

氏名	はやし れお 林 礼雄		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第1980号		
学位授与の日付	令和5年3月16日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）		
学位論文題目	Evaluation of changes in anxiety, depression, social behavior, and oxytocin mRNA levels in adults after adolescent interventions in maternal-separated mice (母子分離後の思春期マウスへの介入による不安、抑うつ、社会的行動、オキシトシン mRNA の発現レベルの変化について)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	永光 信一郎
	(副査) 福岡大学	教授	久保 真一
	福岡大学	講師	芝口 浩智

内容の要旨

【目的】

オキシトシンは、元来、子宮収縮や射乳に関わるホルモンとして知られているが、近年、抗ストレス作用や社会的行動、愛着行動に関与していることが示されている。オキシトシンを介したシグナル伝達システムは、子供時代の逆境体験によって生物学的に変化することや、幼少期の逆境体験は、成人後の不安障害、うつ病、パーソナリティ障害など様々な疾患のリスクとなることが知られている。齧歯類において、幼少期の逆境体験のモデルとして、母子分離マウスが知られている。母子分離マウスに対する離乳前後のオキシトシン投与による社会的行動の改善や不安行動の改善について報告されているが、発達段階に応じたオキシトシンの投与の効果の違いについては知られていない。また、オキシトシンのシグナル伝達系は生後早期から思春期までの高い可塑性が示されていることや虐待を受けている幼少期に外来で治療介入を行うことが困難であることが想定されることから、思春期のオキシトシン投与による臨床的意義は高いと考えられた。今回、母子分離マウスに対する思春期のオキシトシン投与による不安、抑うつ、社会的行動の行動解析による評価を行い、さらに生物学的解析により作用機序の解明を目指した。また、被虐待児に対する思春期の愛着形成によるオキシトシンのシグナル伝達系の変化についても不明であり、今回、愛着形成を想定して健常群との同居による介入を設定し、思春期の介入による評価も行った。

【対象と方法】

57 匹のマウスを用いて実験を行った。母子分離（生後 2-15 日）を行ったマウスを小児期の逆境のモデルとして使用し、オキシトシン（1mg/kg/日）を継続的に投与することにより、思春期（PD 33-47）への介入効果を調査した。または、他の思春期の介入として、母子分離を経験していない兄弟マウスとの同居を行った。兄弟マウスとの同居は、健全な個体との愛着を育むために作成された。幼少期の生育環境と思春期の介入の組み合わせにより、standard nest-normal saline group (SN-NS)、maternal separate-normal saline group (MS-NS)、standard nest-oxytocin group (SN-OXT)、maternal separate-oxytocin (MS-OXT)、maternal separate-cohabitation with healthy littermates group (MS-COHAB) の 5 つの群を作成した。生後 60 日から生後 65 日までにオープンフィールドテスト (*Open Field Test* [OFT])、高架式十字迷路テスト (*Elevated Plus Maze Test* [EPM])、尾懸垂テスト (*Tail Suspension Test* [TST])、社会相互作用テスト (*Social Interaction Test* [SIT]) を行い、成体期マウスの不安、抑うつ、社会的行動を評価した。オキシトシンシグナル伝達経路の評価において、扁桃体、視床下部、室傍核、海馬などでの評価が一般的であり、今回は、以前の研究において母子分離により、OXTmRNA や OXTRmRNA の変化が認められている視床下部が選定された。オキシトシンシグナル伝達経路は、RT-PCR を使用した視床下部を中心とする領域のオキシトシン (OXT) およびオキシトシン受容 (OXTR) mRNA の定量化によって評価された。

【結果】

OFT の総走行距離において、MS-NS は SN-OXT と比較し有意に増加した ($P < 0.01$)。SN-OXT は、MS-OXT と比較し有意に減少した ($P < 0.01$)。MS-OXT は、MS-COHAB ($P < 0.01$) と比較し有意に減少した。MS-COHAB は、MS-NS と比較し有意に減少した ($P < 0.01$)。EPM のオープンアームでの滞在時間の割合において、統計的に有意な分散を認めなかった ($P = 0.26$)。TST の不動時間の割合において、統計的に有意な分散を認めなかった ($P = 0.84$)。SIT の低接触域の滞在時間の変化の割合において、MS-NS は、SN-NS、SN-OXT、MS-COHAB と比較し有意な増加を認めた ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。SN-OXT は、MS-NS、MS-OXT と比較し有意な減少を認めた ($P = 0.0275$, $P = 0.0292$)。生物学的分析では、MS-NS、MS-OXT、MS-COHAB、SN-OXT は、SN-NS と比較し有意な低下を示した ($P = 0.0284$, < 0.01 , 0.0144 , < 0.01)。MS-OXT は、MS-NS と比較し有意な変化を示さなかった ($P = 0.84$)。MS-COHAB は、MS-NS と比較し有意な変化を示さなかった ($P = 0.10$)。

【結論】

今回の研究により、母子分離を行ったマウスへの思春期のオキシトシン投与、および母子分離が行われていない兄弟マウスとの同居により、成体期の社会的行動が改善することを示した。SIT の結果により、低接触域の滞在時間の変化の割合において、

MS-NS は SN-NS と比較し有意な増加を示したが、MS-OXT は SN-NS と、MS-COHAB は SN-NS と比較し有意な差を認めておらず、オキシトシン、健常群との同居の各介入により社会的行動の改善があることが示された。OFT の結果により一部有意な差を認めしたが、NS-SN と MS-SN、NS-SN と NS-OXT、MS-SN と MS-OXT 間に有意な差を認めていないことから、今回、有意な結論を導くことはできなかった。EPM においては、有意な分散を認めておらず、母子分離による不安行動の有意な変化を認めなかった。TST においては、有意な分散を認めておらず、母子分離による抑うつの有義な変化を認めなかった。生物学的分析において、母子分離マウスに対する、薬剂的・環境的介入による社会的行動変化の機序の解明を目指したが、視床下部における OXT および OXTR mRNA 発現量について、各介入による有意な変化を明らかにしなかった。今回の研究において、母子分離マウスに対するオキシトシン投与や、健常マウスとの同居による思春期の介入により、社会的行動の改善を示すことが示された。視床下部での OXT および OXTR mRNA 発現量の定量化においては、介入による有意な変化を認めておらず、今後は新たな部位での計測やより大規模な実験による雄雌を分けた群による比較の必要性が検討された。

審査の結果の要旨

本論文は、ネグレクトモデルである母子分離マウスに対して、思春期にオキシトシンによる薬物的介入もしくは、非母子分離同胞群との同居を行い成体期の社会的行動への影響や生物学的な変化を研究し報告したものである。齧歯類の幼少期の母子分離により、不安様行動やうつ様行動の増加、社会的行動の低下、薬物依存性などの行動変化が生じることが知られており、脳内の変化として視床下部や海馬、扁桃体などのオキシトシン伝達系が関与していることが知られている。母子分離モデルへのオキシトシンによる薬物的介入や非薬物的介入によってもたらされる行動変化や、それに伴う生物学的変化の報告については十分ではなく、さらに思春期以降の介入については不明な点が多い。本研究では、57 匹の C57BL/6J マウスを用いて、生後 2 日目から生後 15 日目までの母子分離、生後 17 日目の早期離乳、その後の単離飼育を行ったネグレクトモデルの母子分離マウスに対して、思春期にオキシトシンの連続投与や、非母子分離同胞マウスとの同居による介入を行い、成体期における抑うつ、不安、社会的行動の評価や、RT-PCR による視床下部領域のオキシトシン mRNA の発現量、オキシトシン受容体 mRNA の発現量の評価を行なった。その結果、母子分離により、社会的行動のみ有意な低下が認められ、不安様行動、うつ様行動に変化は認められなかった、また、母子分離により低下した社会的行動は、オキシトシンの連続投与により増加し、非母子分離同胞群との同居によっても増加した。また、視床下部にお

るオキシトシン mRNA 量は、母子分離により低下したが、各介入による社会的行動のとの相関を認めておらず、オキシトシン mRNA 量は低下したままであった。視床下部のオキシトシン受容体 mRNA 量については、母子分離や各介入との相関を認めなかった。本研究の結果から、ネグレクトモデルである母子分離マウスへの思春期のオキシトシン連続投与による社会的行動の改善の可能性が示された。また、各介入による社会的行動の増加と視床下部のオキシトシン mRNA 量との相関がないことが示されており、オキシトシン伝達系における他の部位や因子による評価につながると考えられた。

以下に本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、主な質疑応答の内容をそれぞれ記載する。

1. 斬新さ

マルトリートメントのモデルである母子分離マウスに対して乳児期ではなく、思春期において薬剤的介入や環境調整による非薬剤的介入を行い、母子分離マウスにおける社会的行動への影響や生物学的レベルでの変化を検証した。

2. 重要性

齧歯類のネグレクトモデルは、成体期以降に社会的行動の低下を生じることが知られているが、思春期の薬物的、非薬物的介入による成体期の社会的行動へ影響についての研究は十分ではない。本研究は、マルトリートメントを受けた児童への有効な治療法や介入時期の検討に繋がると考えられ、重要性は高いと考えられる。

3. 実験方法の正確性

本研究では、幼少期のネグレクトによる虐待/マルトリートメントモデルとして確立されている齧歯類の母子分離モデルを使用している。母子分離モデルは、複数の論文に掲載されており、十分な確実性があると考えられる。

4. 表現の明確さ

研究の背景から、方法、結果、考察に至るまで正確かつわかり易い英文で構成されている。明確で論理的な表現による論文である。

5. 主な質疑応答

Q: 母子分離後に非母子分離同胞群と同居を行ったマウスに、さらにオキシトシンの投与を行った群を作成することができれば良かったと感じるが？

A: ご指摘の通り。薬物的介入と非薬物的介入を組み合わせた群を作成し、他の群と比較することでより効果的な介入法の検討につながると考える。

Q: 行動実験の解析結果と、RT-PCR のオキシトシン (OXT)、オキシトシン受容体 (OXTR)

mRNA の結果が矛盾している気がするが、そこについての説明を再度していただきたい。

A：母子分離のみを行った群において、社会的行動の低下と同時に、OXTmRNA 量が低下しており、社会的行動と OXTmRNA 量が相関している可能性を考えたが、オキシトシン投与や非母子分離同胞群との同居による社会的行動の増加と OXTmRNA 量の相関を認めず、そもそも社会的行動に OXTmRNA 量の変化が関与していない可能性や他の因子で社会的行動が変化している可能性を考えている。

Q：一般的に効果が認められている薬剤を使用する群を作成し、比較しなかったのはなぜか？

A：虐待によって生じる社会性の低下に対して、薬剤的介入の方法がないことが今回の研究の出発点であり、効果が認められている既存の薬剤が存在しないということが理由になる。

Q：参考文献でオキシトシン遺伝子の DNA メチル化のことに触れられ、虐待による行動変化との関連性について現在検討中となっているが、そもそもオキシトシンの投与が有効であると考えたデータなどがあれば示して欲しい。

A：(マウス、ラットの母子分離の期間と、性別、脳の局所的なオキシトシン伝達系の変化をまとめた表を提示しながら) 齧歯類における過去の多くの文献において、母子分離によるオキシトシン伝達系の低下との関連を示していることや、過去の母子分離モデルへの乳児期のオキシトシンの投与により社会的行動の改善を認めた研究があることが理由である。

Q：2022年4月頃に理研のグループの報告で、オキシトシンノックアウトマウスの父親マウスは、養育行動が低下することが認められており、養育行動とオキシトシン系の変化も注目されていると思うが、それに関して、今回のネグレクトモデルのマウスの成長後の養育行動を評価していくという考えはないか？

A：過去の報告において母子分離によるネグレクトモデルの成体期での養育行動を評価するデータは十分ではなく、ご指摘の通り母子分離マウスの成体期での養育行動の変化や、各介入による変化について調べていきたいと考えている。

Q：統計解析で、発表の際に全て健常群内とオキシトシン群内に分けているが、健常群内は二群間比較にしているのか？それとも多群間比較か？

A：多群間比較したものを、分かりやすいように2つに分けている、ご指摘の通り正確には、この記載の場合は二群間比較が望ましい。

Q：今後の生物学的な評価について、ドーパミンなどを調べる予定はあるか？

A：オキシトシンは、ドーパミンに限らず、二次的にセロトニン、内因性オピオイド、

コルチゾールと関わることが知られており評価する必要性があると考えている。

Q: 今回の母子分離マウスへのオキシトシンの投与方法は腹腔内投与だが、他の研究で自閉スペクトラム症児へのオキシトシン投与を経鼻投与により行っていることについて、視床下部を経ずに血液脳関門を介さない投与になると思うが、そこに特殊な違いがあるのか？精神病理の観点から見て投与による対象部位による違いがあるのか？

A: 経鼻投与もしくは腹腔内投与によりオキシトシンが対象とする脳内の部位が異なるというデータはない。投与方法による脳内移行性の違いはあると考えられ、オキシトシン腹腔内投与によっても血液脳関門を一定の割合で通過することが知られているが、効率性において経鼻投与の方が優れていると考えられる。

Q: RT-PCR の内在性コントロールとして ACT β を選択しているが、複数の中からの選択なのか、それとも最初から ACT β と決めていたのか？

A: GAPDH などの複数の指標から ACT β を選択している。

Q: 脳内の視床下部以外の部位について、今回、分子学的評価を行っていないが、過去の文献を踏まえると、仮説としてどのあたりの変化が予想されるか？

A: 最近の社会的行動についてのオキシトシンの知見として、他者と関わることによるリスクの見積もりを下げる効果があるとされ、そこに海馬や扁桃体が関与していると言われており、同部位での変化が予想される。

以上、本論文は、内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ及び質疑応答の結果を踏まえ、本論文は学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。