幼少期ストレス負荷による情動行動の変化

菊水 健史, 茂木 一孝

要約: 動物, 特にヒトを含む哺乳類における子の発達で最も特徴的な点は, 発生初期を母親の胎内で過ごし, 出生後においても哺乳行動を中心とした母子間のつながりが強いことである。この期間に子が母親から受ける様々な刺激は, 身体発達に多大なる影響を与え, 個体の内分泌系や行動様式に長期的な変化を引き起こす。ゆえに, 哺乳類の発達期の社会環境は, 個体の獲得するエピジェネティックな変化の解明において, 最も重要な要素だといえる。このような発達期の社会的要素の一つとして, 離乳が挙げられる。これまで離乳の早期化が, 仔マウスの成長後の不安行動の増加, 情動反応を変化させること, また早期に離乳された雌マウスでは, 自分が母親になった際にも通常に離乳された雌マウスに比べ, 排泄を促すためや母乳を飲むよう促すための仔をなめる行動の時間が短くなることが明らかとなった。そこで本稿では, 早期離乳による情動行動の変化に加え, その神経機能の変化に関し, 特に前頭葉に注目した最近の知見を紹介する。C57BL/6 マウスを用い, 生後 15 日で親から離乳する早期離乳を施し, 成長後に高架式十字迷路試験による不安行動評価, 恐怖条件付け試験による恐怖記憶の消去抵抗性評価を行った。そして, 前頭葉における脳由来神経栄養因子 (BDNF) タンパク質発現測定, 各プロモーター由来 BDNF mRNA 発現量測定を行い, その背景となる分子メカニズム同定を試みた。その結果, 恐怖条件付けを受けた早期離乳マウスでは消去学習過程における消去の抵抗性が増加し, 前頭葉の BDNF III mRNA 及び BDNF タンパク質が低下した。さらに, これらの間には負の相関もみられたことから, 早期離乳による恐怖記憶の消去抵抗性には, 前頭葉における BDNF III mRNA の発現低下を介した BDNF 作用の減弱が関わっていることが予想された。これらの知見は, 幼少期の早期の母子分離が

永続的な前頭葉の BDNF を介した機能不全を導くことを示唆し, 早期離乳マウスがヒトにおける前頭葉の機能不全のモデルとなる可能性を示した。

1. 発達環境のストレスと成長

ヒトを含む哺乳動物における子の発達で, 最も特徴的な点は, 発生初期を母親の胎内で過ごし, 出生後においても哺乳行動を中心とした母子間のつながりが強いことである。この期間に子が母親から受ける様々な刺激は, 発達メカニズムに多大なる影響を与え, 生体の内分泌系や行動様式に長期的な変化を引き起こす。ゆえに, 哺乳類における発達期の社会環境は, 哺乳類の発達メカニズムの解明にあたって, 最も重要な要素を担っているといえる。例えば, 妊娠期の母親が社会的あるいは身体的ストレスにさらされると, その後の子の神経内分泌系, あるいは行動に変化が生じる。妊娠中期から末期にかけて父親が他界するとその子においても統合失調症の発生率が高くなることが報告されている(1)。マウスにおいては, 胎生期にストレスを受けた仔は, 高架式十字迷路テストでのオープンアームへの進入の低下や, オープンフィールドテストにおける探索行動の低下など, 不安行動の上昇が認められている(2, 3)。

出産後の母性環境も大きな要因となる。特に, ほとんどの哺乳類の新生児期にみられる授乳行為や抱きこみなどの母性行動が果たす役割も大きい。ヒトにおいては, 虐待やネグレクトといった幼少期環境のストレスによって, 成人期に気分障害と不安障害が引き起こされることなどが報告されてきた(4)。その他にも, 幼少期の長期的なストレスによって肥満や糖尿病, 心疾患, 不安障害など, 様々な病気の発症率が上昇する(5)。

キーワード: 早期離乳, 前頭葉, 脳由来神経栄養因子 (BDNF), 不安, 恐怖記憶

麻布大学 獣医学部 (〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71)

E-mail: kikusui@azabu-u.ac.jp 原稿受領日: 2016 年 10 月 25 日, 依頼原稿

Title: Emotional changes induced by social stress in juvenile period Author: Takefumi Kikusui, Kazutaka Mogi

つまり、出生後の幼少期も心身の発達にとって重要な期間であり、この時期に起きた恒常性の変化が、永続的に中枢ならびに身体の機能に記録される。このため、発達期環境が及ぼす中枢ならびに身体機能の影響の分子メカニズムの解明は、発達期の社会環境に起因するとされる中枢性の障害や疾患の理解と治療法の確立に重要なテーマだといえよう。

2. 幼少期環境と情動障害

幼少期に虐待を受けた子どもは虐待を受けていない子どもと比較して心的外傷後ストレス障害 (posttraumatic stress disorder : PTSD) や不安障害、うつ病などの精神疾患発症頻度が高い(6)。中でも特に注目されているのが、たった一度の強い恐怖体験によって、その後の生活に多大な影響を与える PTSD である。恐怖記憶は適応的意義の高いもので、危険な状況を記憶し、これに上手く対処することを身に付ける。さらに、危険でなくなった場合にもはやその状況は危険ではないということを新たに覚えることも生きていく上で重要となる。しかし、PTSD の患者では経験した恐怖 (情動記憶) の消去が上手く行えず、日常生活に支障を来す。そのため、恐怖情動の消去を阻むメカニズムの解明や消去を適切にすすめる薬物の開発は PTSD の治療にとって重要な意味を持つ。一般的な心理的治療法として、暴露療法や系統的脱感作法が知られているが、これはまさに恐怖記憶の消去を潤滑に進めることを目的とした治療法である。したがって、恐怖記憶の消去の神経行動学的研究は、PTSD などの治療につながるものとして注目を集めている(7)。

PTSD の危険因子として、副腎皮質から放出されるグルココルチコイドがあげられる(8)。マウスやラットでも幼若期にストレスを受けると、成熟後に不安行動等が増えることが知られているが、このとき海馬ではグルココルチコイド受容体 (GR) 遺伝子のプロモーター領域に DNA のメチル化が誘導される(9)。それにより GR の発現量が低下するため、グルココルチコイドによるネガティブフィードバックが減弱し、HPA 軸の亢進が生じる。このようなクロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現が制御されることをエピジェネティクスという。母子関係によって、後天的に遺伝子修飾が変化し、機能が変えることが示された最初の研究である(9)。

早期離乳されたマウスにおける神経内分泌学的変化も観察されている。海馬における GR の mRNA の発現量が低下し、ストレス反応からの回復が障害される(10)。このストレス内分泌軸の高活性化は、幼少期の

グルココルチコイドの過剰分泌によるものと考えられる。早期離乳された仔マウスでは非常に高いグルココルチコイドが 48 時間以上にわかって観察されるが、通常通りに離乳した場合は 1 時間程度で基礎値まで回復できる(11)。このことから、離乳直後に上昇したグルココルチコイドが中枢に作用し、不安増強やストレス内分泌軸の高活性化を引き起こしていると考えられる。

3. 早期離乳による社会行動と情動の変化

母子関係の大事な社会的要素として、離乳が挙げられる。近年の研究により、早期離乳群の仔が通常離乳群のものとは比べて、馴染みのない個体への社会的接近の減少や探索動作の低下、低体重傾向を示すという報告がされている(12)。また、イヌにおいても早期の母子分離が恐怖や接触刺激への反応性を高め、ストレス反応性の増加や社会性の低下などの影響を及ぼすことが示唆されている(13)。

実験動物のラットやマウスでは、通常 3 週間の授乳期間を終えて親元から離されるが、ラットを通常よりも 1 週間早く離乳させたところ、新奇環境における心拍や体温などの自律反応が高くなることが認められた(14)。高架式十字迷路試験による不安行動の評価では、BALB/c 系マウスで通常離乳マウスと比較して、早期離乳マウスでは成長後の不安行動の増加が観察され、またオスでは攻撃行動の増加も明らかとなった(15)。その他、早期に離乳された BALB 系統の雌マウスでは、自分が母親になった際にも通常に離乳された雌マウスに比べ、排泄を促すためや母乳を飲むよう促すための仔をなめる licking/grooming 行動の時間が短くなる(16)。この結果は生後 2 週間の間に仔を親から一時的に離す母子分離ストレスによる影響や、母性行動の発現の低い母親に育てられた仔の成長後の母性行動の結果と一致するものである。また、神経内分泌学的には、海馬における GR の mRNA の発現量が低下し、ストレス反応からの回復が障害されることや(10)、コルチコステロンの増加と海馬における脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor : BDNF) が長期にわたり減少することが明らかとなっている(11)。これら、早期離乳による行動神経系の変化を表 1 にまとめた。

4. 早期離乳による恐怖記憶の消去抵抗性の上昇

上述の通り、PTSD の中核症状の一つとして、フラッシュバックという恐怖記憶による著しい苦痛や、生活機能の障害がもたらさせる。恐怖記憶の想起による不快情動の測定法として広く用いられているのが、

表1 早期離乳による行動神経系の変化

Emotional/autonomic responses	
Elevated plus-maze test (rats, mice)	Increased anxiety
Hole board test (rats)	Increased anxiety
Autonomic response to stress (rats)	Enhanced
Forced swim test (mice)	Increased immobility time
Social Behavior	
Maternal behavior (female mice)	Decreased
Sexual behavior (male mice)	Inhibited
Aggression after food deprivation (mice)	Enhanced
Aggression after social instigation (mice)	Decreased
Aggression toward cage-mates (mice)	Enhanced
Social play behavior (rats)	Decreased
Stress endocrine responses	
Basal corticosterone (mice)	Increased
Corticosterone response to stress (mice)	Prolonged
Hippocampal glucocorticoid receptor (mice)	Decreased
Brain development	
Brain weight (mice)	Decreased
Myelin formation (mice)	Precocious
Hippocampal BDNF protein (mice)	Decreased
Hippocampal neurogenesis (mice)	Decreased

恐怖条件付けである。恐怖条件付けにはいくつかの手法が用いられているが、実験文脈に依存したものや中性的な鍵刺激の提示による古典的条件付けが広く行われ、これまでの研究で扁桃体が恐怖・不安に関わる脳内領域であることが示されてきた。ラットやマウスなどの実験動物に対して光や音といった中性刺激（条件刺激：CS）を電気ショック（無条件刺激：US）と対提示すると、その後CSは条件性恐怖反応（freezing など）を誘発するようになる。その後、誘発された条件性恐怖反応の消去には、単に時間が経過するだけでなく、USを伴わないCSの単独提示が必要である。ラットでは、USを伴わないCSの単独提示を行わなければ、月あるいは年単位というかなりの長期間にわたって恐怖記憶が保持されることが知られている(17)。したがって消去の確立においては、CSの単独提示により、CS-USの連合や随伴性を弱めることが重要である。

早期離乳が恐怖記憶保持の強度に与える影響を明らかにすることを目的とし、C57BL/6を用いた恐怖条件付け実験と記憶消去実験を行った。実験スケジュールは、2日間の恐怖条件付け実験と、5日間の記憶消去実験の計7日間で構成した。条件刺激として、65 dB, 10 kHzの音刺激を4秒間与え、無条件刺激として音刺激の最後の0.5秒間に0.1 mAの電気を床のグリットから流した。このセットを1トライアルとした。マウスをフットショックボックスに入れた2分30秒後から、

図1 早期離乳マウスと通常離乳マウスの恐怖条件づけとその消去過程におけるすくみ行動発現

条件付け実験では、条件付け1日目の1トライアル目から3トライアル目、4トライアル目から7トライアル目、条件付け2日目のどの段階においても差はみられず、早期離乳群は通常離乳群と同様の条件付けが成立した。次に記憶消去実験では、消去1日目と消去3日目・4日目・5日目では早期離乳群においてすくみ行動発現率が有意に高くなった（文献18を改変）。

恐怖条件付け実験では音（条件刺激）と電気ショック（無条件刺激）を組み合わせた刺激の提示を1日目に7トライアル、2日目に5トライアル行った。記憶消去実験では、音のみの提示を1日5回、5日間行った。実験の様子を録画し、音を提示している時間中のfreezing発現率を解析した。恐怖条件付けでは、どの段階においても有意な差は認められず、早期離乳群は通常離乳群と同様の条件付けが成立した。記憶消去実験では、E:day2では違いがみられなかったが、E:day1, E:day3, E:day4, E:day5では早期離乳群においてfreezing発現率が有意に高くなった（図1）。これらの結果から、早期に母子分離されたマウスでは、PTSD様の恐怖消去の抵抗性が高まることが示された(18)。

5. 早期離乳による脳内変化

早期離乳による情動変化の要因となる脳内メカニズムについて、血中ならびに脳内のコルチコステロンの増加と海馬におけるBDNFの減少が示唆されている(11)。さらに、GRとBDNFの特異的受容体(TrkB)は相互作用をもっており、高濃度のグルココルチコイドによって神経細胞が持っているGRの発現量が著しく低下し、それに応じてTrkBとの相互作用も低下、さらにその相互作用の低下によってBDNFが放出を促す神経伝達物質の産生量が減少することが知られている(19)。つまり、幼若期における母子関係を介した高グルココルチコイド状態やGR発現の減少はBDNF機能のエピジェネティックな制御に影響を与えていることが考えられる。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多いままである。

図2 条件付け後のBDNF mRNA発現 (A) ならびにタンパク質発現量 (B)
早期離乳マウスではプロモーターⅢに特異的な低下、ならびにBDNFタンパク質の低下が観察された (文献18を改変)。

BDNFは、神経可塑性、ニューロン新生、細胞生存、ストレス抵抗性に関わる分泌性タンパク質として明らかにされてきたニューロトロフィンファミリーの一員であり、神経系の発達や記憶、学習、薬物依存のような中枢の可塑性メカニズムにおいて重要な役割を担っている。BDNFの遺伝子構造と発現調節機構は複雑であり、マウスでは最低でも5つのプロモーター領域の存在が知られている。5種類のプロモーター由来BDNF mRNAは、短い5'noncoding exonから転写され、共通の3'coding exonと組み合わせることで、BDNFタンパク質をコードする(20)。しかし、早期離乳によるBDNF発現の変化、さらにはその発現制御に関しての知見はなかった。

まず早期離乳によって影響をうける脳部位の検討を行った。早期離乳は前頭前野-扁桃体間の伝達効率を低下させ(21)、扁桃体、特に前頭葉からの投射をうける底外側核でのミエリンの形成異常が認められている(22)。扁桃体は、大脳辺縁系の中でも特に情動と関わりが深い。ヒトにおいて、恐怖や懐疑的な表情をしている顔写真を見せると、扁桃体の活動が上昇することが明らかとなっている(23)。また、うつ病患者では扁桃体の体積が増加、安静時の扁桃体の血流が増加し、恐怖の表情を見たときの扁桃体血流増加も大きいことが報告されている(24)。さらに、前頭前野-扁桃体間と情動の関連としては、前頭葉が扁桃体出力の抑制を通じて恐怖反応を減少させていること(25)や前頭前野の損傷は恐怖記憶の消去への抵抗性を増加させること(26)が示されているなど、前頭葉-扁桃体の連絡が恐怖情動に果たす役割は大きい。興味深いことに、形成された恐怖記憶は前頭葉へのBDNFの注入により減少させることが可能であることから、恐怖記憶の消去における前頭葉のBDNFの関与が示唆されてい

る(27)。

そこで、上記フットショックによる恐怖条件付けモデルを用い、早期離乳マウスと通常離乳マウスの前頭葉におけるBDNF mRNA発現量とBDNFタンパク質発現量の測定を行った。その結果、条件付けを実施する前のマウスでは、両群間に差が認められなかったものの、早期離乳群では、条件付け終了後にBDNF IIIのmRNA発現とBDNFタンパク質発現が低下した(図2)(18)。また、重回帰分析によりBDNF I-Vとタンパク質をコードするBDNF IXに与える影響を検証したところ、BDNF IIIとBDNF IVが有意にBDNF IXを説明していた。さらに、消去過程におけるfreezing発現率の平均とBDNF III mRNAとBDNF IX、BDNFタンパク質発現量の間には負の相関がみられた(図3)(18)。このことから、フットショックを受けた早期離乳マウスでは前頭葉のBDNF III mRNA及びBDNFタンパク質が低下し、音のみの提示による消去学習が上手く行われず、消去過程の後半3日間における消去の抵抗性が増加したのではないかと考えた。前頭葉は扁桃体や海馬と相互の神経連絡をもち、情動記憶の調節に関与していると考えられている。一般的に、記憶には情報を入力する記銘過程、記銘された情報を安定した記憶として保持する固定過程、そして保持された記憶を必要とときに取り出す想起過程があるといわれている。このうち固定過程には、遺伝子発現やタンパク質合成が必要である。先行研究より、消去手続き前にタンパク質合成阻害薬であるanisomycinを内側前頭葉に局所投与すると、消去手続き中の条件性反応の減衰には影響しないが、一旦消去された恐怖反応が24時間後のテストにおいて回復することが報告されている(28)。さらに、形成された恐怖記憶は、前頭葉へのBDNFの注入により減少することや(27)、BDNF IIIがBDNF IX

図3 条件付け後のBDNF mRNA 発現 (A, B) ならびにタンパク質発現量 (C) と条件付け消去過程におけるすくみ行動発現率との順位相関
 すくみ行動発現率は, BDNF III mRNA と BDNF IX mRNA, BDNF タンパク質発現量と負の順位相関を示した (文献 18 を改変)。

を有意に説明していること, freezing 発現率と BDNF III, BDNF IX 及び BDNF タンパク質の間に負の相関がみられたことなどから, 今回の実験で得られた恐怖記憶の消去抵抗性には, 前頭葉における BDNF III mRNA の発現低下を介した BDNF 作用の減弱が, 恐怖記憶の消去抵抗性に関わっていることが予想された。

しかし, BDNF mRNA 発現において発現低下がみられたのは BDNF III のみで, タンパク質コード化部位とされる BDNF IX では早期離乳群と通常離乳群の間に差がみられなかった。その一方で, BDNF タンパク質は早期離乳群において有意な発現低下が認められた。BDNF mRNA は, 粗面小胞体において proBDNF タンパク質へと翻訳され, ゴルジ装置を経て, トランスゴルジネットワークに畳みこまれ, 分泌小胞に包まれた状態で, 調節性分泌経路に送られる (29)。proBDNF タンパク質を含んだ小胞体は, 樹状突起や樹状突起棘, 軸索や末端に輸送され, プラスミンなどの細胞外プロテアーゼによって成熟 BDNF タンパク質に変換される (29)。BDNF にはいくつかのプロモーターが存在するだけでなく, その後の翻訳過程も複雑であることから, BDNF mRNA から, BDNF タンパク質が翻訳されるまでの過程に早期離乳の影響が存在することも考え

られた。また, 各プロモーター由来の BDNF mRNA が BDNF タンパク質発現に占める割合等, 未だ明らかとなっていないことが多い。さらに, BDNF mRNA 発現量と BDNF タンパク質発現量には相関性が見られない場合もあることが報告されていることから, BDNF III のプロモーター活性の変化が BDNF タンパク質発現に影響を与えているかは, 今後の研究課題である。また先行研究より, 慢性社会的敗北を受けたマウスでは, BDNF III mRNA と BDNF IX mRNA の発現減少が認められており, その背景として, BDNF III mRNA プロモーターの転写抑制の指標となるヒストン (H3-K27) のジメチル化の増加による転写抑制が発現を低下させるメカニズムも解明されていることから (30), 早期離乳によるエピジェネティックな制御機構を明らかにするには, ヒストン修飾について網羅的に解析する必要があるだろう。

6. さいごに

これまで述べてきたように, 幼少期の母子関係, 特に早期に母子を分離することによる中枢神経系への影響は大きく, また永続的である。これまでの研究から, そのメカニズムの一端が見えてきた (図 4)。母子の分

図4 早期離乳モデルによる神経行動学的変化の概要

早期に母子分離を経験した仔マウスではグルココルチコイドの過剰分泌が生じる。このグルココルチコイドが前頭葉の神経細胞に作用し、BDNFのプロモーターⅢ部位特異的に発現を抑制する。前頭葉の機能不全によって、高い不安行動や恐怖記憶の消去抵抗性を示すようになる。

離により、何らかの母親からの社会刺激が離乳個体から略奪されると、仔マウスのグルココルチコイドが48時間以上にわたり、上昇する。この上昇によって、脳内、特に前頭葉に存在するグルココルチコイド受容体発現神経細胞がエピジェネティックな変化を受ける。その一つがBDNFの発現制御であり、特にプロモーターⅢ領域が影響を受け、mRNAの発現が低下する。この前頭葉のBDNF発現細胞の機能低下は、情動行動や恐怖記憶の消去に携わる神経系の機能を障害し、最終的に高い不安行動や恐怖記憶の消去抵抗性を示すようになる。現在のところ、このエピジェネティックな変化を分子レベルで捉えることはできていないものの、その分子メカニズムが明らかになれば、PTSDや高い不安症に悩む方々の新たな治療法の開発の道筋が見えるかもしれない。今後の研究が待たれる。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Cannon M, et al. The Epidemiology of Schizophrenia. 2003.
- 2) Abercrombie ED, et al. 1989;52:1655-1658.
- 3) Takahashi LK, et al. Brain Res. 1992;574:131-137.
- 4) McLaughlin KA, et al. Depress Anxiety. 2010;27:1087-1094.
- 5) Gillman MW. N Engl J Med. 2005;353:1848-1850.
- 6) Cloitre M, et al. J Trauma Stress. 2009;22:399-408.
- 7) Teicher MH, et al. Neurosci Biobehav Rev. 2003;27:33-44.
- 8) Mehta D, et al. Neuropharmacology. 2012;62:654-662.
- 9) Weaver IC, et al. Nat Neurosci. 2004;7:847-854.
- 10) Kikusui T, et al. Behav Brain Res. 2006;175:96-103.
- 11) Kikusui T, et al. Psychoneuroendocrinology. 2009;34:762-772.
- 12) Shimozuru M, et al. Dev Psychobiol. 2007;49:343-350.
- 13) 茂木一孝, 他. 動物心理学研究. 2009;59:25-36.
- 14) Ito A, et al. Behav Brain Res. 2006;171:87-93.
- 15) Kikusui T, et al. J Neuroendocrinol. 2009;21:427-431.
- 16) Kikusui T, et al. Behav Brain Res. 2005;162:200-206.
- 17) McGaugh JL. Science. 1966;153:1351-1358.
- 18) Mogi K, et al. Dev Psychobiol. 2016;58:1034-1042.
- 19) Numakawa T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:647-652.
- 20) Boule F, et al. Mol Psychiatry. 2012;17:584-596.
- 21) Takita M, et al. Neurosci Res. 2016;103:48-53.
- 22) Ono M, et al. Neuroscience. 2008;156:1103-1110.
- 23) Winston JS, et al. Nat Neurosci. 2002;5:277-283.
- 24) Sheline YI, et al. Biol Psychiatry. 2001;50:651-658.
- 25) Akirav I, et al. Neural Plast. 2007;2007:30873.
- 26) Morgan MA, et al. Neurosci Lett. 1993;163:109-113.
- 27) Peters J, et al. Science. 2010; 328:1288-1290.
- 28) Santini E, et al. J Neurosci. 2004;24:5704-5710.
- 29) Matsumoto T, et al. Nat Neurosci. 2008;11:131-133.
- 30) Tsankova NM, et al. Nat Neurosci. 2006;9:519-525.