

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08487

研究課題名(和文) 生後発達期の母子関係による脳の発達と行動の調節：セロトニン神経系の役割

研究課題名(英文) Role of mother-pup interaction in the development of brain and behavior

研究代表者

志賀 隆 (Shiga, Takashi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50178860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路の形成は遺伝子によってプログラムされるだけでなく、様々な環境要因によって修飾されることが報告されている。本研究では、生後発達期の母子関係、及び仔に対する皮膚刺激が成長後のマウスの脳と行動の発達に様々な影響を及ぼすこと、その影響がハンドリング(短時間の母子分離)、長時間の母子分離、皮膚刺激で異なり、ハンドリングと皮膚刺激は行動の発達に良い影響を与えるのに対し、長時間の母子分離は悪い影響を与えることを明らかにした。さらに、行動への影響を担う脳内機構として海馬や扁桃体におけるセロトニン1A受容体、GABA-A受容体a2サブユニット、脳由来神経栄養因子が関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳と行動の発達に影響を及ぼす環境要因として肉体的・精神的な陰性ストレス(いわゆるストレス)の研究が進んでいる。一方、良い影響を与える環境要因(広義の陽性ストレス)の神経科学的アプローチは遅れている。本研究では、生後発達期の養育行動と皮膚刺激の役割を解析した。このような研究は限られており、発達期の脳の構造と機能の可塑性の観点からも重要である。さらに皮膚刺激はタッチケアとしてヒト新生児(特に未熟児)に対して推奨されているが、その作用の脳内機構は全く不明であり、十分な科学的裏付けがない。本研究によってヒトのタッチケアの動物モデルの確立とタッチケアの脳内機構の解明への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：The formation of neural network is not only genetically programmed but also modulated by various environmental factors during development. In this study, we showed that mother-pup interactions and tactile stimulation modulate development of brain and behavior. While short term maternal separation and tactile stimulation gave positive effects on the development of behavior, long term maternal separation negative effects. We next showed that serotonin 1A receptor, GABA-A a2 receptor, and brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala may be involved in mediating the effects of environmental factors on the behavior.

研究分野：発達神経生物学

キーワード：母子関係 養育行動 皮膚刺激 環境要因 記憶学習 うつ様行動 セロトニン

## 1. 研究開始当初の背景

脳の構造と機能の発達は遺伝的要因に加えて、種々の環境要因によって修飾される。出生前後の環境要因が神経回路構築と種々の行動の発達に対して生涯にわたる影響を及ぼすことが報告されている。例えば、出生前(胎児期)の母親に対する拘束ストレスが仔マウスの不安レベルの亢進や学習記憶障害を引き起こすことが申請者を含めて複数のグループによって明らかにされている(Akatsu et al., 2015 ほか)。一方、生後発達期の環境要因として母仔関係の重要性がげっ歯類を用いた“ハンドリング(handling; H)”実験で示されている。ここで言うハンドリングとは発達期の仔を母親から毎日短時間(5~15分間)引き離す操作で、長時間(2~3時間)引き離す母仔分離(maternal separation; MS)と比較して多くの点で逆の影響を及ぼす。すなわち、母仔分離を受けた仔は成長後にストレス応答の亢進や学習記憶障害を示すのに対し、ハンドリングは不安レベルを低下させ、学習記憶能力を向上させる。ハンドリングの作用機序として、分離後の仔を母親のケージに戻した後に、仔の体を舐めるなどの母親の養育行動が増加することから、母親の養育行動、その中でも仔舐め(pup licking)による皮膚刺激の重要性が提唱されている。これまでに申請者も出生前ストレスが成長後の仔マウスの不安レベルを亢進させるのに対し、ハンドリングが学習記憶能力を向上させることを明らかにしている(Akatsu et al., 2015)。その際、ハンドリングによって母親の養育行動(仔舐め)が増加していた。このように、出生前ストレス、生後発達期の母親の養育行動や皮膚刺激が仔の行動の発達に及ぼす影響についての研究が進んでいるのに対し、その作用の基盤となる脳内機構の解析は遅れている。さらに、これらの研究で用いられる実験動物の種(マウス、ラットなど)、マウスの系統、行動実験パラダイム(ハンドリングや母仔分離の時間、実験室の明るさなど)によって実験結果が必ずしも一致していない。従って、これらの問題を解決するために、同一系統のマウスを用い、同一の実験パラダイムで行動と脳への影響を明らかにし、行動と脳の相関を調べることが不可欠である。

## 2. 研究の目的

発達期の環境要因は脳と行動の発達に様々な影響を及ぼす。本研究では、生後発達期の環境要因が不安やうつ様行動、記憶学習などの行動の発達に及ぼす影響、及びその基盤となる脳内機構の解明をめざす。特に、環境要因として母仔関係と仔に対する皮膚刺激に焦点を当て、環境要因と行動とを結ぶ脳内機構としてセロトニン(5-HT)神経系に注目する。そのために、広く動物実験に用いられている C57BL/6J マウスと BALB/c マウスを用い、同一の実験パラダイムを用いてハンドリング、母仔分離、皮膚刺激が行動と脳に及ぼす影響を明らかにする。これらの実験結果に基づいて、行動と脳への影響の相関を解析することによって、行動の発達への影響の基盤となる脳内機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験動物として BALB/c マウスと C57BL/6J マウスの雄を用いた。

### (1) 仔に対する環境要因の負荷

#### 皮膚刺激

生後1日目(P1)からP14まで1日あたり3時間、仔を母親や兄弟から分離させる母仔分離を行う群(MS群)、母仔分離中に実験者が乾いた絵筆(毛の長さ2cm)を用いて仔に皮膚刺激(tactile stimulation)を1日あたり15分間与える群(TS群)、通常飼育するコントロール群(C群)の3群に分けた。母仔分離中は母親から別のケージに移動させるだけでなく、間仕切りによ

って仔同士（兄弟）も隔離した。

#### ハンドリングと母仔分離

P1 から P14 まで毎日 15 分間、または 3 時間（それぞれ H 群、MS 群）仔を母親と別のケージに移し、間仕切りによって仔同士（兄弟）も隔離した。さらに通常飼育するコントロール群（C 群）の 3 群に分けた。

#### （ 2 ）母親の養育行動の解析

上記の皮膚刺激実験、ハンドリングと母仔分離実験で、P1、P3、P7、P10 に、仔を母親のケージに戻した直後から 120 分間、母親の養育行動（子なめ、授乳姿勢、巢作り）の有無を、2 分毎に計測した。コントロール群は実験群と同じ時間帯に同様の計測を行った。

#### （ 3 ）仔の行動解析

仔が生後 8 週まで成長した段階で、以下の行動実験によって（ ）内に示した各種行動への影響を解析した。

高架式十字迷路、オープンフィールド試験（不安様行動、活動性）、強制水泳試験、尾部懸垂試験、ショ糖嗜好試験（うつ様行動）、ホットプレート試験（温痛覚感受性）、モリス水迷路（空間学習・記憶能力）、ロタロッド試験（運動学習）。

#### （ 4 ）環境要因によって賦活化される脳部位の解析

P1（ハンドリング・母仔分離・皮膚刺激の開始日）と P14（ハンドリング・母仔分離・皮膚刺激の最終日）にハンドリング、皮膚刺激、または母仔分離の開始時刻から 3 時間後に灌流固定した。全脳を取り出した後に凍結切片を作成し、c-fos 抗体を用いた免疫染色を行い、各環境要因によって賦活化されるニューロンの分布を解析した。

#### （ 5 ）超音波発声解析

ハンドリング・母仔分離・皮膚刺激が仔の不安レベルに直接的に及ぼす影響を明らかにする目的で、P2～P10 におけるハンドリング・母仔分離・皮膚刺激中の仔の超音波領域の発声頻度について音声解析装置を用いて計測した。

#### （ 6 ）機能分子の発現解析

P5 と P10 での血中コルチコステロン（CORT）濃度を心臓から採決後に ELISA キットを用いて測定した。

不安やうつへの関連が報告されているセロトニン受容体、GABA-A 受容体、脳由来神経栄養因子（brain derived neurotrophic factor; BDNF）の背側海馬と扁桃体の遺伝子発現量について定量 PCR によって解析した。

成体期の扁桃体と背側海馬において mature BDNF と pro BDNF の発現量について ELISA キットを用いて解析した。

## 4 . 研究成果

### （ 1 ）皮膚刺激の影響

BALB/c マウスを用い、P1 から P14 まで母仔分離を行う MS 群、母仔分離中に実験者が筆を用

いて皮膚刺激を1日あたり15分間与えるTS群、通常飼育するコントロールC群について成体期でうつ様行動に関する行動実験を行った。その結果、MS群と比較してTS群で高架式十字迷路試験で不安様行動の増加傾向が見られた。一方、モリス水迷路でTrainingとPF(プラットフォーム)quadrant 滞在時間でMS群とTS群間に差が見られ、発達期の皮膚刺激が成長後の空間学習・記憶に影響を及ぼすことが示唆された。また、オープンフィールド試験で活動性がC群と比較してTS群で増加した。さらにホットプレート試験での温痛覚反応の潜時はMS群と比較してTS群で増加し、TSによって温痛覚の閾値が低下した。神経系と内分泌系に対する影響では、超音波領域の発声頻度がP2、P5、P7でMS群と比較してTS群で高くなっていた。一方、血中CORT濃度はP5でMS群>TS群>C群であり、MSによるCORT濃度の上昇が、TSによって部分的に改善された。それに対し、発達期、成体期の海馬におけるセロトニン1A受容体とBDNFのmRNA発現量に変化は無かった。c-fos染色は1例のみの解析であるが、C群と比較してMS群の前頭葉連合皮質、TS群の周室視床下部核、脳弓下器官、視床下部腹外側核でc-fos陽性細胞が見られ、これらの脳部位が母仔分離と皮膚刺激で活性化されることが示唆された。

ところで、上記の皮膚刺激法では3時間の母仔分離中に15分間の皮膚刺激を行なっている。長時間の母仔分離を伴わない皮膚刺激法として、P1からP14まで1日3回各15分間、仔マウスを兄弟まとめて別ケージに移動し、ダスターを用いて背中に皮膚刺激を行なった(TS群)。コントロールは仔マウスを別ケージに移動させるが皮膚刺激を行わない群(MD群)、通常飼育群(C群)に分けた。成長後の行動解析の結果、モリス水迷路でMD群と比較してTS群で潜時が減少傾向を示し、皮膚刺激による空間学習能力の向上が示唆された。これらのマウスの脳における機能分子の発現は未だ行なっておらず、今後の課題である。

## (2) 母親の養育行動

C57BL/6JマウスをP1からP14まで毎日15分間の短時間のハンドリングを行うH群、3時間の長時間の母仔分離を行うMS群、通常飼育を行うコントロールC群を作製し、成体期において各種行動(うつ様行動、不安様行動、空間記憶学習能力、痛覚感受性)への影響を調べた。その結果、MS群でうつ様行動が増加し、空間記憶能力の低下傾向が見られた。H群ではうつ様行動の低下傾向が見られた。さらに、ハンドリングと母仔分離が仔の脳に及ぼす影響を明らかにする目的で、うつ、不安、空間記憶学習に関連することが示されている扁桃核と背側海馬に関して、成体期におけるBDNFとGABA-A受容体のmRNA発現量の定量RT-PCR解析、mature BDNFとpro BDNFのELISA解析、発達期におけるBDNFとセロトニン1A受容体のmRNA発現量の定量RT-PCR解析を行った。成体期のH群で扁桃核のBDNF mRNA発現量の増加、MS群の背側海馬でGABA-A受容体2サブユニットのmRNA発現量の減少がみられ、うつ様行動への影響と関連する可能性が示された。また発達期(P14)のH群の背側海馬でセロトニン1A受容体とBDNFのmRNA発現量の増加に相関が見られ、これらもうつ様行動への影響と関連する可能性が示された。以上のように、ハンドリングと母仔分離は行動と脳の発達に異なる影響を及ぼすことが示された。

## (3) 生後発達期の5-HT4型受容体の脳と行動の発達における役割

BALB/cマウスを用い、生後発達期の14日間(P1-14)、または21日間(P1-21)、5-HT4型受容体作動薬(RS67333, 1.5 mg/kg/day)を経口投与し、成体で行動解析した。その結果、生後21日間投与の実験群でうつ様行動の減少傾向が見られた。うつ様行動や不安様行動への影響は見られなかった。一方、定量PCR解析によって背側海馬のBDNF mRNAの発現量に増加傾向が見られた。したがって、生後発達期の5-HT4型受容体の活性化が背側海馬のBDNF mRNAを介して成長後の

うつ様行動を軽減させる可能性が示唆された。

<引用文献>

Akatsu S, Ishikawa C, Takemura K, Ohtani A, Shiga T. ( 2015 ) Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. Neuroscience Research 101, 15-23.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Agrawal L, Vimal SK, Shiga T.	4. 巻 158
2. 論文標題 Role of serotonin 4 receptor in the growth of hippocampal neurons during the embryonic development in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 107712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2019.107712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Agrawl L, Korkutata M, Vimal SK, Yadav MK, Bhattacharyya S, Shiga T.	4. 巻 166
2. 論文標題 Therapeutic potential of serotonin 4 receptor for chronic depression and its associated comorbidity in the gut.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 107969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2020.107969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Li Haiyan, Ishikawa Chihiro, Shiga Takashi	4. 巻 68
2. 論文標題 Effects of postnatal handling on adult behavior and brain mRNA expression of serotonin receptor, brain-derived neurotrophic factor and GABA-A receptor subunit	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 17~25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijdevneu.2018.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Chikara, Yamazawa Toshiko, Ohtani Akiko, Maruyama Yuusuke, Mently Nassirhadjy, Sato Mari, Hatano Yuri, Shiga Takashi, Ebihara Tatsuhiko	4. 巻 118
2. 論文標題 Primary cultured neuronal networks and type 2 diabetes model mouse fatty liver tissues in aqueous liquid observed by atmospheric SEM (ASEM): Staining preferences of metal solutions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micron	6. 最初と最後の頁 9~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micron.2018.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Agrawal L, Vimal SK, Chen M-H, Shiga T	4. 巻 6
2. 論文標題 An idea of using microneedles for the targeted drug delivery to overcome the blood brain barrier for the treatment of brain diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharmacovigilance	6. 最初と最後の頁 1000270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2329-6887.1000270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishikawa C, Shiga T	4. 巻 78
2. 論文標題 The postnatal 5-HT1A receptor regulates adult anxiety and depression differently via multiple molecules	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry.	6. 最初と最後の頁 66-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pnpbp.2017.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Agrawal L, Shiga T.
2. 発表標題 Promotion of axon and dendrites formation by serotonin 4 receptor through collapsing response mediator protein-2
3. 学会等名 Society for Neuroscience (SFN) meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下地康介、石田哲夫、志賀隆
2. 発表標題 慢性的な陽性ストレスがラット脳内アミノ酸代謝に与える影響
3. 学会等名 第 107 回日本解剖学会関東支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下地康介、石田哲夫、志賀隆
2. 発表標題 陽性ストレスによるラット脳内D-アミノ酸濃度の変動解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Agrawal L, Shiga T.
2. 発表標題 In vitro study of role of serotonin 4 receptor in neurite formation of hippocampal neurons
3. 学会等名 第106回日本解剖学会関東支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Agrawal L, Shiga T.
2. 発表標題 5-HT4R mediated expression of CRMP2 to control the growth of neurites in hippocampal neurons in vitro
3. 学会等名 International Conference, Tsukuba Global Science Week (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志賀 隆、李 海燕、石川千尋
2. 発表標題 生後発達期のセロトニン神経系が脳と行動の発達に及ぼす影
3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Kasegai H, Shiga T.
2. 発表標題 Roles of 5-HT4 receptor on dendritic development of cortical neurons.
3. 学会等名 TGSW(Tsukuba Global Science Week)2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学医学医療系神経生物学グループ <a href="http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/shiga-group/anatomy3rd.html">http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/shiga-group/anatomy3rd.html</a>
---

6. 研究組織		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)
		備考