 群に比較して少ないように観察された(図 1)。リアルタイム PCR を用いた GR mRNA の発現量は、control 群および stress/chewing 群に比較して、stress 群で有意に低い値を示した($p < 0.01$)。一方、control 群と stress/chewing 群との間に有意な差は認められなかった(図 2)。

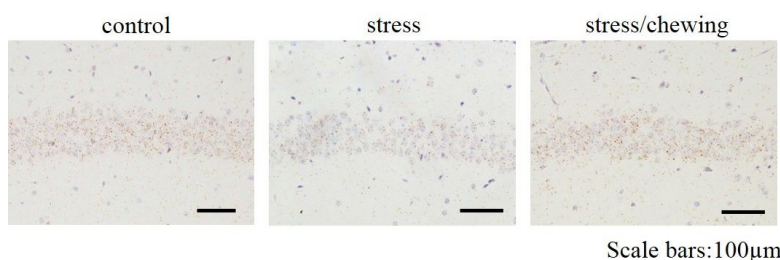


図1 in situ hybridization法による海馬CA1領域のGRmRNA染色像

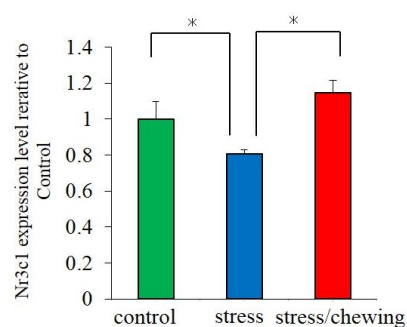


図2 GR mRNA(Nr3c1)の発現量
*: $p < 0.01$, mean \pm SEM

stress 群では海馬の GR 発現量が減少し、その結果海馬から HPA-axis へのネガティブフィードバック機構が十分に働かなくなりストレスに弱い脳が形成されることが示された。一方、積極的な妊娠母体の咀嚼運動は海馬での GR の発現を改善することによって新規ストレスに対する過敏性を和らげ、ストレスに強い脳の形成することが示された。これらの結果から、妊娠期ストレス中の母体の積極的な咀嚼運動が、母体の HPA 系の活性を低下させ GC の分泌が抑えられ、その結果、仔への GC によるプログラミングを防いでいることが示唆された。

(2)仔の新規ストレス負荷によるストレス過敏反応の解析

仔の HPA axis が障害されると、仔の脳は新たなストレスに対し視床下部室傍核 (PVN) で過剰な副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) を分泌するようになり、軽度なストレスに対しても過敏な反応を呈するストレス脆弱脳が形成される。そのため、出生仔に新規急性拘束ストレスを負荷し、視床下部室傍核における CRHmRNA 発現を in situ hybridization 法を用いて解析を行った。in situ hybridization 法による組織像において、新規急性拘束ストレス前では CRHmRNA の発現量は 3 群間で差がないようにみえたが、60 分の新規急性拘束ストレス後は stress 群が他の 2 群に比較して多くみえた(図 3)。

そのため定量解析を行ったところ、新規急性拘束ストレス前後の CRHmRNA の発現量は拘束ストレス後で高値を示した。新規急性拘束ストレス後に stress 群は control 群および stress/chewing 群に比較して有意に高値を示した($p < 0.01$)。一方、control 群と stress/chewing 群との間に有意な差は認められなかった (図 4)。

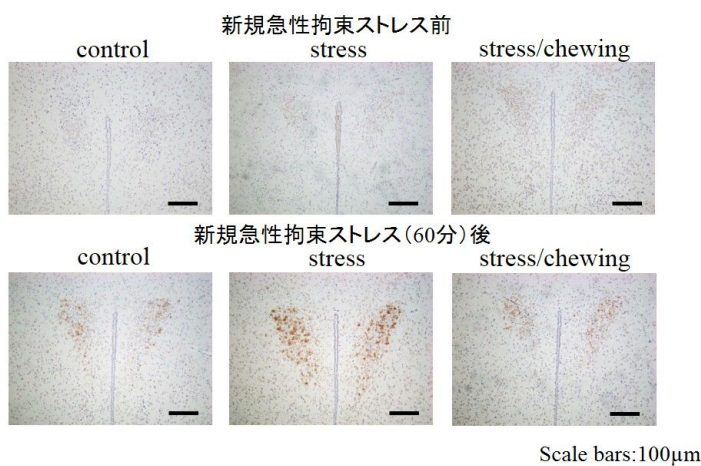


図3 in situ hybridization法による視床下部のCRHmRNA染色像

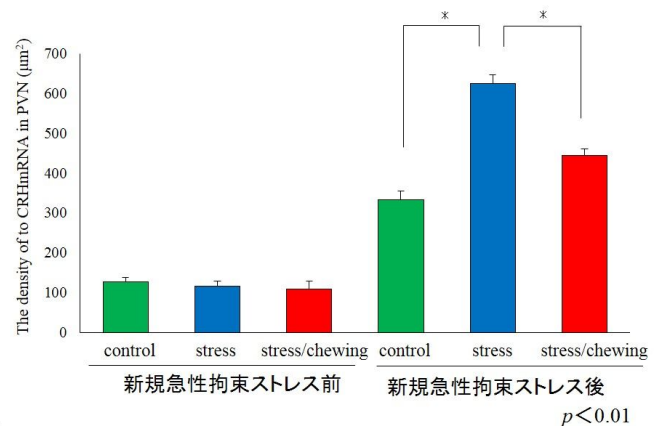


図4 PVNにおけるCRHmRNA発現量

今回の研究において、妊娠期ストレス母体から生まれた仔マウスではPVNにおけるCRHが増加し、その結果軽度なストレスに対しても過敏な反応を呈するストレス脆弱脳が形成され、積極的な妊娠母体の咀嚼運動はPVNにおけるCRHの発現を改善することによって新規ストレスに対する過敏性を和らげ、ストレスに強い脳の形成することが示された。これらの結果から、妊娠期ストレス中の母体の積極的な咀嚼運動が、仔マウスの脳の発達やストレス脆弱性の対処法として有用であることが示唆された。

Onishi ら (*Neurosci Lett.* 560:77-80, 2014.) は妊娠期ストレス中の咀嚼運動によって母体の血中 GC 濃度の上昇が抑制されることによって、仔の学習障害が改善するというデータを示している。この報告から、咀嚼運動のストレス抑制効果には、青斑核を中心としたノルアドレナリン神経系が関与している可能性が考えられる。今後の課題は、妊娠ストレス中の咀嚼運動が脳辺縁系およびカテコールアミン系ニューロンに与える影響を詳細に調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Kin-ya Kubo, Ayumi Suzuki, Mitsuo Inuma, Yuichi Sato, Ryo Nagashio, Etsuro Ohta, Kagaku Azuma. Vulnerability to stress in mouse offspring is ameliorated when pregnant dams are provided a chewing stick during prenatal stress. *Archives of Oral Biology*, 査読有, 97 巻, 150-155, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.10.014>

〔学会発表〕(計2件)

Maternal chewing ameliorates prenatal stress-induced hippocampal impairment in adult offspring. 2018.7.20-23. 日本神経科学大会. 幕張.

Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced deficits in myelin formation in the hippocampus in adult pups. 2017.7.23-30. IADR. London.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。