

子供の養育環境と精神神経発達分子基盤解明  
—母性剥奪症候群のエピジェネティック解析—

三木崇範、割田克彦、日下 隆、松本由樹、伊藤 進、竹内義喜  
(香川大学 医学部 神経機能形態学講座、小児科学講座)

<要 旨>

本研究は、生後早期の虐待やネグレクト、母性剥奪など「不遇な養育環境」を正常な脳発達を妨げる因子と捉え、ストレス環境で養育された動物の脳を解析することにより、発達途上にある脳のストレス脆弱性基盤を探り、養育環境が脳の発達に与える影響についての知見を得ることを目的とした。Wistar 系雄ラットを3時間/日・10–15日齢間母仔分離した。神経栄養因子のリガンド/レセプターの発現量変化の解析の結果、母仔分離群16日齢では、BDNF-TrkB systemの発現量が増加していたが、30日齢までには対照群と有意差を認めなくなった。一方、NGF-TrkA systemは、16日齢、30日齢、いずれの時点でも有意差を認めなかった。また、ミエリン構成たんぱく質OMgpの発現量は、これらの神経栄養因子と同様に、16日齢での増加の後、30日齢でコントロール値に戻った。これらの結果は、発達途上の脳の神経栄養因子の発現量は、母仔分離ストレスなどの養育環境に、影響を受け、これが構造的ひずみとなって、最終的に機能の異常—行動の異常を呈することを示唆する。

<キーワード>

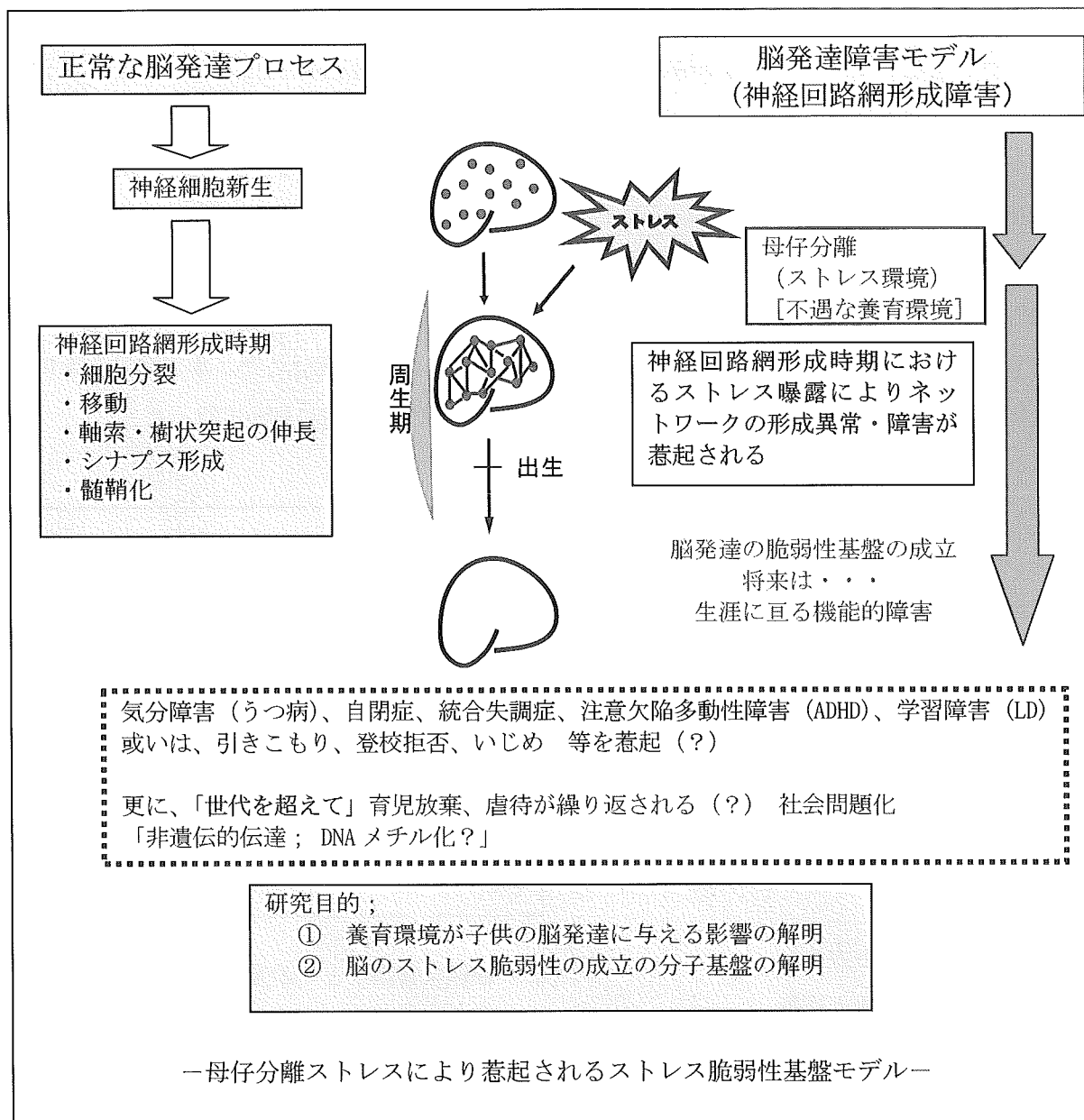
母仔分離 ストレス 脳発達 脆弱性分子基盤 ニューロトロフィン

【はじめに】

豊かな環境下（広い飼育籠・回転籠などの玩具・複数匹で飼育など）で飼育された実験動物の海馬神経細胞の新生数が増加することが報告され、神経細胞の可塑性と秘めたポテンシャルに驚嘆した。さらに、この事実は、養育環境が脳の発達に多大な影響を有することを示唆するものである。出生後早期に母親から引き離された（=悪い・不遇な養育環境）サルやラットにおいては、成熟後に攻撃的な性格を呈したり、不安行動が出現し易いとされる報告がある。この機序として、視床下部—下垂体—副腎系のストレス応答系が賦活化され、腎皮質刺激ホルモンやグルココルチコイドが上昇し、海馬・扁桃体などの大脳辺縁系の神経細胞の傷害を惹起するためとされている。この系以外にも、神経栄

養因子、神経ステロイド、生理活性アミン等も重要な役割を果たしていると推測されているが、その詳細は未だ明らかになっていない。

一方、現代社会に眼を向けると、子供の問題行動（きれる、いじめ、引きこもり、暴力行為、殺人、自殺等）に起因する事件や犯罪が後を絶たず、深刻な社会問題になっている一方で、親としての行動の異常、例えば養育・育児放棄や幼児虐待に留まらず、殺人にまで及ぶ事件が毎日のようにニュースになっている。これらの問題の原因には、予想をはるかに超えた複雑な要因が絡み合って発生しているものと推測される。我々はその原因として、脳発達時期の外因有害因子への曝露が、正常な脳神経回路網形成障害を惹起したためと推測している。つまり、神経回路網の形成過程にストレス曝露されると、



微細構造異常や分子レベルでの異常を惹起し、これが機能異常をきたし、最終的に行動異常として現れると推測しているが、その詳細には不明な点が多い。我々の研究グループは、「母性剥奪症候群」の実験動物モデルの作製に成功し、この動物における内分泌環境変化、神経栄養因子 BDNF mRNA 発現レベル、神経細胞数の変化を指標として解析してきた (Miki et al., 2003, 2004, 2005; Kuma et al., 2004)。本研究では、これまでの研究を発展させるために、生後早期

の母仔分離をストレスと捉え、周生期の母仔分離 (ストレス曝露) が脳発達に与える影響について、分子生物学的手法で解析することで、原因解明に繋げたいと考える。

母子分離などの悪い養育環境が、子供の脳発達への影響についての研究は限られているばかりでなく、次世代への影響に関する研究は数少なく、養育環境が子供の脳発達に与える影響を神経科学的に捉えようとする動きは今始まったばかりである。一方、母性行動・養育行動の発

現に関しては、古くはオキシトシンやプロラクチン、バゾプレッシンなどの内分泌機構の養育行動への関与が示唆されていたが、近年 がん遺伝子に1つ fos B 遺伝子が関与して、この遺伝子の産物(FOS B) や immediate early gene の1つ jun 遺伝子産物(JUN 蛋白質)が受容体を介して母性行動が成立しているという報告が破壊実験により行われているが詳細は、ほとんど明らかにされていない。

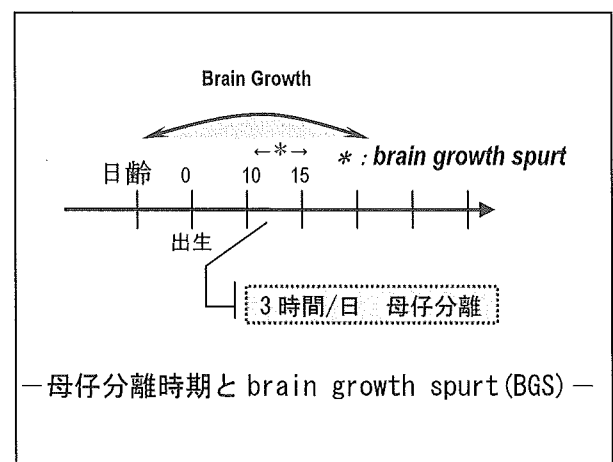
我々は、母親の「愛情のこもった働きかけ」に、その子の成長と、その後の母性確立・維持のために、想像をはるかに超えた影響力(母子間相互作用)が秘められていると推測に基づき研究を遂行するものである。本研究では、母仔分離による、仔脳発達への影響を、神経栄養因子(NGF、BDNF、)とその受容体(TrkA、TrkB) mRNA の発現レベルを指標にして解析することとした。

## 【材料と方法】

### 1. 母仔分離モデル動物の作製

我々が先に確立した、母仔分離モデル動物の作製法に準じてモデル動物を作製した(Kuma et al., 2004)。Wistar 系妊娠ラット(SLC Japan)を自然分娩させた。ラット新生仔は出生日を0日齢(postnatal day, PND0)と定めた。ラットにおける脳発育のピーク brain growth spurt (BGS)は、4-9日齢(postnatal day, PND)とされている。本研究では分離期間は、ラット BGS を考慮して以下のように設定する。トリメスター(3期)期間中の後半に相当する PND10-15 間、3時間/日、毎日母仔分離する(maternal deprivation, MD)。3時間の分離期間中以外は、母獣と一緒に飼育した。コントロール群として、

実験期間中、母獣と仔動物と一緒に飼育した群(mother-reared control, MRC)を設けた。いずれの群も、離乳は21日齢に行った。我々のこれまでの先行研究(Miki et al., 2003, 2004, 2005, 2007; Kuma et al., 2004)では、分離期間を10-15日齢としているため、先行データとの比較検討の可能性を鑑み、本研究では、分離期間を10-15日齢とした。本実験は、香川大学動物実験倫理規定に則って行った。

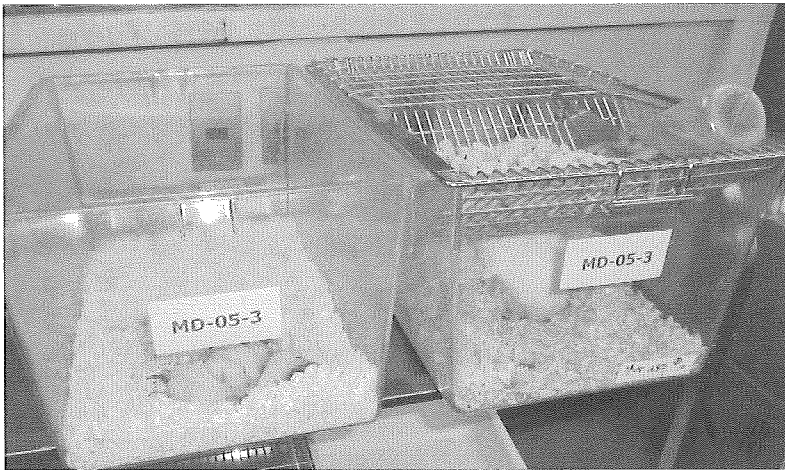


### 2. 神経栄養因子とその受容体の解析

MD群、MRC群それぞれ、16日齢と30日齢において、抱水クロラルで深麻酔を行い、開胸後、血液サンプルを採取した。その後、生理食塩水で、経心臓的に全身灌流を行い、脳の血液をウォッシュアウトした。その後、迅速に脳を取り出し、ライカ製ビブラトームを用いて、約1mmの水平切片を作製した。さらに4℃に冷却した生理食塩水中で、実体顕微鏡を用いて、脳の組織を摘出した。取り出した脳サンプルは、RNAlater処理、次いでTRIzol (Invitrogen)処理を経て、total RNAを抽出した。

### 3. real-time RT-PCR 解析

1μgのtotal RNAをReady-To-Go You-Prime



—母仔分離中の新生仔ラット—

First-Strand Beads (GE Healthcare) を用いて、cDNA に逆転写した。Real-time TR-PCR は LightCycler rapid thermal cycler system (Roche Diagnostics) で行った。反応の詳細は、我々の先行報告 (Kuma et al., 2004) に従い、LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I mix (Roche Diagnostics) を使用した。用いたプライマーセットは以下のとおりである。PCR 増幅プロトコールは以下の通りである。1 サイクル 95 ° C 10 m、次いで 45 サイクル PCR を以下のように行た ; 10 s denaturing 95° C、10 s annealing 56° C (BDNF)、62° C (Trk B)、59° C (NGF)、62° C (TrkA)、20 s 伸長 72° C。

予備実験で、種々の house keeping gene を内部標準候補として解析下結果  $\beta$ -actin が最も相応しいことが判明したため、本研究では、 $\beta$ -actin を内部標準とし毎回共増幅した。PCR プライマーセットを次に示す。

NGF (gne accession number NM\_013609)

5' -CAGACCCGGAACATCACTGTA-3'

5' -CCATGGGCTGGAAGTCTAG-3'

BDNF (gne accession number NM\_007540)

5' -GGTATCCAAAGGCCAACTGA-3'

5' -CTTATGAATCGCCAGCCAAT-3'

TrkA (gne accession number NM\_85214.1)

5' -GAGGTCTCTGTCCAAGTCAGCG-3'

5' -GTCGTTAGTGTCCACTGGCGA-3'

TrkB (gne accession number NM\_008745)

5' -CGCCCTGTGAGCTGAACTCTG-3'

5' -CTGCTTCTCAGCTGCCTGACC-3'

$\beta$ -actin (gne accession number NM\_007393)

5' -AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'

5' -TTTGATGTCACGCACGATTT-3'

得られた PCR 産物は、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、ゲノムのコンタミネーションがないことを確認した。さらに、融解曲線解析 melting curve analysis を行い、所定のサイクル数内でプライマーダイマーが存在しないことを確認した。得られた、個々のデータは house keeping gene  $\beta$ -actin との比で標準化した。

#### 4. 統計解析

データは、平均 Mean ± 標準誤差 SE (standard error) で記し、すべての統計処理は Student' s t-test ( $p < 0.05$ ) を適用し SigmaStat (Systat Software, version 3.0) を用いて行った。

## 【結果】

### 1. 血中コルチゾール

母仔分離期間中の仔の血液を解析した結果、MD 群の動物においては、ストレスホルモンとされる corticosterone (cortisol) の分泌量が、MRC 群と比較して、有意に増加していた (Student' t t-test,  $P < 0.05$ )。

### 2. 血中サイトカイン

サイトカインでは、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の測定を行った結果、有意に増加したのは、IL-6 であった (Student' s t-test,  $p < 0.05$ )。他のサイトカインには有意な変化を呈さなかった。

### 3. 小脳神経栄養因子リガンド/レセプターと OMgp mRNA 発現量

MD 動物小脳における、脳由来神経栄養因子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) と高親和性受容体 TrkB の解析では、BDNF と TrkB 共に 16 日齢において、mRNA 発現量が MRC 群に比して増加していた (Student' s t-test,  $p < 0.05$ )。30 日齢になると、両群に有意差は認めなくなっていた。一方、神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) と高親和性受容体 TrkA の解析では、16 日齢、30 日齢いずれも両群に有意差を認めなかった。さらに、神経ミエリン構成タンパク質 Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein, OMgp mRNA を解析した結果、MD 群では、MRC 群に比較して 16 日齢で有意に増加していたが (Student' s t-test,  $p < 0.05$ )、30 日齢では両群に有意差を認めなかった。

## 【討論とまとめ】

Maternal deprivation syndrome (MDS) は、ステッドマン医学大辞典によると、母性剥奪症

候群、或いは愛情剥奪症候群と訳され、「乳幼児に見られる成長障害で一群の身体徴候、症状、行動を呈し、多くは母性の喪失、不在、母親から無視される状態に伴って起こり、周囲に対する反応の欠如が特徴的で、しばしばうつ状態にある」と記載されている。すなわち、この定義によると、新生仔と母親を分離して養育することにより、児に惹起される様々な陰性症状発達障害の総称ともいえよう。我々は、MDS の実験モデル動物の作製に成功し、母仔分離ラットの海馬における錐体細胞・顆粒細胞を指標として研究解析してきた。本研究は、これまでの研究を、分子生物学的手法を用いることで、更に発展させる位置付けとしている。

過去約 15 年以降の文献を遡り検索してみると、脳の発達と (実験動物) 飼育環境との相互・相関関係を研究背景としたものが、急激に増加している。特に豊かな環境 (enriched environment) 下で飼育された実験動物の神経系の可塑的变化を焦点に当てた研究が目立つ。その中で、注目されるのは Kempermann (1997) の報告で、豊かな環境 (飼育ケージ内に玩具を置く、複数匹飼育) で飼育された実験動物では、海馬神経細胞の新生数が増加することに関する報告である。この事実は、養育環境が脳発達に非常に重要な影響を及ぼしていることの証明である。これとは逆の観点から、養育環境の重要性を考察してみると、出生後早期に母獣から引き離され悪い環境で育ったサルやラットに見られる、成熟後の攻撃的性格や不安行動に内分泌環境の変化や大脳辺縁系神経細胞の傷害を原因とする説があるが詳細な機構はいまだ不明である。当然ながら、内分泌系以外の様々な因子も少なからずこの現象に関与していることが推測

される。

中枢神経系 (CNS) の発生・発達の特徴は、固体発生上個体発生上最も早期に始まるばかりでなく、発達が出生後長期に亘って続くことで完成されることである。まず神経新生 (neurogenesis) が脳の各部位で起こる。これらの新生細胞は、将来定着すべき位置に移動 (migration) する。その後、これらの神経細胞は神経突起 (樹状突起や軸索) を伸長 (elongation) して必要なシナプス形成 (synaptogenesis) を行う。シナプスは、当初多く作られるが、その後の刈り込みによって、不要なシナプスは消退してしまう。更に、神経軸索の髄鞘化 (myelination) が起こり、情報・インパルスの伝導の効率化が図られるようになり、最終的にニューラルネットワークが形成される。このように、複雑で複数段階を経て神経回路の形成が行われるのが脳発生・発達の特徴である。

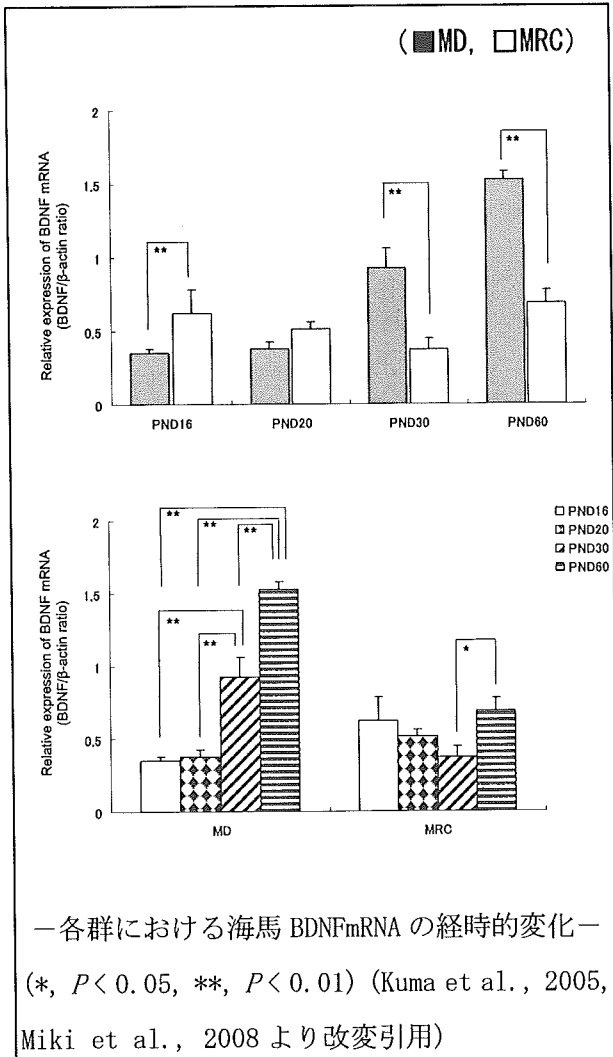
脳発達を考えるとときに、Rodier の唱える、領域特異的脳発達のピークと Dobbing & Sands と唱える BGS の概念が非常に重要である。脳発達には、ピークがあることが広く知られている。まず、Dobbing & Sands は brain growth spurt (BGS) の概念を出生を重要なタイムポイントとして発達ピークの種特異性を報告している。通常 brain growth spurt の時期は、動物の種により異なっているが、外部からの有害因子に対して、非常に脆弱な時期であることは共通認識とされている。脳発達時期は、固体発生上非常に重要な時期であることから、様々な種類の環境有害因子に曝露されることにより容易に正常な脳の発達が妨げられる可能性がある。

脳発達の特性は、脳を構成する様々な種類の

神経細胞が、1) 複数の部位で 2) 同時進行で 3) 非常に厳密なタイムスケジュールに則って、発生・発達が進行することにある。すなわち、脳の発生と発達には、時間 (発達) 因子に加えて、領域及び神経細胞種特異性があることである。例えば、ラットやマウス海馬の錐体細胞、小脳プルキンエ細胞、大脳皮質の神経細胞は、胎生期に新生されるが、海馬、嗅球、小脳の顆粒細胞は出生後数週間に亘って新生されるという特徴を持つ。このように、脳の部位、神経細胞の種類によって、神経新生の時期が異なっている。更に、脳は神経解剖学的に多数の領域から構成されているのみならず、これらの領域間で神経線維の連絡を有している。このような解剖学的・構造的な特徴は、脳の機能発達を一層複雑・難解なものにしている。

これまでの我々の研究で以下のことが明らかになった。海馬 BDNF mRNA の発現量は、MD 群は PND16 時点では、MRC 群に比べて有意に減少していたが、PND30 においては、その値が逆転して増加している結果を得た。さらに母仔分離後の海馬 BDNF mRNA の経時的変化を PND 16、20、30、60 の 4 時点において解析した結果、PND16 時点で、MD 群の海馬 BDNF mRNA は、MRC 群に比較して、減少していたが、PND20 で両群に有意差を認めなくなり、更に PND30 と PND60 では、その差異が逆転し、有意に増加する結果を得た (Kuma et al., 2005, Miki et al., 2008) (次図参照)。

以上を踏まえて、今回の研究で得たデータを考察する。神経栄養因子は、NGF、BDNF に限らず、神経系の正常な発達に欠くことの出来ない生理活性物質の 1 つであることには異論は無い。正常な発生・発達過程においては、神経栄養因子は、必要な時に必要な量存在することが重要



である。例えば、BDNF は神経細胞の成長、特に神経突起の伸長に深く関わっている物質である。このことは、BDNF は神経回路網の形成に非常に重要な役割を果たしていることの証でもある。BDNF がその名の通り、神経を栄養する因子であるとしても、正常範囲を超えて存在したとすれば、有害な作用をもたらすことが予想される。つまり、脳の神経機能の大役を担う神経突起の伸長の具合（速度）如何では、神経発達のバランスが大きく変わってしまう可能性がある。例えば、神経突起が伸張して、別の神経細胞の突起にシナプスを形成するとして、突起の伸長の具合をコントロールしている因子としての

BDNF の多い、少ないで突起の伸長の割合・スピードが容易に変わってしまうことが予想される。先に述べたように、神経回路網が、複数の部位で、同時進行で、さらに厳密なタイムスケジュールに則って進行していることを鑑みると、突起の伸長の具合が変わってしまうと、シナプスを形成する部位も変わってしまうと予想される。つまり、絶妙なバランスの上に成り立つ神経回路網は、突起の伸長や神経栄養因子などの些細なタイミングのズレで、構造的変化を惹起し、これが最終的に機能につながると予想される。一方、OMgp の変化に関しても、ミエリンの発達・機能の障害を示唆するものであり、これはヒト発達障害脳における髄鞘化不全の所見に合致するものである。更に、このような変動は、髄鞘化のタイミングにも少なからず影響を及ぼす可能性を有し、神経栄養因子の変化と同様に、最終的には、機能的歪を惹起すると予想される。

我々は、母仔分離動物の海馬における神経回路網の異常を示す証拠として、海馬歯状回の顆粒細胞軸索終末（苔状線維）の異常な分布を示すデータを得ている（未発表）。顆粒細胞軸索中の亜鉛を Timm 染色すると、正常では弧をなす CA-3 錐体細胞層の内側に軸索終末がみられるが、母仔分離した動物では、錐体細胞層外側に異所性軸索終末を認めている。

今回の結果と我々が報告してきたデータを併せると、神経栄養因子を代表とする、神経発達に欠かせない因子がどういう形であれ、正常から逸脱して増減すると、非常に正確で厳密なタイムテーブルに沿って進行する神経系の発生・発達に、微細な構造的変化を惹起し、それが最終的には機能の異常つまり行動の異常に繋がるものと予想される。脳の発達時期に、より

より養育環境が提供されることが、身体的にも精神的にも健全な次世代を育む不可欠であるといえる。

#### 【今後の展望】

経験的に「母親からよく養育された子は、また子をよく養育する」と言われる。この現象は「養育の非遺伝的伝達」と解釈されている。つまり、DNA 遺伝情報を介することなく、次世代に非常に高い確率で伝達されるのである。つまり、子供の頃に自分が受けた、養育環境の良し悪しが、非遺伝的に次世代に伝達されるとされている。更に、問題を複雑にしているのが、このような伝達様式で伝わった情報が、何らかの形でその固体脳に生涯に亘って永続的に影響を及ぼすことである。現在、この機序として、養育に関与する非遺伝的記憶に DNA のメチル化やアセチル化などの関与が提唱されてはいるが、その全容解明には不明な点が山積されている。DNA のメチル化やアセチル化は、外部環境によって DNA が修飾されてしまう現象である。今後は、遺伝-環境相互作用の観点から、研究を進めて行く予定である。最後に、「次世代を担う子供たちの健全な成長」を願ってやまない。

#### 【参考文献】

Barker DJP. Mothers, Babies and Health in Later Life. Churchill Livingstone ; 2nd edition. 1998.

Bedi KS. Nutritional effects on neuron numbers. Nutr Neurosci 2003 ; 6 : 141-152.

Cirulli F, Micera A, Allegra E, Aloe L. Early

maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. Pharmacol Biochem Behav 1998 ; 59 : 853-858.

Das KP, Chao SL, White LD, Haines WT, Harry GJ, Tilson HA, Barone S Jr. Differential patterns of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA and protein levels in developing regions of rat brain. Neuroscience 2001 ; 103 : 739-761.

Hall FS, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW. Maternal deprivation of neonatal rats produces enduring changes in dopamine function. Synapse 1999 ; 32 : 37-43.

Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. Brain Res 2002 ; 950 : 52-63.

Jahnke S, Bedi KS. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. Brain Res 2007 ; 1143 : 60-69.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature 1997 ; 386 : 493-495.

Kuma H, Miki T, Matsumoto Y, Gu H, Li HP,



Kusaka T, Satriotomo I, Okamoto H, Yokoyama T, Bedi KS, Onishi S, Suwaki H, Takeuchi Y. Early maternal deprivation induces alterations in brain-derived neurotrophic factor expression in the developing rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2004 ; 372 : 68-73.

Labelle C, Leclerc N. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Dev Brain Res* 2000 ; 123 : 1-11.

Dobbing J, Sands J. Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child* 1973 ; 48 : 757-767.

Miki T, Harris SJ, Wilce P, Takeuchi Y, Bedi KS. Neurons in the hilus region of the rat hippocampus are depleted in number by exposure to alcohol during early postnatal life. *Hippocampus* 2000 ; 10 : 284-95.

Miki T, Harris SJ, Wilce PA, Takeuchi Y, Bedi KS. Effects of alcohol exposure during early life on neuron numbers in the rat hippocampus. I. Hilus neurons and granule cells. *Hippocampus* 2003 ; 13 : 388-398.

Miki T, Harris SJ, Wilce PA, Takeuchi Y, Bedi KS. Effects of age and alcohol exposure during early life on pyramidal cell numbers in the CA1-CA3 region of the rat hippocampus. *Hippocampus* 2004 ; 14 : 124-134.

Penke Z, Fernet B, Nyakas C, Max JP, Burette A. Neonatal maternal deprivation modifies feeding in response to pharmacological and behavioural factors in adult rats. *Neuropharmacology* 2002 ; 42 : 421-427.

Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry* 2004 ; 55 : 708-714.

Rodier PM. Chronology of neuron development : animal studies and their clinical implications. *Dev Med Child Neurol* 1980 ; 22 : 525-545.

Wigger A, Neumann ID. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 1999 ; 66 : 293-302.

ステッドマン医学大辞典 改訂第5版、電子辞書版、セイコーインスツル株式会社 2007.