

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 12日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658093

研究課題名（和文）

マウスをモデルとした児童虐待に関するトランスレーショナル研究

研究課題名（英文）

Translational Study For Child Abuse using Mice As Its Animal Model

研究代表者

海老原 史樹文 (EBIHARA SHIZUFUMI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50135331

研究成果の概要（和文）：

本研究は、我々が同定した、絶望行動を制御する遺伝子“*Usp46*”の突然変異マウスを児童虐待のモデルとして活用し、仔マウスに及ぼす虐待の影響を行動学的観点から明らかにすることを目的としている。これまでに、ヒトの児童虐待の特徴である、(1)虐待の反復性、(2)虐待の世代間連鎖、(3)ストレス負荷による虐待誘発、について検討し、*Usp46* 変異マウスはヒトの児童虐待の特徴を備えている事が示された。

研究成果の概要（英文）：

The present study was undertaken to assess the validity of *Usp46* mutant mice from behavioral standpoint as an animal model for child abuse in human (*Usp46* regulates “behavioral despair” in mice). We examined three features in human child abuse: (1) repetition of abuse, (2) succession of child abuse to next generation, (3) stress-induced child abuse. As a result, we found that *Usp46* mutant mice possess these three features.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：行動、マウス、児童虐待、動物モデル、脱ユビキチン化酵素

1. 研究開始当初の背景

今日、児童虐待は極めて深刻な社会問題となっている。厚生労働省の調査によると、全国の児童相談所に対応した児童虐待相談対応件数は平成10年から急激に上昇し、平成21年では約4万4千件と過去最悪を更新している。児童虐待は、一時的な影響だけではなく、子供が成長した後の将来にわたって影響を及ぼし、虐待が虐待を生む世代間連鎖や、虐待を受けた児童の成長後の犯罪率の高さ、うつ病などの精神疾患発症率の増加など極めて重大な影響を児童に与える。しかしなが

ら、児童虐待に関する研究は、心理学や教育学などの社会科学や精神医学などの臨床医学で扱われており、動物をモデルとしてその発生機序や生理学的影響について生物学的観点から踏み込んで研究した例はこれまでにほとんど行われていない。そのため、児童虐待の発症原因の究明、予防・治療法の開発、創薬などについては未解決のままである。

2. 研究の目的

申請者は、抗うつ薬の反応性を調べる強制水泳や尾懸垂テストにおいて無動化しない

(絶望しない) CS マウスを発見し、遺伝学的手法により、無動行動を制御する量的形質遺伝子、*Usp46* を特定することに成功した (Nature Genetics, 41:688-695, 2009)。この遺伝子は、脱ユビキチン化酵素をコードしており、抑制性神経伝達物質である GABA の働きに影響を与える。そのため、無動行動だけでなく多くの行動が影響を受ける。なかでも営巣活動や養育行動への影響が顕著で、*Usp46* 突然変異マウスは巣造りがほとんど出来ず、頻繁に幼児期のマウスを傷つけたり殺したりする。しかし、この変異遺伝子は、QTL(Quantitative trait locus)解析により同定された量的形質遺伝子のため、ノックアウトマウスのような遺伝子機能の欠損効果が極端に現れる場合とは異なり、表現型への影響が比較的マイルドである。すなわち、仔マウスへの殺傷行動は、*Usp46* 変異を持つ親個体の全てに見られるわけではなく、何らかのストレスが加わった親マウスに限って現れる。児童虐待は、通常は問題なく育児を行うことが出来る親が、度重なるストレスなどの劣悪環境に曝されることにより生じる。この点において、*Usp46* 突然変異マウスは児童虐待をする親に類似している。また、予備実験から、*Usp46* 突然変異マウスの仔マウスに対する殺傷行動は、繰り返して起こることが分かっている。殺傷行動を起こした親マウスは、次に出産した仔マウス対しても同じように殺傷行動を起こすことがほとんどである。しかし、殺傷行動を起こしたことがない親が、次の出産で殺傷行動に至ることはまれである。これは、児童虐待と極めて類似しており、ヒトの場合でも虐待は反復・継続的になされることが一般的である。そこで、本研究では、*Usp46* 突然変異マウスを児童虐待のモデルとして活用し、生物学的視点からそのメカニズムの解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究は、ヒトの児童虐待の特徴である、(1) 虐待の反復性、(2) 虐待の世代間連鎖、(3) ストレス負荷による虐待誘発、について検討した。(1) については、生後間もない仔マウスをケージの3角に1匹ずつ置き、仔マウスに対する行動を30分間ビデオ観察した。この観察を1週間程度の間隔で3回繰り返した。(2) については、母子交換テストを行い、*Usp46* 変異マウスを里親にした場合の影響を調べた。また、(3) については、4~8週間の単飼ストレスが養育行動に与える影響を調べた。なお、仔マウスに対する攻撃行動が見られた場合には、直ちに仔マウスをケージ外に取り出した。さらに、(4) *Usp46* がどのような神経化学的機構に影響を与えているか検討するために、GABA系に注目し種々薬物を用いて尾懸垂行動への

影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 虐待の反復性：*Usp46* 変異マウスは仔マウスを傷つける個体が多く、その個体に限って反復的に仔を傷つけることが分かった (図1)。図に示すように、7個体のうち、3個体は3回のトライアル全てにおいて仔を傷つけた。しかし、4個体は3回のトライアル中1回も仔を傷つけることがなかった。

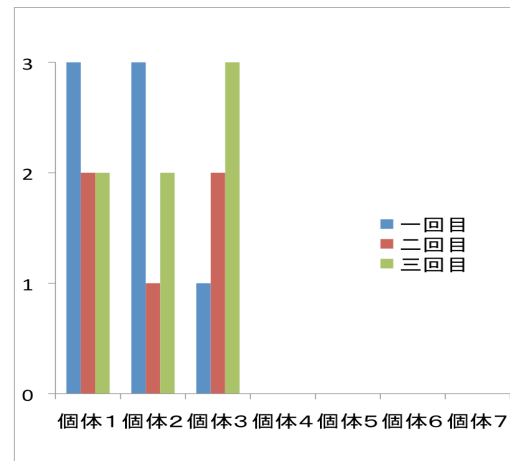


図1. *Usp46* 変異マウスの仔集め行動試験
縦軸は傷つけられた仔マウスの数を示す。1週間程度の間隔で3回実験を行った。個体4~個体7は仔マウスに傷を負わせなかったマウス。

(2) 虐待の世代間連鎖：*Usp46* 変異マウスと正常マウス間で、母子交換を行ったところ、遺伝的に正常なマウスでも、*Usp46* 変異マウスに育てられると成長後、養育行動に障害が現れることが分かった (図2)。

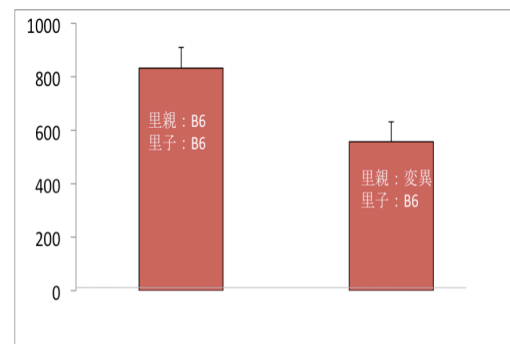


図2. 異なる里親環境が成長後の養育活動に及ぼす影響

ケージ内に生後間もない仔マウスを3匹入れ、30分間養育活動を観察した。縦軸は仔マウスを暖めている時間(秒/30分)。左の棒グラフは、里親、里子いずれも C57BL/6J。右の棒グラフは、里親が *Usp46* 変異マウス、里子が C57BL/6J マウス。

(3) ストレス負荷による虐待誘発：単飼ストレスを負荷した場合、正常マウスに大きな

影響は認められなかったが、*Usp46* 変異マウスでは養育行動に著しい異常が現れることが分かった (図3)。この結果は、*Usp46* 変異マウスがストレスに対して脆弱であることを示している。

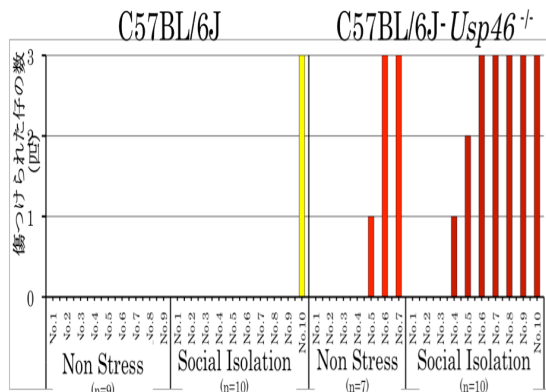


図3. 単飼ストレスを負荷したマウスの養育行動

C57BL/6Jマウスは単飼ストレスの影響をほとんど受けないが、*Usp46* 変異マウスは通常の飼育条件でも仔マウスを傷つけるが、単飼飼育を行うとさらにその頻度が増加する。

(4) *Usp46* 変異が及ぼす GABA 系への影響
Usp46 の作用機構を明らかにするために、尾懸垂行動における無動時間をパラメータとして、GABA 系に関する種々薬物を用いた行動薬理学実験を行った。

① *Usp46* ノックアウトマウス (KO)

Usp46 変異マウスはリジン欠損する変異マウスであるが、この変異が機能欠損型か機能獲得型か不明である。そこで、*Usp46* KO マウスを作製して尾懸垂行動における無動時間を測定した。その結果、リジン欠損変異型と同じように、無動時間が短縮した。この結果から、この変異は機能欠損型であり、*USP46* の酵素活性の低下をもたらすものと考えられた。

② 行動薬理的検討

Usp46 突然変異マウス及び *Usp46* KO マウスを用いて GABA のアゴニスト (ニトラゼパム) やアンタゴニスト (フルマゼニル) を投与し、その影響を検討した。その結果、ニトラゼパム投与では、いずれのマウスにおいても無動時間は延長し、フルマゼニルでその効果が阻害された (図4)。さらに、無動時間延長効果は濃度依存的であった (図5)。しかし、オープンフィールドにおける総活動量など、他の行動には影響が認められなかった。従って、*Usp46* は GABA 系を介して TST の無動時間に特異的に影響を及ぼすと考えられた。

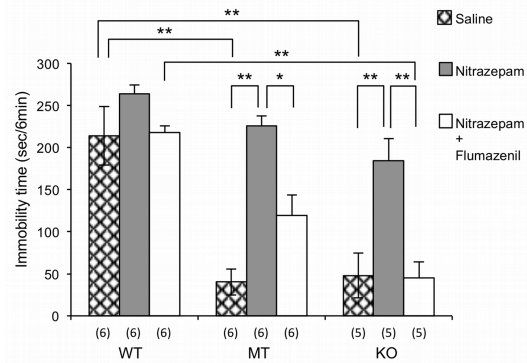


図4. ニトラゼパムとフルマゼニル投与による尾懸垂試験における無動時間への影響

Usp46 変異マウス (MT) 及び KO マウスにおいてニトラゼパム投与により無動時間が延長し、フルマゼニルによりその効果が阻害された。

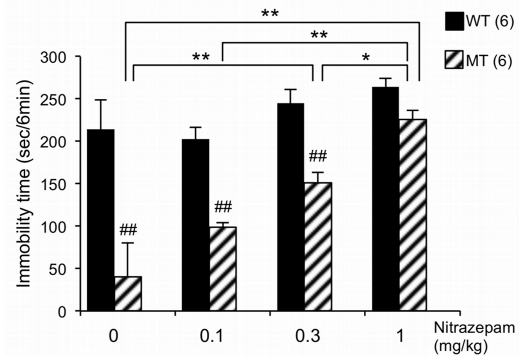


図5. ニトラゼパム投与による無動時間の延長

ニトラゼパムにより濃度依存的に尾懸垂行動の無動時間が延長した。

以上の実験結果から、*Usp46* 変異マウスは、児童虐待の特徴を備えており、児童虐待のモデルとして活用できる可能性が示された。精神疾患のモデル動物の基準として、(1) 動物の示す表現型がヒトでの表現型に類似している (表面的妥当性)、(2) 薬物などによるモデル動物の反応がヒトにおいて見られる効果と同様である (予測妥当性)、(3) ヒトとモデル動物が共通のメカニズムを有している (構成的妥当性) の3つが必要とされている。本研究の結果は、少なくとも (1) の基準を満たしたものと考えられる。今後は、基準 (2)、(3) について検討する必要がある。*Usp46* の作用機序として、GABA 系が関与していることが示されたことは、さらなる研究を進展させる上での重要な情報になると期待される。

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)

① Saki Imai, Takayoshi Mamiya, Akira Tsukada, Yasuyuki Sakai, Akihiro Mouri, Toshitaka Nabeshima, Shizufumi Ebihara, Ubiquitin-specific Peptidase 46 (*Usp46*) Regulates Mouse Immobile Behavior in the Tail Suspension Test through the GABAergic System, Plos One 査読有、(in press)

② 海老原史樹文、富田滋. マウスの“行動的絶望”を制御する遺伝子の特定 日本神経精神薬理学雑誌 査読無、29:19-22, 2010

③ 海老原史樹文、マウスの絶望行動を制御する遺伝子 *Usp46*、分子精神医学 査読無、10(1):66-67, 2010

[学会発表] (計21件)

① 海老原史樹文、マウスをモデルとした児童虐待に対する生物学的アプローチ、本間さと教授退職記念講演会・シンポジウム「時刻と時間の生理学」 2012. 3. 9-10 京王プラザホテル札幌

② 海老原史樹文、*Deubiquitination and behavior*、日本睡眠学会第36回定期学術集会 2011. 10. 15-16 worldsleep2011 2011. 10. 15-20 国立京都国際会館

③ 海老原史樹文、マウスの“行動的絶望”を制御する遺伝子 *Usp46* の特定、日本睡眠学会第35回定期学術集会「学ぼう睡眠学 広げよう睡眠医療」2010. 7. 1、名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原史樹文 (EBIHARA SHIZUFUMI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：50135331