

氏名	李 海燕		
学位の種類	博士（神経科学）		
学位記番号	博甲第 8789 号		
学位授与年月	平成 30年 7月 31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Effects of postnatal brief maternal separation on the development of brain and behavior in the BALB/c mice（生後発達期の短時間の母仔分離が BALB/c マウスの脳と行動の発達に与える影響）		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	一谷 幸男
副査	筑波大学教授（連携大学院）	理学博士	佐藤 主税
副査	筑波大学准教授	博士（心理学）	加藤 克紀
副査	日本保健医療大学教授	医学博士・薬学博士	野上 晴雄

## 論文の内容の要旨

李 海燕氏の博士学位論文は、生後発達期の短時間の母仔分離が BALB/c マウスの脳と行動の発達に与える影響を検討したものである。

**目的：**哺乳類の脳と行動の発達は遺伝的要因と環境要因の相互作用の影響を受ける。母子関係は生後発達期の重要な環境要因であり、子の脳の構造と機能の発達に様々な影響を及ぼす。生後発達期の母子関係の役割を調べる動物モデルとして母子分離があり、そのうち短時間の母子分離はハンドリング（handling）とも呼ばれる。ハンドリングを受けた仔では、成長後に学習・記憶能力の向上や不安レベルの低下などが見られることが多いが、ハンドリングによる各種行動への影響は動物種（マウス、ラット）、系統（C57BL/6J、BALB/c など）や実験パラダイムによって必ずしも一致せず、統一した見解は得られていない。さらに行動への影響の基盤となる脳内機構の解明は遅れている。そこで本研究では、筆者はまず生後発達期のハンドリングが成長後のマウスの行動に及ぼす影響を調べた。次に脳内機構として、不安・うつや学習・記憶への関与が報告されているセロトニン（5-HT）受容体、脳由来神経栄養因子（BDNF）、および GABA-A 受容体の遺伝子発現を解析した。

### 対象と方法：

（1）対象：BALB/c マウスを用いた。このマウスは 5-HT 合成酵素である tryptophan hydroxylase 2 の一塩基置換により脳内 5-HT 量が減少している。また、C57BL/6 マウスなどと比較して不安レベルが高く、学習・記憶能力が劣るため、うつ病のモデルマウスとして用いられることがある。したがって筆者は、ハンドリングによる効果がより顕著に現れると考えた。なお、実験には雄の仔マウスを用いた。

（2）方法：生後 1 日目から 14 日目まで、1 日 1 回 15 分間（11:00-11:15）、仔マウスを仕切りが入った別のケージに移動し、母親と兄弟から分離した。母子分離を行わずに通常飼育したマウスを統制群と

した。まず、ハンドリングの作用機序として母親の養育行動の増加が報告されているため、生後1日目、3日目、7日目に母子分離後に仔を母親のケージに戻してから2時間(11:45-13:45)、母親の授乳姿勢、子舐めや巣作り行動を観察した。次に、仔の行動に対するハンドリングの影響を調べるため、生後9週目から10週目に不安、うつ様行動や空間学習・記憶への影響をそれぞれ高架式十字迷路、強制水泳試験、モリス水迷路を用いて解析した。さらに、行動への影響を担う脳内機構を解明するために、不安、うつや学習・記憶への関与が報告されている脳部位と遺伝子についてリアルタイムPCR法を用いてmRNA発現量を調べた。すなわち、ハンドリング終了直後の生後15日目、および行動解析と同時期である生後71日目に内側前頭前皮質、扁桃核、背側・腹側海馬および背側縫線核を切り出し、5-HT1A受容体、BDNF、GABA-A受容体 $\alpha 2$ サブユニットのmRNA発現量を定量した。最後に、ハンドリングによって賦活化される脳部位を調べるために、ハンドリング最終日である生後14日目に、仔を母親の元に戻してから1時間後に灌流固定を行い、凍結切片を作製してc-Fos抗体を用いた免疫染色を行った。

**結果：**生後1日目、3日目、7日目の母親の養育行動(授乳姿勢、子舐め、巣作り行動)の回数はハンドリングによって変化しなかった。

成長後の仔の行動を解析した結果、ハンドリングによって不安レベルが低下する一方で、空間学習・記憶能力が向上した。しかし、うつ様行動は変化しなかった。

仔の脳における遺伝子発現を調べた結果、ハンドリングによって生後15日目で5-HT1A受容体のmRNA発現量が背側縫線核で増加する一方、扁桃核で減少していた。生後71日目では、BDNF mRNAが背側海馬と扁桃核で増加し、GABA-A受容体 $\alpha 2$ サブユニットmRNAが扁桃核で減少していた。

ハンドリングによって賦活化される脳部位を解析した結果、ハンドリング群の視床下部室傍核と外側手網核で多数のc-Fos陽性細胞が見られたが、統制群ではほとんど発現が見られなかった。

**考察：**本実験ではハンドリングによって母親の養育行動が変化しなかったため、BALB/cマウスではハンドリングの作用に母親の養育行動が重要な役割を果たさないことが示唆された。ハンドリングにより成長後の仔の不安様行動が減少し、空間学習・記憶能力が向上することが示され、並行して発達期の背側縫線核と扁桃核の5-HT1A受容体、成体期の背側海馬と扁桃核のBDNFと扁桃核のGABA-A受容体 $\alpha 2$ サブユニットの遺伝子発現量が変化した。したがって筆者は、ハンドリングはこれらの遺伝子発現の変化を介して、仔の行動を変化させる可能性を示唆した。しかしながら、本実験で示された遺伝子発現と行動の変化の因果関係についてはより直接的な解析が必要であると考察している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本論文は、生後発達期ラットの短時間の母子分離(ハンドリング)が仔の脳機能の発達に与える影響について、まず行動解析を行い、次にその脳内機構として不安、うつ、学習・記憶との関連が報告されている分子について脳内各部位の遺伝子発現解析を行い、確認した点で価値がある。さらに、ハンドリング手続きによって賦活化される脳部位をc-Fos抗体を用いて調べた点でも、新しい知見を見出した。

離乳後から成体期に至るまでの各段階で変化がどのように進むのかを今後明らかにする必要があるが、発達期ハンドリングの効果の発現メカニズム解明に向けて示唆を与えたことが、本研究の優れた点として高く評価できる。

平成30年5月15日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(神経科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。