

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591603

研究課題名(和文)母子分離による学習障害と精神疾患発症リスク - 神経可塑性からの発症機序解明 -

研究課題名(英文)Risk of learning deficit and mental disorder by prolonged maternal separation

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、長期的な母子分離が海馬CA1領域の神経回路網形成に影響を与え、海馬に関連した学習能の低下を引き起こす事が明らかとなった。また母子分離は脳発達早期においてシナプス形成に関する因子の発現動態を変化させた(BDNF-ERKシグナルの低下、CaMKIIを介したGluR1の過剰リン酸化)。これらの変化は一過性であるが、この時期は機能的シナプスが出来始める重要な時期である。従って母子分離は脳発達早期における海馬の正常な神経回路網形成を攪乱すること、更にそれは成熟後の学習能低下を引き起こす恒久的な影響であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Present study showed that prolonged maternal separation influenced formation of neuronal circuit in the CA1 region of rat hippocampus and hippocampus-dependent learning ability after weaning. In addition, prolonged maternal separation caused the reduction of BDNF-ERK signaling and hyperphosphorylation of GluR1 via CaMKII in the rat hippocampus. Given that these factors are closely related to synaptic formation, functional synapses are commenced to be formed around postnatal days 7-10, these alterations possibly disrupt normal functional acquisition of brain development. Our findings suggest that prolonged maternal separation disturbs the factors related to synaptogenesis during early brain development, which might be in part responsible for abnormalities of formation of neuronal circuit and learning deficit in later life.

研究分野：胎児・新生児医学

キーワード：母子分離 神経回路網形成 海馬 樹状突起スパイン 記憶・学習能 BDNF CaMKII GluR1

1. 研究開始当初の背景

虐待や育児放棄といった幼若期の不遇な養育環境は、成熟後の学習障害や精神神経疾患を誘発する要因の一つである。幼若期は脳発達臨界期(brain growth spurt)と呼ばれる高次機能の獲得に重要な発達期間を含み、成熟後とは異なり非常に神経/シナプスの可塑的变化に富む時期である。この時期の不遇な養育環境によるストレスは神経回路網形成に悪影響を与え、それは高次機能障害の原因となっていると考えられる。過去の報告からも離乳前の脳発達期に母獣と仔を引き離す「母子分離モデル」では成熟後の様々な行動異常が指摘されている。例えば、学習障害や不安様行動の増加、攻撃性増加、社会性低下やうつ様行動の増加などである(Pharmacol Biochem Behav. 2002; 73(1): 131-40., Neurosci Lett. 2006; 404(1-2): 208-12., Neurosci Res. 2007; 58(1): 32-9., Psychoneuro-endocrinology. 2009; 34(3): 463-7.)。しかし、脳発達期において母子分離が最も影響を与える時期の特定、あるいは成熟後の行動異常を引き起こす機序、回路網レベル(シナプス形成、細胞内情報伝達系)での変化は未だに明らかとなっていない。このような背景から、我々は母子分離による脳発達早期の様々な因子の変化が回路網形成を不可逆的に変化させる事で成熟後の学習能低下・情動異常を引き起こされやすい状態になっているのではないかという仮説のもと、その機序解明を目指した。

2. 研究の目的

背景の通り、先行する母子分離研究では行動異常など成熟後の影響について多くの知見が得られているが、脳発達期のどの時期にどのような因子が大きく影響を受けているのかについての詳細な解析は乏しい。本研究では、脳発達期を中心に母子分離によって大きく影響を受ける因子とその時期を特定する事を目的に研究を遂行した。特に我々は母子分離でも報告の多い学習能への影響に焦点をおき、関連性が深い海馬において神経回路網形成に重要な因子である脳由来神経栄養因子(BDNF)および脳発達期に一過性でダイナミックな膜上移行をする事でシナプス形成に重要な役割を担う GluR1(AMPA 受容体のサブユニット)について解析を行った。このような母子分離モデルを用いたヒトで不可能な神経回路網レベルでの解析は、幼若期の嫌悪経験が成熟後の精神疾患や学習能にどう関連してくるのかその機序を解明するための一助となるものである。

3. 研究の方法

1) 母子分離動物の作製

Sprague-Dawley ラットを用い、申請者らが

既に確立した母子分離方法を用いてモデル動物の作製を行った。この母子分離方法によって仔はストレスを感じている事(血中コルチコステロン濃度の上昇)及び母子分離期間中の栄養状態に問題が無い事は既に確認している(Int J Dev Neurosci. 2014; 33: 15-21)。具体的には生後 2 日 (postnatal day: PD 2)に雄 4 匹、雌 4 匹に間引きした後、brain growth spurt を含む PDs 2-20 まで仔を母獣から個別に分離した(6 時間/日: 9:00-12:00, 13:00-16:00) (Maternal deprivation group: MD 群)。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)。PD 21 で離乳し、雄のみを 2 匹/ケージで通常飼育した。

2) 行動解析

PD 50-60 のラットを用いて行動解析を行った。学習試験として Shuttle box test で受動的回避行動を評価し、Radial maze test では作業記憶および参照記憶を評価した。不安様行動試験として elevated plus maze test にて open arm への進入回数及び滞在時間を評価した。社会性試験としては three chambers social recognition test で見知らぬラットの入った筒の近くに滞在した時間を評価し、Resident-intruder paradigm test では対象ラットのホームケージ内に見知らぬラットを入れてそのラットに対する攻撃行動を評価した。またうつ様行動解析としては forced swimming test にて無動時間を解析した。

3) 発達期における遺伝子発現及びタンパク質発現の評価

PDs 7, 10, 14, 21 で脳を採取し、実体顕微鏡下で海馬 (Bregma -2.52 ~ -3.60mm)を採取し液体窒素にて凍結保存した。PDs 7, 10, 14 での脳採取は 3 時間の母子分離直後に行った。

遺伝子発現は海馬組織から AllPrep DNA/RNA/Protein Mini (Qiagen)を用いて total RNA を抽出したのち QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)を用いて逆転写して cDNA を作製した。その cDNA を用いて StepOnePlus™ (Applied Biosystems)で Real-time PCR をし mRNA 発現を定量した。

タンパク質発現解析は海馬から RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS with protease/phosphatase inhibitor cocktail [Nacalai Tesque])を用いてタンパク質を抽出し一部を使って BCA 法で蛋白量を定量した。残りのサンプルに 2x sample buffer を加えたのち 95 °C、5min 反応させた。これらのサンプルを用いて各種抗体にて western blot を行った。撮影は ImageQuant LAS 4010 biomolecular imager (GE)で行い、解析は ImageQuant TL software (GE)で行った。

4) 離乳直後での神経回路網形成の評価

PD 21 の仔から海馬を採取し、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膜画分を回収した。RIPA buffer で溶解した後にタンパク質を抽出し一部を使って BCA 法で蛋白量を定量した。残りのサンプルに 2x sample buffer を加えたのち 95 °C、5min 反応させた。PSD95 に対する抗体で western blot を行い、方法(3)と同様に解析を行った。

また PD 21 の仔から脳を採取し、FD Rapid GolgiStain Kit (FD NeuroTechnologies)を用いてゴルジ染色を行った (切片は 100 μ m 厚)。Bregma -2.52 ~ -3.60 mm の範囲で海馬 CA1 における錐体細胞の樹状突起にて 20 μ m の長さ存在するスパインの数を解析した。それぞれ合計で 24 本(1 匹につき 8 本で動物数は 3 匹)の樹状突起スパインを評価した。解析は rapid Golgi analysis method (PLoS One. 2014; 9(9): e107591)を参考に行った。

4. 研究成果

母子分離モデルにおいて以下のような影響が認められた。

1) 成熟後の行動異常

Shuttle Box test では両群間に成績の違いは認められなかった(data not shown)。一方で Radial maze test において、MD 群は短期記憶に相当する作業記憶に変化は認められなかったが、長期記憶に相当する参照記憶は有意に成績が低下していた (Fig.1)。明確な手掛かり(音-電気ショック)を指標とし扁桃体への依存性が高い Shuttle box test に比べて、Radial maze test は同じ学習試験でも空間的かつ長期的な記憶を評価できるものであり、海馬依存性が高い。それ故にこれら学習試験の結果は脳発達期の母子分離が海馬の神経回路網形成により大きな影響を与えている事を示唆するものである。

また、学習試験以外にも一連の行動試験結果から不安様行動の増加、社会性低下、攻撃行動の増加などの行動変化が認められたが、うつ様行動に有意差は認められなかった (data not shown)。

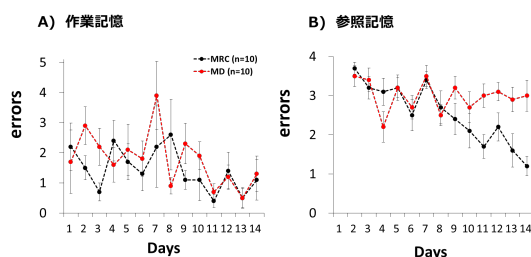


Fig.1: Radial maze test の結果

MD 群では作業記憶に変化は認められなかったが、参照記憶に関する成績が有意に低下していた。統計解析は repeated measures ANOVA で行った。Mean \pm SEM。

2) 脳発達早期での BDNF 発現低下

MD 群では、PD 7 において BDNF の mRNA 発現及びタンパク質発現が有意に低下していた。しかしながらその後は変化が見られず、PD 21 ではむしろ有意に増加していた(Fig.2)。この増加は、PD 21 は母子分離期間が終了した翌日である事を考えると、母子分離によって障害を受けた神経の修復などによる代償的な増加であると考えられる。一方で BDNF の受容体である TrkB は PD 10 に mRNA 発現の一時的な低下が認められるが、タンパク質発現に有意差は認められなかった。

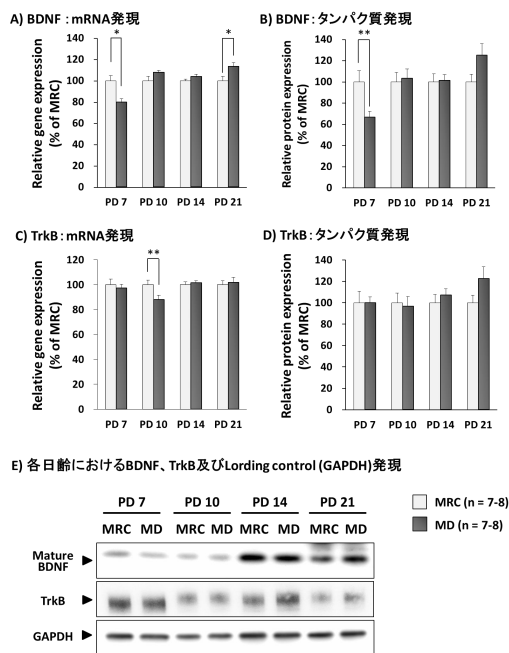


Fig.2: BDNF 及びその受容体(TrkB)の発現量

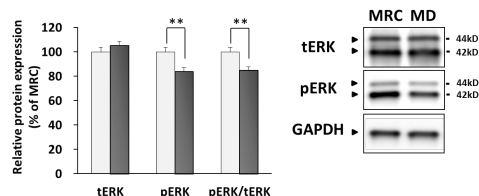
MD 群では生後早期における BDNF の mRNA 及びタンパク質発現の有意な低下が認められた。発現量は GAPDH で補正した。Mean \pm SEM, ***p < 0.05, 0.01 (student's t-test)。

3) 脳発達早期での BDNF シグナル低下

PD 7 において BDNF 発現量が低下している事から、そのシグナルが低下し下流で発現制御されている因子が影響を受けていると予想し BDNF-ERK シグナルについて解析した。ERK を解析すると total ERK (tERK)の発現に変化は認められなかったが、ERK 活性の低下 (phospho-ERK [pERK]の発現低下)が認められた(Fig.3)。更に BDNF-ERK シグナルによって発現制御されている最初期遺伝子群(BDNF exon4, Arc, c-Fos, Egr-1)の発現量もすべて有意に低下していた(Fig.3)。同じく BDNF によって発現が促進される GABA 合成酵素 (GAD65, 67)の発現も mRNA は有意に低下しており、タンパク質発現においてもより BDNF との関連性がより高い GAD65 で有意差が認められ抑制性ニューロン発達への影響が示唆された (Fig.4)。これらの結果から、母子分離は脳発達早期の BDNF シグナルを低下させ、その下

流で制御されている因子の発現を低下させている事が示唆された。

A) Total ERK (tERK) & phospho-ERK (pERK): タンパク質発現



B) 最初期遺伝子群: mRNA発現

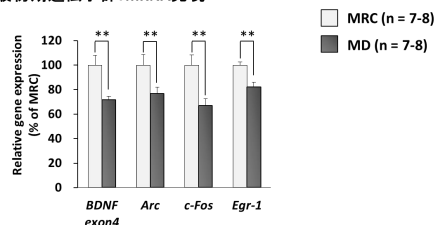
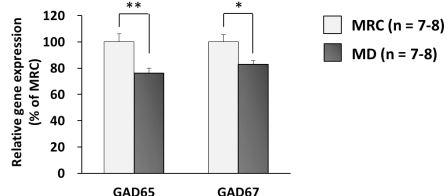


Fig.3: tERK/pERK、最初期遺伝子群の発現量

MD 群では tERK には変化は無かったが、pERK は有意に減少していた。更にそのシグナルに転写制御される最初期遺伝子群も有意に減少していた。発現量は GAPDH で補正した。Mean ± SEM, **p < 0.01 (student's t-test)。

A) GAD65, 67: mRNA発現



B) GAD65, 67: タンパク質発現

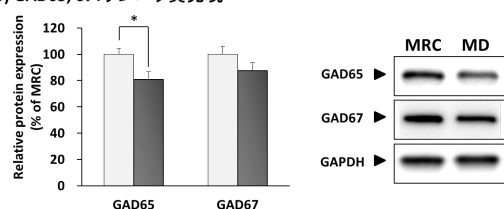


Fig.4: GAD 65, 67 の発現量

MD 群では GAD65, 67 の mRNA 発現量が有意に低下していた。またタンパク質発現量では GAD65 のみ有意に低下していた。発現量は GAPDH で補正した。Mean ± SEM, ***p < 0.05, 0.01 (student's t-test)。

4) 脳発達期での GluR1 過剰リン酸化

脳発達期における GluR1 発現には特に影響が認められなかった (Fig.5)。しかしながら PD 10 において phospho-GluR1 (GluR1-ser831, -845) の発現量が顕著に増加していた (Fig.6)。更にこの GluR1 のリン酸化に関与する細胞内シグナルとして CaMKII 発現を解析すると、CaMKII の過剰リン酸化が PD 10 で認められた (Fig.7)。本研究では、タンパク抽出の際に EDTA 及び EGTA を使用していないため今回得られた CaMKII リン酸化及び GluR1 リン酸化状態は in vitro での反応である可能性も否定できないが、同条件下での解析である事から少なくとも MD 群において PD 10 にこれらの因子が

過剰にリン酸化しやすい状態である事は間違い無い。脳発達期は PD 10 頃を中心として GluR1 の膜上発現が急速に増加し、GluR1 サブユニットを含む Ca 透過性の AMPA 受容体の膜上発現が増加する時期であり、それはシナプス形成に重要な意義を持つと考えられる (J Comp Neurol. 2006; 497(1): 42-60)。また脳発達初期段階である PD 12 以前はシナプスが形成と除去を繰り返しながら精練されていく時期であり、成熟後の学習等によって見られるような CaMKII を介した長期増強によるシナプス強化はあまり誘導される状態に無い事が指摘されている (J Neurophysiol. 2008; 100(5): 2605-14)。我々の結果でも MRC 群では PD 10 における CaMKII のリン酸化はそれ以後に比べてまだ発現量が少ない状態にある (Fig.7B)。過去の研究では生後早期 (PDs 1-7) の母子分離を受けた仔では PD 10 での CaMKII を介した長期増強が誘導されやすい事が報告されている (J Physiol. 2005. 569(3):789-99.)。これらの事から生後早期の母子分離は神経回路網の段階的な発達のバランスを攪乱し、通常とは異なる時期にシナプス形成に関する因子を過剰に活性化していると考えられる。

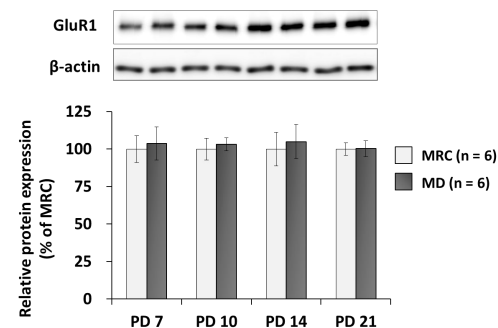
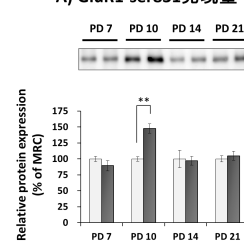


Fig.5: GluR1 の発現量

GluR1 の発現量には特に変化が認められなかった。発現量は β-actin で補正した。Mean ± SEM。

A) GluR1-ser831発現量



B) GluR1-ser845発現量

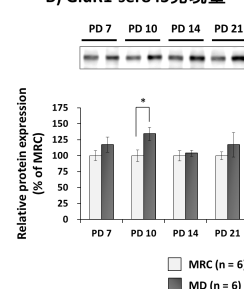


Fig.6: Phospho-GluR1 の発現量

MD 群では特に PD 10 で GluR1 の過剰なリン酸化が認められた。GluR1-ser831, 845 共に GluR1 で補正した。Mean ± SEM, ***p < 0.05, 0.01 (student's t-test)。

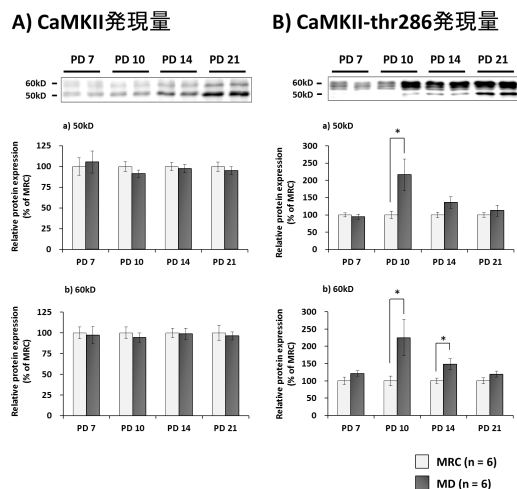


Fig.7: Phospho-CaM KII/CaM KIIの発現量
MD 群では特に PD 10 に CaMKII の過剰なリン酸化が認められた。CaMKII の発現量は β -actin で補正し、CaMKII-thr286 の発現量は CaMKII で補正した。60kD = CaMKII α , 50kD = CaMKII β 。Mean \pm SEM, * p < 0.05 (student's t-test)。

5) 海馬 CA1 領域の樹状突起スパイン減少

離乳直後での PD 21 の海馬では、MD 群でシナプトソーム膜画分の PSD95 発現が有意に減少していた (Fig.8)。PSD95 は興奮性シナプスにおける足場タンパク質であり、この減少は樹状突起スパインの減少を示唆するものである。そこで更に海馬 CA1 領域の錐体細胞における樹状突起スパインを解析すると、尖端樹状突起で有意にスパイン数が減少していた (Fig.9)。CA3 の錐体細胞や歯状回の顆粒細胞ではこのようなスパイン数の顕著な減少は認められなかった (更に個体数を増やしてより詳細な区分に分けて検討予定)。これらの結果から本研究における母子分離は海馬 CA1 領域の神経回路網形成に大きく影響を与える事が示唆された。

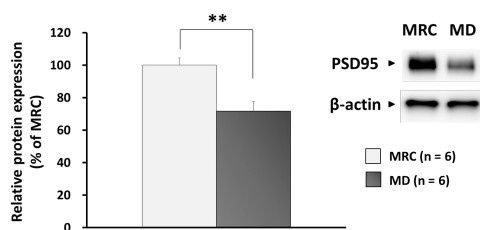


Fig.8: PSD95 の発現量
MD 群ではシナプトソーム膜画分における PSD95 の発現量が有意に減少していた。発現量は β -actin で補正した。Mean \pm SEM, ** p < 0.01 (student's t-test)。

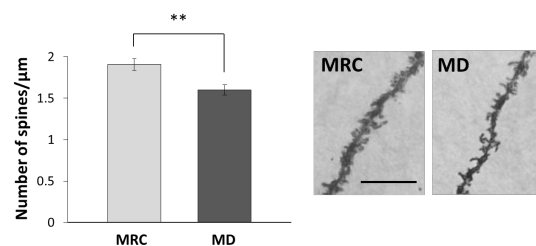


Fig.9: 海馬 CA1 における樹状突起スパイン
MD 群では海馬 CA1 の錐体細胞における先端樹状突起のスパイン数が有意に減少していた。Mean \pm SEM, ** p < 0.01 (student's t-test)。Scale bar = 10 μ m。

総括

本研究において、長期的な母子分離は海馬の神経回路網形成に影響を与える事、またその海馬に関連の深い学習能を低下させる事が示唆された。海馬における回路網形成に影響を与えた因子として、脳発達早期における BDNF の低下が関与していると推察される。発達早期における BDNF シグナルの低下は一過性であったが、この時期は bran growth spurt と呼ばれる急速なシナプス形成がなされる時期であり、その影響は大きい。特に PD 7 頃は海馬において機能的シナプスが形成され始める時期であり、この時期の BDNF は以降の GABA 作動性ニューロンの入力十分に発達する時期に比べて、ERK を活性化しやすく最初期遺伝子の発現を誘導しやすい事が報告されている (J Neurochem. 2011; 119(6): 1205-16)。そのため BDNF シグナルが十分機能しなかった事で初期段階でのシナプス形成が不十分となり、更に GABA 作動性ニューロンの発達にも影響を与えたのではないかと推測される。その一方で PD 10 では CaMKII と GluR1 の過剰リン酸化が引き起こされていた。この機序については更なる解析が必要であるが、少なくとも PD 10 のみの母子分離によるものでは無い事を確認しており (data not shown)、PDs 2-10 までの持続的な母子分離に起因した神経回路網発達への影響の結果である。またシナプス可塑性が高く形成/刈込みを繰り返す時期でこのような過剰なリン酸化が引き起こされると、過剰なシナプス強化・安定化が誘導されシナプスの精練を阻害し回路網の機能的な問題が引き起こされる可能性がある。実際にこの時期の GluR1 の過剰リン酸化はてんかんの関係性が指摘されている (J Neurosci. 2008; 28(32): 7979-90)。このようなシナプス形成に関連した因子の変化が PD 21 で認められた海馬 CA1 領域での樹状突起スパインの減少を引き起こしたと考えられる。樹状突起スパイン数の減少が認められた CA1 での錐体細胞の尖端樹状突起部分は CA3 におけるシャッファー側枝からの

入力を受ける部分であり、記憶・学習に重要な長期増強に関与する領域である。従って本研究で認められた学習能の異常は母子分離による海馬の神経回路網形成不全に起因している可能性が高い。今後はCA1領域に焦点を当てつつ、更に脳発達早期の回路網形成について詳細な解析を行っていく。

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4件)

1. Ohta K, Miki T, Warita K, Suzuki S, Kusaka T, Yakura T, Liu JQ, Tamai M, Takeuchi Y. Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *Int J Dev Neurosci*. 2014; 33: 15-21. (査読有)
2. Miki T, Yokoyama T, Kusaka T, Suzuki S, Ohta K, Warita K, Wang ZY, Ueki M, Sumitani K, Bellinger FP, Tamai M, Liu JQ, Yakura T, Takeuchi Y. Early postnatal repeated maternal deprivation causes a transient increase in OMPg and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination. *J Neurol Sci*. 2014; 336(1-2): 62-7. (査読有)
3. Miki T, Liu JQ, Ohta K, Suzuki S, Kusaka T, Warita K, Yokoyama T, Jamal M, Ueki M, Yakura T, Tamai M, Sumitani K, Hosomi N, Takeuchi Y. Early postnatal maternal separation causes alterations in the expression of β 3-adrenergic receptor in rat adipose tissue suggesting long-term influence on obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 442(1-2): 68-71. (査読有)
4. Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Liu JQ, Kusaka T, Suzuki S, Ohta K, Warita K, Jamal M, Ueki M, Yakura T, Hosomi N, Takeuchi Y. Differential effects of neonatal maternal separation on the expression of neurotrophic factors in rat brain. II: Regional differences in the cerebellum versus the cerebral cortex. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 2013; 90(3): 53-8. (査読有)

[学会発表](計7件)

1. Ken-ichi Ohta, Shingo Suzuki, Katsuhiko Warita, Takashi Kusaka, Takanori Miki: Early life stress reduces BDNF expression and its related factors in rat hippocampus during brain development. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会/第92回日本生理学会大会 合同大会, 2015年3月21-23日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
2. 加地智洋, 太田健一, 鈴木辰吾, 割田克彦, 三木崇範: 脳発達期の母子分離は海馬BDNF発現とその下流シグナルを低下させる. 日本解剖学会第69回中国・四国支部学術集会, 2014年10月25-26日, 広島大学(広

島県広島市)

3. 太田健一: ストレスが脳に及ぼす影響. 岡山県鍼灸マッサージ師会学術講習会, 2013年9月1日, 朝日医療専門学校岡山校(岡山県岡山市).
4. 三木崇範, 太田健一, 鈴木辰吾, 日下隆, 劉俊騫, 玉井求宜, 矢倉富子, 竹内義喜: 幼若期の不遇な養育環境が引き起こす脳発達臨界期 AMPA 受容体動態の異常. 第53回日本先天異常学会学術集会, 2013年7月21-23日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市).
5. 太田健一, 三木崇範, 鈴木辰吾, 矢倉富子, 劉俊騫, 玉井求宜, 竹内義喜: 母子分離が脳発達臨界期の海馬 AMPA 受容体リン酸化に与える影響. 香川脳神経研究会(第8回定例会), 2013年01月18日, リーガホテルゼスト高松(香川県高松市).
6. 太田健一, 三木崇範, 鈴木辰吾, 矢倉富子, 劉俊騫, 玉井求宜, 竹内義喜: 母子分離が誘因する成熟後の学習障害 - 脳発達臨界期 GluR1 動態からの考察 -. 包括的神経グリア研究会2013, 2013年01月12-13日, 館山寺サゴロイヤルホテル(静岡県浜松市).
7. 太田健一, 三木崇範, 鈴木辰吾, 矢倉富子, 劉俊騫, 玉井求宜, 竹内義喜: 母子分離ストレスが脳発達期の海馬 GluR1 発現/リン酸化へ及ぼす影響. 日本解剖学会第67回中国・四国支部学術集会, 2012年10月20-21日, 山口大学医学部(山口県宇部市).

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・助教
研究者番号: 50403720

(2)研究分担者

竹内 義喜 (TAKEUCHI YOSHIKI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 20116619

三木 崇範 (MIKI TAKANORI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 30274294

鈴木 辰吾 (SUZUKI SHINGO)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 50451430

割田 克彦 (WARITA KATSUHIKO)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 40452669

(3)連携研究者

日下 隆 (KUSAKA TAKASHI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 50274288