



Title	育児放棄モデルマウスの病態分子機序の解明
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101273
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	うえはら ゆか 上原 由華	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4 年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	田熊 一敞 / 早田 敦子	所属	歯学研究科		
研究課題名	育児放棄モデルマウスの病態分子機序の解明				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【研究目的】

育児放棄は、児童虐待の一形態であり、身体的、性的、心理的虐待とともに大きな割合を占め、その相談件数は年々増加し大きな社会的な問題になっている。児童虐待では、多動や攻撃行動、不安症状、前頭前野の容積減少など、脳の構造や機能に異常が生じていることが報告され、様々な精神疾患の発症増加との関連が懸念されている。これまでの基礎研究においては、麻布大学の菊水らが育児放棄モデルとして作製したマウスにおいて、不安様行動 (1) やコルチコステロン分泌量の上昇 (2) を報しているが、育児放棄といった発達期の環境ストレスが脳機能異常を惹起する分子機序は未だ明らかではない。申請者は令和5年度の歯学部基礎配属実習で、育児放棄モデルとされる早期離乳マウスを用いて行動解析を行い、幼弱期の攻撃性と成年期の多動性と不安行動を認めた。

そこで本研究課題では、この早期離乳マウスを用いて、情動行動変化の発現に関わる脳内の病態分子機序を追究することを目的とした。

【研究計画】

本研究課題では、早期離乳を施した雄性マウスを用いて、行動解析の例数を追加して情動行動変化について更なる検証をするとともに、生化学的解析、遺伝子発現解析、免疫組織化学的解析ならびに細胞形態学的解析を行い、病態発現に関わる分子基盤の解明を試みた。

【研究方法】

1. 実験動物

妊娠16日目のICR系マウスを日本エスエルシー(株)(静岡)より購入して用いた。マウスは室温 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm10\%$ 、明期・暗期それぞれ12時間の条件下で飼育し、実験開始までの期間は自由に飲水および節餌が行えるようにした。

2. 早期離乳マウスの作製と解析スケジュール

出産後、同腹の雄性の仔マウスを無作為に2分し、通常離乳群 (Normal Weaning: NW) は生後21

日目に離乳をし、早期離乳群（Early Weaning: EW）は生後14日目に離乳した。離乳後、8週齢（P56）まで1週間ごとに体重を測定した。4週齢時と8週齢時に行動実験を行い、その後、各種解析用のサンプル調製を行った（Fig. 1）。

3. 行動解析

3-1. オープンフィールド試験

中心部の照度を40 lxとした塩ビ製ボックス（30 cm×30 cm×30 cm）の中央に被験マウスを入れ、20分間の自由探索行動をビデオ録画し、ANY-maze Video Tracking Software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) を用いて解析した。総移動距離より自発運動量を評価し、また中央区画侵入回数および中央区画滞在時間を指標として不安様行動を評価した。なお、ボックス底面の中央部（全体面積の30%）を中央区画と定義した。

3-2. 社会的相互作用試験

被験マウスをホームケージで1時間馴化させた後、ケージ内に初めて遭遇するマウス（侵入マウス）を入れ、20分間の自由行動をビデオ録画した。侵入マウスに対する被験マウスの匂い嗅ぎ行動時間を社会性行動の指標とし、また、侵入マウスに対する被験マウスの噛みつき行動時間を攻撃行動の指標としてそれぞれ評価した。

3-3. 高架式十字迷路試験

装置は、それぞれ走路幅5 cm、長さ30 cmの灰色不透明の直交する2本のオープンアームと2本のクローズドアームからなり、クローズドアームには高さ20 cmの不透明の側壁を付け、40 cmの高さに設置した。装置の中央に被験マウスの頭がクローズドアームの方向となるように置き、その後5分間の自由行動をビデオ録画した。オープンアーム侵入回数、オープンアーム滞在時間、オープンアームに初めて侵入するまでにかかった時間を不安様行動の指標として評価した。

3-4. 断崖回避試験

装置は、50 cmの高さに直径8 cmのステージを設置し、中心部の照度を40 lxとした。被験マウスの後脚がステージに乗るように置き、15分間の自由行動をビデオ録画した。飛び降り行動を衝動性の指標として評価した。

4. 血清コルチコステロン濃度の測定

行動解析後に血漿標品を調製し、血清コルチコステロン濃度をCorticosterone ELISA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を用いて定量した。

5. 遺伝子発現変動の解析

行動解析後に全脳を摘出し、標的の脳領域からtotalRNAを抽出し、M-MLV Reverse Transcriptaseを用いて逆転写した。得られたcDNAをGoTaq® qPCR Master MixならびにTable 1の各プライマーセットを用いて増幅させ、CFX96 real-time PCR detection systemにて遺伝子発現の変化を定量解析した。なお、遺伝子発現量はGAPDHにより標準化した。

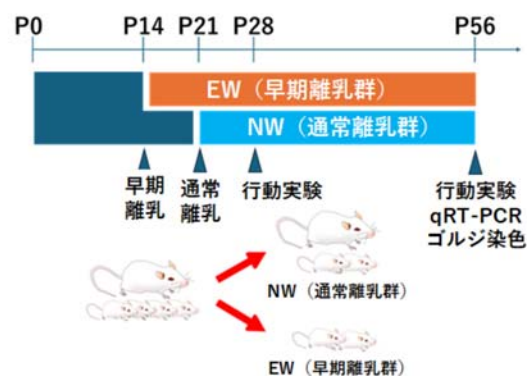


Fig. 1. 育児放棄モデルマウスの作製と実験スケジュール

Table 1. qRT-PCR解析に使用したプライマーセット

Gene	Direction	Oligonucleotide sequence (5'→3')
Gapdh	Forward	GTGTTCCCTACCCCAATGTG
	Reverse	TACCAGGAAATGAGCTTGAC
Aromatase	Forward	CGGGCTAGTGGATGTGTT
	Reverse	GAGCTTGCCAGGCGTTAAAG
Bdnf	Forward	GTGACAGTATTAGCGAGTGGG
	Reverse	GGGTAGTTCGGCATTGC
Oxytocine	Forward	CACCTACAGCGGATCTCAGAC
	Reverse	CGAGGTCAGAGCCAGTAAGC
Pacap	Forward	GCCCGTGTCTACTTAGTC
	Reverse	AGGTGAACAGGAGACTGCT

6. 樹状突起スパインの計数

FD Rapid GolgiStain Kit™ (FD NeuroTechnologies Inc., Columbia, MD, USA) を用いたゴルジ染色法により行った。行動解析後に摘出した脳組織をキットのプロトコールにしたがって、浸潤後、3.5%アガロースゲルを用いて包埋し、ビブラトームを用いて厚さ 100 μm の冠状切片を作製した。得られた切片を Gelatin-Coated Microscope Slides に張り付け風乾させ、キットのプロトコールにしたがって神経細胞を染色した。エタノールおよびキシレンを用いて脱水、透徹し、Mount-Quick にて封入した。Neurolucida® (BMF Bioscience, Williston, VT, USA) を用いて神経細胞の樹状突起長や複雑性、樹状突起スパイン数を計測した。

7. 統計解析

データは全て「平均値 $\pm$ 標準誤差」として算出し、統計解析ソフト Prism 10 (GraphPad Software, Boston, MA, USA)を用いて統計解析を行った。2群の比較は対応のない t 検定により行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

【研究成果】

1. 早期離乳が仔マウスの情動行動に及ぼす影響

オープンフィールド試験において、4週齢時と8週齢時ともにEW群ではNW群と比べて、総移動距離が有意に増加していることを認めた。中央区画侵入回数および中央区画滞在時間については両群に差は認められなかった。社会的相互作用試験においては、4週齢時と8週齢時にEW群で匂い嗅ぎ行動時間が有意に増加していることを認めた。一方、噛みつき行動時間については、4週齢時に増加傾向 ($p = 0.1094$) が見られたが、8週齢時には消失していた。8週齢時のみに実施した高架式十字迷路試験において、オープンアーム侵入回数、オープンアーム滞在時間ならびにオープンアームに初めて侵入するまでにかかった時間のいずれについてもEW群とNW群の間に差は認められなかった。さらに8週齢時に断崖回避試験を行い、ステージから飛び降りたマウスの匹数割合がEW群で有意に高いことを認めた。行動解析結果のまとめを Table 2 に示す。

Table 2. 行動解析結果のまとめ

	自発運動量		不安様行動		社会性行動		攻撃行動		衝動性
	4週齢	8週齢	4週齢	8週齢	4週齢	8週齢	4週齢	8週齢	8週齢
NW群に対するEW群の変化	↑*	↑**	変化なし	変化なし	↑*	↑*	↑	変化なし	↑**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. NW mice, unpaired t -test.

2. 早期離乳が仔マウスの血清コルチコステロン濃度に及ぼす影響

行動解析後に調製した血清において、EW群とNW群のコルチコステロン濃度に差は認められなかった。

3. 早期離乳が仔マウス脳の遺伝子発現に及ぼす影響

行動解析後に調製した内側前頭前皮質 (mPFC) 由来 cDNA においてストレスや愛着、樹状突起スパインの維持・形成に関わる分子の遺伝子発現変化を qRT-PCR にて解析したところ、EW群において、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) と脳由来神経栄養因子 (BDNF) の mRNA 量の有意な増加を認めた。また、アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であるアロマターゼの mRNA 量

については減少傾向 ($p = 0.1629$) を認めた。一方で、オキシトシンの mRNA 量には変化が認められなかった (Table 3)。

Table 3. 各標的遺伝子産物のmRNA発現量の変化

標的遺伝子産物	PACAP	BDNF	アロマターゼ	オキシトシン
NW群に対する EW群の変化	* ↑	** ↑	↓	変化 なし

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. NW mice, unpaired t -test.

4. 早期離乳が仔マウス脳 mPFC 領域の神経細胞の形態に及ぼす影響

行動解析後に mPFC 領域を含む脳組織の超薄切片を作製し、Golgi 染色を施し (Fig. 2A), 第5層の錐体細胞における樹状突起の複雑性の解析と樹状突起スパイン数を計数した。EW マウスにおいて、先端樹状突起の複雑性の低下傾向 ($p = 0.2053$) を認め (Fig. 2B), 樹状突起スパイン密度の増加傾向 ($p = 0.0866$) を認めた。

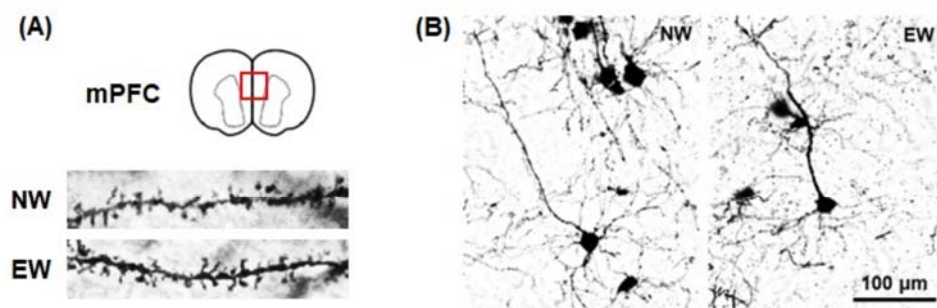


Fig. 2. 育児放棄モデルマウス脳のmPFC領域における神経形態学的変化
(A) 典型的な樹状突起スパイン像, (B) mPFC領域の第5層のゴルジ染色画像

【考察と今後の展望】

幼児期の育児放棄の模倣を目的として作製した早期離乳マウスにおいて、まず、多動と社会性行動の増大という情動行動変化の再現性を確認した。また、脳の神経科学的解析により、社会性に関わる脳領域として知られる mPFC において、第5層錐体細胞の樹状突起スパインの密度増大の傾向を認めた。mPFC 領域の樹状突起スパイン形成が精神疾患と関連することが示唆されている既報 (3) を考え合わせると、mPFC 領域での神経形態学的変化が早期離乳マウスの情動行動変化をもたらしたことが推察された。また申請者は、早期離乳マウスの mPFC 領域で PACAP と BDNF の mRNA 発現量が増加していることを見いだした。これらの知見より、幼若期の早期離乳が mPFC 領域の PACAP や BDNF の発現変化を介して、持続的な脳機能変化をもたらすことが示唆された。今後の展望として、客観的評価の乏しい育児放棄による脳機能への影響について、PACAP および BDNF がバイオマーカーとして扱えるか否かを追究したい。

【参考論文】

(1) Kikusui et al. (2004) Physiol Behav 81:37-42, (2) Kikusui & Mori (2009) J Neuroendocrinol 21:427-431, (3) Glantz & Lewis (2000) Arch Gen Psychiatry 57:65-73.