

令和 4 年 11 月 15 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08348

研究課題名(和文) 母子分離モデルから紐解く発達障害発症に関わる脳領域

研究課題名(英文) Specification of brain regions involved in the neurodevelopmental disorders with the maternal separation model

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：幼少期の虐待・育児放棄は将来の非行・犯罪に繋がるとされているが、発達過程で様々な環境要因が複雑に関与するヒトを対象とした研究ではその機序解明は困難である。そこで本研究では、育児放棄のモデルとしてラット仔を生後早期に母子分離し、成熟後の攻撃性に与える影響とその原因となる脳部位の特定を行った。結果としては発達早期の母子分離は成熟後の攻撃性を増大させ、その原因は扁桃体中心核の過剰な活性にあることが示された。扁桃体中心核はより暴力的な攻撃性に関わるとされており、幼少期一過性の虐待・育児放棄が成熟後まで持続した同部位の異常を引き起こすことで、将来的な暴力を伴う非行・犯罪に繋がると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトの脳発達段階で約3歳頃までの一過性の幼少期ストレスが青年期以降の暴力的な攻撃性に繋がる可能性が見出された。更にその原因は普通の攻撃性回路と異なる強い暴力性に関わる扁桃体中心核にあることも示され、実際に同部位の活性化は無抵抗な同種ラットにまで攻撃を加える非常に強い攻撃性を見せることも確認されている。本研究のように原因となる脳部位とその機能が明らかになることは非侵襲的な画像診断法(fNIRS, fMRI)に応用する事ができ、幼少期に強い攻撃傾向が見られた際に単に正常発達過程の一部なのか、それとも将来の非行・犯罪に繋がりがやすい兆候なのかをより確実に診断する手法の確立に繋がる意義がある。

研究成果の概要(英文)：Child abuse and neglect are believed to lead to delinquency and crime in the future, but it is difficult to elucidate the mechanism in human studies because of the complex involvement of various environmental factors during the developmental process. In this study, we used rat pups separated from their mothers during the early postnatal period as a neglect model and assessed their aggression after maturation and the brain regions responsible for abnormal aggressive behaviors. Our results showed that maternal separation increased aggressive behaviors, which were caused by excess activation in the central amygdala. Given that the central amygdala has been reported to be involved in more violent aggression, our results suggest that a transient stressful environment during childhood can lead to sustained disturbance of the central amygdala, leading to violent delinquency and crime in the future.

研究分野：発達神経科学

キーワード：母子分離 幼少期ストレス 育児放棄 攻撃性 暴力性 扁桃体

1. 研究開始当初の背景

幼少期における母子間接触は脳発達及びそれに関連した行動発達に重要な因子であり、これが希薄な状況下(母性剥奪)は正常な脳発達に影響を及ぼす。例えば哺乳動物において離乳前の母子分離は仔にストレスを与えるものであり、正常な脳発達を阻害し高次脳機能の異常を引き起こすことが報告されている。実際にヒトにおいても、育児放棄のような母子間接触が乏しい養育環境は発達障害の特徴である衝動性を増大させ、それは将来的な他者への暴力性に繋がることが指摘されている。

多くの研究で母性剥奪が高次脳機能に影響を及ぼす要因であることが指摘されている一方で、それがどの脳領域の異常に起因して惹起されるのかについては殆ど分かっていない。近年の非侵襲的な診断手法の発達(fNIRS:近赤外分光法、fMRI:機能的磁気共鳴画像法)を鑑みると、母性剥奪のような幼少期のストレスで障害される脳発達の痕跡とそれによって引き起こされる行動発達の異常の相互関係を解き明かすことができれば早期診断や治療評価に繋がる手掛かりとなると考え、本研究を発案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では虐待・育児放棄といった幼少期ストレスが児の攻撃性を増大させ将来的な非行や犯罪行為に繋がるという報告に着目し、幼少期に母子分離されたラット仔(育児放棄モデル)の攻撃性の異常とその原因となる脳領域を特定する事を目的とした。

3. 研究の方法

3-1) 母子分離モデルの作製

動物はSDラットを用い、既に確立済みの手法を用いて母子分離モデルを作製した(Ohta KI, et al. Behav Brain Res. 2020)。具体的には生後2-20日の間に母獣から仔を個別に分離し(3時間×2回/日、母子分離群)、生後21日で離乳して2匹/ケージで飼育した。対照群は離乳まで母獣と共に飼育した仔を用いた(通常養育群)。各群を8週齢まで飼育して実験に用いた。

3-2) 攻撃行動試験 (Resident-intruder paradigm test)

各群8-9週齢で攻撃性の評価を行った。具体的には、各群を飼育用ケージから床敷ごと測定用のケージに移して3日間飼育した。3日目のげっ歯類の活動期である夜間(19:00-21:00)にIntruder ratを測定用ケージに入れて、各群のIntruder ratに対する攻撃行動をビデオで10分間撮影した。Intruder ratは各群よりも約50g体重の低いSDラットを用いた。撮影したビデオを用いて、測定バイアスがかからないように各群の情報を隠した状態で測定者2名によって各種攻撃行動の解析が行われた。

3-3) 攻撃行動試験後の神経活性評価

上記3-2)の攻撃行動試験の75分後に4%パラホルムアルデヒド/PBSで灌流固定を行い脳を採取した。凍結包埋後に40μmの切片を作製し、神経活性のマーカーとしてc-Fosに対する抗体を用いて浮遊法で免疫組織染色を行った。本研究では、攻撃性に最も関連の深い扁桃体に焦点をあてて、共焦点定量イメージサイトメーター(CQ1, 横河電機)を用いて各亜核のc-Fos陽性細胞数を測定した。

3-4) 光遺伝学的手法を用いた扁桃体中心核と攻撃性の関係解明

上記の3-2)と3-3)の結果から、母子分離群の攻撃性増大には扁桃体中心核の過剰な活性が関わっている事が示唆されたが、この亜核が攻撃性に直接的に関わるかはまだ報告が少なく不明瞭である。そこで、光によって開口する陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン2 (ChR2) を用いて扁桃体中心核を活性化させることでどのような攻撃性が惹起されるかを検討した。具体的には、3種混合麻酔をかけた8週齢SDラット (300 ± 10 g) にChR2の配列を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV-hSyn-ChR2-EYFP) を脳定位手術にて扁桃体中心核に導入した (位置: Anteroposterior -2.2 mm, Mediolateral 4.4 mm, Dorsoventral 7.8 mm、導入速度: 0.1 μL/分、5分間)。対照群には黄色蛍光タンパク質 (EYFP) のみの配列を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV-hSyn-EYFP) を導入した。導入用のカニューラを更に10分間静置した後に抜いて、同部位より0.3 mm背側にLEDカニューラを留置し歯科用セメントで固定した。1週間の回復期間の後に測定用ケージに移し、更に1週間後の試験開始6時間前にLEDカニューラに受信機を取り付けて、3-2)と同様の方法で夜間に攻撃行動試験を行い30分間撮影した。行動試験中は、5分毎にLEDのON/OFFを繰り返した(ON時の点灯条件: 25Hzで5秒間を1セットとして30回、各セット間のインターバルは5秒間)。撮影したビデオの解析は測定バイアスがかからないように各群の情報を隠した状態で測定者2名によって各種攻撃行動の解析が行われた。

4. 研究成果

4-1) 幼少期の母子分離は成熟後の攻撃性を増大させる

生後8週齢で攻撃行動試験を行ったところ、母子分離群では通常養育群に比べて最初に攻撃行動を行うまでの潜時が有意に短く(図1A)、攻撃行動回数は有意に増加している事が確認された(図1B)。通常養育群では威嚇のような攻撃行動(offensive grooming)が主に認められる程度であったが、母子分離群では飛び掛かって襲う行動(Pouncing)が主体で通常養育群では殆ど認められなかった噛みつき行動など非常に強い攻撃性を示す個体も認められた。これらの結果は、幼少期における母子分離ストレスが児の攻撃性を増大させることを示し、より暴力的な攻撃性を誘発する原因となっている事を示唆するものである。

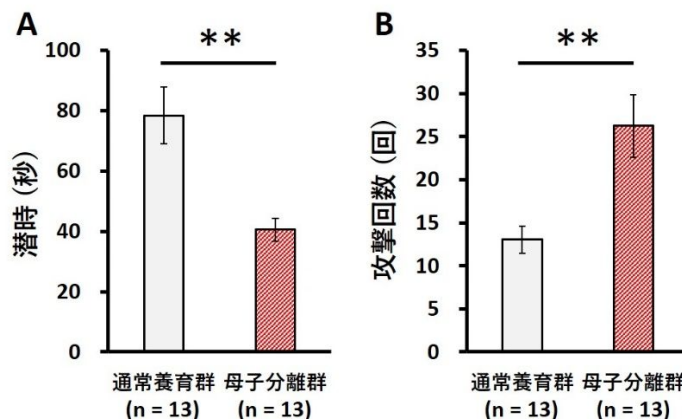


図1: 各群の攻撃行動試験結果

(A) 最初に攻撃行動を行うまでの潜時、Mean±SEM、**p < 0.01

(B) 総攻撃行動回数、Mean±SEM、**p < 0.01、

4-2) 母子分離ストレスによる攻撃性増大は扁桃体中心核の過剰活性に起因する

各群における攻撃行動試験後の脳を採取し扁桃体の各垂核（図 2A）における c-Fos 陽性細胞数を比較したところ、攻撃行動に関与する事が数多く報告されている扁桃体基底外側核や内側核の神経活性は高いものの両群間で特に有意な差が認められなかった（図 2B&C）。一方で扁桃体中心核では母子分離群の活性が有意に上昇していることが確認された（図 2B&C）。また更に、この扁桃体中心核の c-Fos 陽性細胞数は総攻撃回数と強い正の相関を示す事も確認された（ $r = 0.618, p < 0.01$ ）。以上の結果は母子分離群の攻撃性増大は単に扁桃体全体の活性が原因となっているのではなく、中心核の過剰活性に起因していることを示すものである。

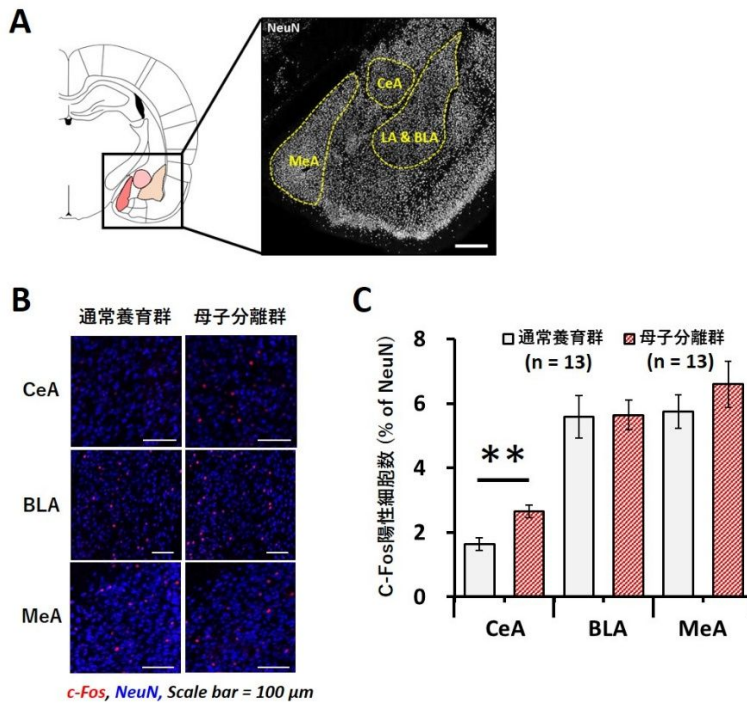


図 2：各群の攻撃行動中の扁桃体垂核における神経活性

- (A) 解析を行った扁桃体の各垂核領域、CeA：中心核、MeA：内側核、LA：外側核、BLA：基底外側核
(B) 攻撃行動試験時の各垂核における c-Fos 陽性細胞像
(C) 攻撃行動試験時の各垂核における NeuN 陽性細胞数に対する c-Fos 陽性細胞数の比率、Mean±SEM、** $p < 0.01$

4-3) 扁桃体中心核は暴力的な攻撃性に関与する

扁桃体中心核自体が攻撃性にどのように関わるかを光遺伝学的手法にて確認したところ、片側の扁桃体中心核に ChR2 を導入した群では LED を点灯させて中心核を活性させるのと同期する形で相手に飛び掛かって押さえつける行為(Clinch attack)や噛みつき行動など非常に強い攻撃行動が惹起される事が確認された（図 3A&B）。一方で EYFP のみを導入した対照群においては LED 点灯の前後で特に変化は認められなかった（図 3C&D）。更に両側の扁桃体中心核を活性化させた場合は、無抵抗な相手に対しても噛みつき行動を行うなどより強い攻撃性が惹起される事も確認された。また別の垂核に僅かに導入された ChR2 が原因になっている可能性を考慮して、MeA や BLA への導入実験も行ったが、いずれの場合も本研究の LED 点灯条件では攻撃性を賦活しない事が確認された。以上のことから扁桃体中心核の過剰な活性は単独で非常に暴力的な攻撃性に関与することが示された。

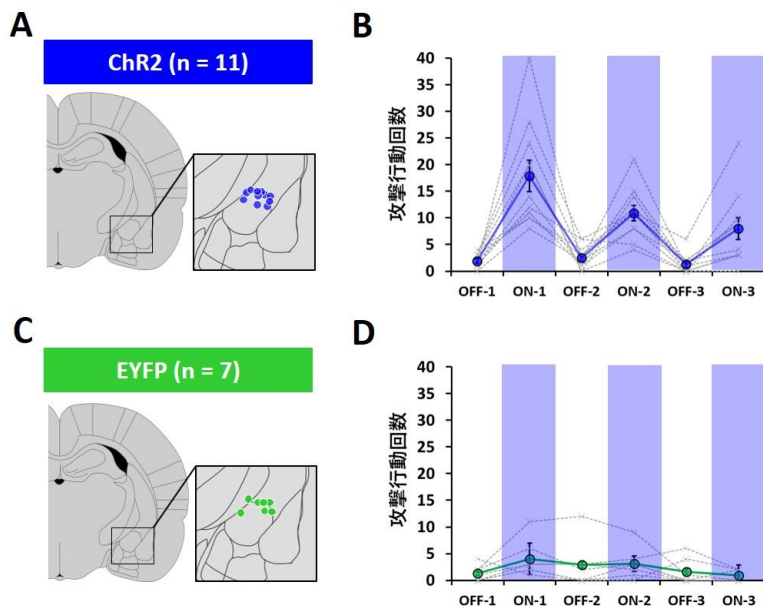


図3：扁桃体中心核の活性状態と攻撃行動の関係性

- (A) チャネルロドプシン 2 (ChR2)群の各ラットにおける LED 先端の位置
- (B) ChR2 群における LED ON/OFF 時の攻撃行動回数
- (C) 黄色蛍光タンパク質 (EYFP)群の各ラットにおける LED 先端の位置
- (D) EYFP 群における LED ON/OFF 時の攻撃行動回数

4-4) 総括

本研究では、幼少期の母子分離ストレスが成熟後における攻撃性を増大させること、更に扁桃体中心核の過剰活性がその原因の一端を担っていることが明らかとなった。通常、自身のテリトリーを守るような攻撃性は適度な扁桃体内側核の活性によって惹起されるものである事は良く知られている (Haller J. Neurosci Biobehav Rev. 2018)。当初の予想ではこの扁桃体内側核の過剰な活性によってより衝動的な攻撃行動が惹起されていると考えていたが、予想外にも扁桃体中心核が原因の一端であった。この扁桃体中心核は略奪的攻撃 (Predatory aggression) に関与し、通常は他生物を捕食する際に発揮される攻撃性であることを指摘されている (Han W, et al. Cell. 2017)。また更にこの種の攻撃性は道具的攻撃 (Instrumental aggression) ともいわれ「自身の目的を達成するために攻撃行動を道具として使用し、怒り感情を伴わない事が多い」と定義されており、これはヒトにおいてはいじめ、強盗、暴力といった反社会的行動に関わるとされる。実際に過去の実験動物を用いた研究においても扁桃体中心核活性の高い動物モデルではムリサイドなどの暴力的な攻撃性が認められる事が報告されており (Tulogdi A, et al. Eur J Neurosci. 2010; Tulogdi A, et al. Behav Brain Res. 2015)、本研究ではそれを裏付ける結果を得る事ができている。それ故に本研究の成果は、幼少期の虐待・育児放棄のような不遇な養育経験は単に児の衝動的な攻撃性を増大させるのではなく、将来的に反社会的行動に繋がり得るような攻撃性に関与することを示すものである。

本研究により、これまで漠然としていた不遇な養育経験による児の攻撃性増大の原因の一端を担う脳部位として扁桃体中心核が特定され、それは将来的な反社会的行動に繋がる原因ともいえる部位であった。今後、この部位に発現する受容体あるいはその投射域を更に追及して解析することで診断・治療のターゲットを模索すると共に、乳幼児以降の脳発達段階での養育環境の改善によりこの異常な攻撃性が回復し得るのか否かを検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tenkumo Chiaki, Ohta Ken-ichi, Suzuki Shingo, Warita Katsuhiko, Irie Kanako, Teradaya Saki, Kusaka Takashi, Kanenishi Kenji, Hata Toshiyuki, Miki Takanori	4. 巻 6
2. 論文標題 Repeated maternal separation causes transient reduction in BDNF expression in the medial prefrontal cortex during early brain development, affecting inhibitory neuron development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e04781 ~ e04781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e04781	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 -

1. 著者名 Ohta Ken-ichi, Suzuki Shingo, Warita Katsuhiko, Sumitani Kazunori, Tenkumo Chiaki, Ozawa Toru, Ujihara Hidetoshi, Kusaka Takashi, Miki Takanori	4. 巻 379
2. 論文標題 The effects of early life stress on the excitatory/inhibitory balance of the medial prefrontal cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 112306 ~ 112306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2019.112306	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田航大、太田健一、入江加奈子、氏原英敏、鈴木辰吾、三木崇範
2. 発表標題 母子分離による内側前頭前皮質におけるparvalbumin陽性抑制性ニューロンの減少
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田健一、鈴木辰吾、三木崇範
2. 発表標題 母子間の関係性が児の脳発達及び高次機能に与える影響
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田谷紗希、荒木智尋、氏原英敏、小澤徹、太田健一、鈴木辰吾、三木崇範
2. 発表標題 母子分離ストレスによる社会的認知能力の低下と関連する脳領域
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒木智尋、氏原英敏、太田健一、鈴木辰吾、三木崇範
2. 発表標題 母子分離が引き起こす攻撃性増大と関連する脳領域
3. 学会等名 日本解剖学会 第74回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	三木 崇範 (Miki Takanori) (30274294)	香川大学・医学部・教授 (16201)	
研究分担者	鈴木 辰吾 (Suzuki Shingo) (50451430)	香川大学・医学部・准教授 (16201)	
研究分担者	中村 信嗣 (Shinji Nakamura) (30437686)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	割田 克彦 (Katsuhiko Warita) (40452669)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
研究分担者	日下 隆 (Takashi Kusaka) (50274288)	香川大学・医学部・教授 (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関