

学位論文題名

Early life programming of the rat circadian physiology:
effects of chronobiological changes in maternal behaviors
on pups circadian phenotypes, growth and stress response

(ラット胎児期、新生児期における概日リズムのプログラミング：
母ラットの時間生物学的行動変化が仔ラットの概日リズム発現、
成長及びストレス反応に及ぼす影響)

学位論文内容の要旨

胎児期あるいは出生初期の環境が、発達過程や成長後の生理機能に影響を及ぼすことが知られている。例えば、出生直後の母子分離 (MD) は仔ラットの行動リズムを逆転させることが知られている。また、授乳期の母ラットに制限給餌 (RF) を行うと仔ラットの行動リズムが変化する。一方、出生初期の母子分離は成長後のストレス反応性を変化させることが知られている。しかし母子分離に附随する因子は多様であり、どの因子がこれらの変化に対する責任因子か不明である。またどの時期の環境が問題かも解明されていない。そこで胎児期、新生児期において母ラットの行動リズムを変化させ、仔の体重、生体リズム及び成長後のストレス反応に与える影響の、責任因子、臨界期の有無、時計遺伝子発現リズムとの関係を検討した。

仔ラットの体重は出生直後から1週間毎に測定した。行動リズムは離乳後約3週間赤外線センサーを用いて測定し、離乳日 (P21) における行動終了時刻並びに行動リズムの周期を算出した。SCNにおける時計遺伝子の発現リズムは4時間毎に脳試料を採取した後、*per1*, *per2* の発現を、RI を用いた *in situ* hybridization にて測定した。ストレス反応は、成長後に新規環境暴露に対するコルチコステロン分泌で評価した。無麻酔無拘束下でラットの尾端より採血を行い、基礎値と暴露15分後の血中コルチコステロン濃度を蛋白競合法にて測定した。

1 母子分離の長さ、時間帯、分離中の環境温度

出生後6日間明期に、長さ、時間帯、及び分離中の環境温度を変えてMDを行った。明期に12時間MDを行うと (MD12) 仔ラットの成長は抑制され、少なくとも10週まで低体重を認めた。光入力を遮断した条件下で測定した行動リズムは、MDにより離乳時に逆転していたが、リズム周期には影響しなかった。成長後のストレスに対するコルチコステロン反応は、MD12で著しく上昇していた。6時間のMDでは体重は減少が認められ、行動リズムもほぼ逆転していたが、3時間のMDでは体重変化は認められないものの、明期前半のMDでは行動リズムが有意に変化した。ストレス反応は対照群に比べ亢進を認めたが、明期後半のMD3では変化が認められなかった。MD中に仔ラットを37℃に保温すると体重減少が抑制され、行動リズムの位相変化も有意に小さく

なり、またストレスに対する反応性は対照群と同レベルとなった。以上の結果よりMDの効果は長さ、時間帯、温度により異なることが明らかとなった。またMDの効果は測定項目によって異なることが明らかとなった。

2 MD効果の臨界期

MDの実施時期を出生後1週目(MD1w)、2週目(MD2w)、3週目(MD3w)と変えて、MD効果の臨界期を検討した。体重はMD1wでは測定期間中すべてにおいて有意に低下したが、MD3wでは対照群と比べて有意差を認めなかった。MD2wではMD終了後には体重は有意に低下したが、P35までには有意差は消失した。行動リズムにおいてはすべての実験群で有意な変化を認め、出生後早期のMD程位相変化が大きかった。行動リズムの周期には変化を認めなかった。ストレス反応性はMD1wで有意に上昇していたが、MD2w、MD3wでは変化を認めなかった。MDに対する効果には臨界期を認め、ストレス反応性は1週目、体重変化では2週目、行動リズムは3週目に臨界期があると考えられた。また測定値により臨界期が異なることも明らかになった。

3 制限給餌(RF)の効果

明期の特定の時間帯に給餌を限定する制限給餌を行うとラットの行動リズムが変化することが知られている。授乳中の母ラットにおいて午前10時から12時までの2時間給餌を行うRFを出生直後から1週間行った。母ラットの行動リズムはRFの時間帯に多くなり、昼間の行動量が増加した。また血中コルチコステロンは対照群では明期前半に低く、明期後半から夜間に高くなる概日リズムを示したが、RF群では明期、ホルモンレベルは給餌の直前に上昇し見かけ上逆転した。制限給餌を受けた仔ラットはRF期間中体重は低下したが、その後の発育には有意差を認めなかった。成長後のストレス反応には対照群と有意差を認めなかったが、離乳時の行動リズムはほぼ逆転していた。一方、生後7日目におけるSCNの時計遺伝子発現リズムは、per1の12時におけるの発現が有意に低下していた。per2の発現は8時に低下し、24時、4時に上昇していた。しかし行動リズムとSCNにおける時計遺伝子発現リズムの間には乖離が認められ、RFは新生児のSCNに作用するだけでなく、SCNを介さずに行動リズムを変化させることが示唆された。

妊娠中の母ラットに、10時から12時までのRFを行うと母ラットの行動リズムが変化し、昼間の行動量が増加した。また血中コルチコステロンの概日リズムは授乳中にRFを行った場合とほぼ同様の变化を示した。妊娠20日目(E20)に胎児脳を4時間毎に採取し、per1、per2の発現リズムを測定したが変化は認められなかった。また体重も8週まで変化を認めず、成長後のストレス反応にも有意差を認めなかった。

考察及び結論

新生児期の母子分離により仔ラットの成長後の生体リズム、体重、ストレス反応に大きな変化が見られたが、その効果は時間帯や、環境温度により影響を受け、また臨界期を認めた。授乳中のRFは仔ラットのストレス反応には影響しないが、体重、生体リズムの発現に影響し、さらに生体リズムに対する効果には遺伝子レベルと行動レベルで乖離が認められた。胎児期のRFは子ラットの体重変化、生体リズム、ストレス反応に変化を与えなかった。

以上の結果から、ラット新生児期の母ラットを含めた飼育環境は成長後の生体リズム、ストレス反応性、発育に影響を与え、その効果は母ラットの行動やそれに伴う環境の二次的变化により生じると推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 櫻 木 範 明
副 査 教 授 水 上 尚 典

学位論文題名

**Early life programming of the rat circadian physiology:
effects of chronobiological changes in maternal behaviors
on pups circadian phenotypes, growth and stress response**

(ラット胎児期、新生児期における概日リズムのプログラミング：
母ラットの時間生物学的行動変化が仔ラットの概日リズム発現、
成長及びストレス反応に及ぼす影響)

胎児期あるいは出生初期の環境が、発達過程や成長後の生理機能に影響を及ぼすことが知られている。例えば、出生初期の母子分離は成長後のストレス応答性を変化させる。しかし、母子分離に伴う因子は多様であり、どの因子が関与しているかは解明されていない。本論文は、ラットを用い、胎児期・新生児期における母の行動リズムの変化が、仔の生体リズム、成長、および成長後のストレス反応に与える影響を検討したものである。その結果、母子分離の効果の一部は環境温度の変化によることが明らかとなった。さらに、授乳中に通常の摂食時刻とは異なる時間帯に制限給餌を行い、母ラットの生体リズムを強制的に変化させると、離乳時における仔の行動リズムはほぼ逆転するが、仔の成長や成長後のストレス反応には影響しないことが示された。また、生後7日目における視交叉上核時計遺伝子の発現リズムは、*Per1*では4時間前進し、*Per2*では4時間後退し、離乳時の行動リズムの位相と一致しなかった。この結果は、母ラットの生体リズムが正常化した後も、仔ラット視交叉上核リズムの変化が持続していることを示唆している。一方、妊娠中の母ラットに制限給餌を行うと、母ラットの生体リズムは変化した。妊娠20日目の胎児 *Per1*、*Per2* 発現リズムには変化を認めなかった。また、成長も少なくとも8週まで変化を認めず、成長後のストレス反応にも影響しなかった。以上の結果から、新生児期において母ラットの行動リズムの変化は、仔ラットの生体リズム、成長、成長後のストレス反応性に影響を与えるが、その効果は母ラットの行動リズムとそれに伴う環境の二次的变化により生じるものと推測された。一方、妊娠母ラットの生体リズムの変化は、仔ラットに大きな影響を与えなかった。

学位審査は、主査である本間教授、副査である水上教授、櫻木教授の個別試問及び公開

審査により行われた。本間教授による個別試問は平成17年11月4日に、水上教授、櫻木教授による個別試問は同年11月7日に行われた。学位論文公開発表は、同年11月9日、医学部臨床講堂にて、25名の出席のもと行われた。主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら22分に渡って学位論文の内容を説明した。その後、主査、副査との間で12分間質疑応答があった。

副査の水上教授からは、母子分離により仔の行動リズムが逆転するメカニズム、またストレス反応性が成長後に上昇するメカニズムについて質問があった。申請者は、母ラットの育児行動の変化に伴う仔ラットの環境変化として、乳汁内のホルモン濃度などの内分泌学的環境の変化や、母子分離による仔ラット体温の低下などが考えられると回答した。またストレス反応に関しては、保温により母子分離の効果が減弱したことから、低体温によるストレス反応が関与している可能性が高いと回答し、さらに、過去の文献を引用し、新生時期のストレスが海馬ステロイドホルモン受容体の遺伝子発現効率を長期間にわたって変化させ、視床下部・下垂体・副腎皮質系のフィードバック機構に影響する可能性をあげた。また副査の櫻木教授からは、視交叉上核で発振された概日リズムが末梢組織に伝達する機序について、例えば松果体におけるメラトニン合成との関係について質問があった。これに対し、申請者は、哺乳類では視交叉上核が松果体リズムを支配しており、上位中枢であると回答した。主査の本間教授からは、制限給餌下における母ラットのコルチコステロンリズムが「見かけ上逆転した」と表現した意味についての質問があった。申請者は、制限給餌下でも振動中枢である視交叉上核の概日リズムには変化が見られないので、末梢組織のリズム表現系に見かけ上変化が見られたものであると回答した。また、胎児期にすでに時計遺伝子発現にリズムが見られるにもかかわらず、行動や松果体のメラトニン合成酵素活性に概日リズムが見られるようになるのは生後2～3週であることをどう考えるかとの質問があった。申請者は、胎児期にも概日リズムは表現されているが、測定できないだけであろうと回答した。

本論文は、胎児期、新生児期における母の行動リズムが児の生体リズム、成長、成長後のストレス反応性に与える影響を、独自の動物モデルを用いて時間生物学的に解析し、母子関係の新しい側面を解明した点が評価される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の単位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。