

氏名(本籍)	上村 いつか(東京都)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第76号
学位授与年月日	令和2年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	幼少期の行動発達における腸内細菌叢の役割解明
論文審査委員	(主査) 茂木 一孝 (副査) 菊水 健史 勝俣 昌也

論文内容の要旨

【緒言】

ヒトを含む哺乳類は胎盤形成を介して胎児を育て、出産に至る。新生仔は体温調節や運動機能が未熟である為、親の養育行動が仔の生存や発育には欠かせない。母親は母乳を介した栄養に加えて、身体的接触を介して仔の行動や内分泌、神経発達に対して影響を及ぼすことが明らかにされてきた。これらに加えて、哺乳類の新生仔は産道を通る際に母親の膣細菌叢に曝露される。この母親の細菌叢の垂直伝播は、その後の仔の免疫の獲得や成長において極めて重要な役割を担っていることはよく研究されてきた。近年ではそれ以外にも、妊娠期母マウスへの抗生物質投与によって腸内細菌叢の構成を攪乱すると、産まれた仔マウスの不安行動が増加することや、妊娠期の母にストレスを与えることによって膣細菌叢の *dysbiosis* が生じ、出生した仔の腸内細菌叢と脳のアミノ酸代謝プロファイルが変化することなどが報告され始めており、母親から影響をうける幼少期の腸内細菌叢が仔の行動や神経発達を変化させることが考えられる。本研究では、幼少期の腸内細菌叢が、発達期宿主の行動および内分泌系へおよぼす影響を解明することを目的に研究を実施した。

【第1章：早期離乳による行動発達変化における腸内細菌叢の関与】

通常よりも早く離乳された早期離乳 (Early weaning: EW) マウスは、通常離乳 (Normal weaning: NW) されたマウスより高い不安行動を示し、ストレス応答性も亢進することが知られている。第1章では EW マウスにおける行動表現型や免疫系の発達変化に腸内細菌叢の変化が関与しているのかを解明することを目的に実験した。

実験1では EW マウスと NW マウスの4週齢および8週齢における行動、腸内細菌叢の構成に差異

があるかを調べた。4 週齢時の Tail suspension test では、EW マウスは NW マウスより顕著なうつ様行動を示した。しかし、この差異は 8 週齢時にはみられなかった。Marble burying test では、EW マウスは 8 週齢時に NW マウスより長い移動距離を示した。Open field test では、EW マウスと NW マウスの運動活性に差異はなかったことから、Marble burying test でみられた EW マウスの移動距離の増加は新奇物に対する反応性が亢進したと考えられる。実験 2 では、ビニルアイソレーター内で無菌(Germ free: GF)マウスを出産させ、仔マウスが 10 日齢時にその母マウスに EW マウスまたは NW マウス糞便由来細菌叢を経口投与して細菌叢マウス (GF-EW or GF-NW) を作成した。それら仔マウスの行動と腸内細菌叢構成、腸管の免疫細胞を解析した。結果として GF-EW マウスは GF-NW マウスより Proteobacteria 門の組成比が高く、Verrucomicronita 門の組成比が低かった。4 週齢時の Tail suspension test では、GF-EW マウスは GF-NW マウスより顕著なうつ様行動を示したが、この差異は 8 週齢時にはみられず、EW マウスと類似した行動変化を示した。Marble burying test においては 4 週齢時に GF-EW マウス GF-NW マウスより長い移動距離を示した。Open field test では、GF-EW マウスと GF-NW マウスの運動活に差異はなかった。8 週齢の GF-EW マウスの脾臓では T 細胞の数および Foxp3 陽性細胞の減少が認められた。これらのことから、EW による行動発達および免疫系の変化には腸内細菌叢の変化が関与することが明らかとなった。

【第 2 章：母性行動の世代間伝播における腸内細菌叢の関与】

これまで EW マウスでは母性行動の中でも仔マウスへのリッキングやグルーミングの割合が低下することが知られている。さらに近年、EW マウスに育てられた次世代マウスが成体になった時も、母と同様の低い母性行動を示すことが分かってきた。第 2 章では、この母性行動の伝播における腸内細菌叢の関与を明らかにすることを目的に実験した。第 1 章の実験 2 と同様の方法を用いて、GF-EW マウスと GF-NW マウスを作成してビニルアイソレーター内で繁殖させ、母性行動を観察した。その結果、GF-EW マウスは GF-NW マウスと比較して、リッキングやグルーミングの割合が低下する傾向があり、巣の出入り回数が顕著に多かった。これらのことから、EW マウスで見られる低い母性行動の次世代への伝播にも腸内細菌叢の変化が関与することが示唆された。

【第 3 章：性発達における腸内細菌叢の関与】

GF マウスは SPF マウスと比較して産仔数や着床率が低く、膣開口が遅延することが知られている。第 2 章では、EW マウスの低い母性行動は腸内細菌叢構成変化に起因することが示唆されたが、そもそも腸内細菌叢の構成変化によって性発達が影響を受けた可能性がある。第 3 章では、雌マウスの性発達における腸内細菌叢の影響を調査することを目的とした。4 週齢の GF マウスに SPF マウスまたはモルモット (Guinea pig: GP) の糞便由来細菌叢を投与した細菌叢マウス (GF-SPF マウス or GF-GP マウス) を作出した。これらのマウスに加えて、SPF マウスおよび GF マウスのステロイドホルモン (エストラジオール、プロゲステロン、コルチコステロン) の糞中含有量を 8 週齢まで継時的に測

定した。また、これらの雌マウスが雌雄どちらのマウス尿の匂いを選択するかを評価するために **Odor preference test** も実施した。その結果、**GF** マウスのステロイドホルモンレベルは **SPF** マウスよりも顕著に低く、**SPF** マウスでみられる週齢による増加もなかった。**GF-SPF** マウスでは、**SPF** マウスと類似したホルモン変動がみられたが、**GF-GP** マウスのホルモンレベルはそれよりも低かった。**Odor preference test** では雌の **GF-SPF** マウスは雄の匂いをより長く嗅いだが、雌の **GF** マウスは雄の匂いへの嗜好性を示さなかった。これらのことから、腸内細菌叢は性発達に影響をおよぼすことが示唆された。

【総括】

第1章と第2章では通常よりも早く離乳したマウスの行動表現型に及ぼす腸内細菌叢の影響を、**GF** マウスを用いて検討した。その結果、**EW** マウスと **EW** マウス糞便由来細菌叢を経口投与された **GF** マウスは同様に高いうつ様行動と新奇物に対する反応性を示すことから、早期離乳による情動行動の変化に腸内細菌叢の変化が関わっていることが示された。また、母性行動の観察結果から、**EW** マウス糞便由来細菌叢を経口投与された **GF** マウスは、リッキングやグルーミングの割合が低下する傾向があり、巣の出入り回数が顕著に多かった。**EW** マウスで見られる低い母性行動と、その低い母性行動の次世代伝播にも腸内細菌叢の変化が関与することが示唆された。

第3章では、4週齢の **GF** マウスに **SPF** マウスまたはモルモットの糞便由来細菌叢を投与した各細菌叢マウス (**GF-SPF** or **GF-Guinea pig**) を作出し、性発達に対する腸内細菌叢の影響を調査した。その結果、**GF** マウスは **SPF** マウスより糞中ステロイドホルモン含量が低く、**SPF** マウス腸内細菌叢を投与することで **SPF** マウスのレベルにまでステロイドホルモンが増加した。しかし、モルモット腸内細菌叢の投与ではこの増加レベルは **SPF** マウスより低かったことから、ステロイドホルモンの正常な分泌には宿主特異的な腸内細菌叢が必要であることも示唆された。また、雌の **GF** マウスに **SPF** マウスの腸内細菌叢を投与することによって、**GF** マウスでみられない雄の匂いへの嗜好性がみられたことから、腸内細菌叢は性嗜好性の発達にも関与することが示された。

本研究から、幼少期の母子関係やストレスによって仔の情動行動や内分泌発達が変化する現象において、腸内細菌叢の構成変化が重要な役割を果たすことが明らかとなった。今後、腸内細菌叢がどのようにこれらの現象に関与するのかといったメカニズムがさらに解明され、幼少期に母子関係が障害されたりストレスに曝露された動物の行動や中枢機能が、プロバイオティクス投与によって改善されることが示されれば、伴侶動物や家畜動物の育成方法、また人の育児においても応用価値を生み出すことが期待できる。

【参考文献の投稿状況】

第3章は以下の論文として公表済みである。

Kamimura, I. et al. 2019. *Developmental Psychobiology*, 61(5):670-678.

論文審査の結果の要旨

雌性動物のみが仔に哺乳するように進化した哺乳類動物では、幼少期の母との関係性は仔の行動発達に大きな影響を与える。例えばマウスの仔を通常の離乳時期よりも早い時期に早期離乳（**Early weaning: EW**）すると、成長後に不安行動や攻撃行動が増加し、ストレス反応が増強する。さらにこの **EW** による行動変化やストレス応答の増強は **EW** された個体の子孫にまで伝播することも示唆されている。一方、近年では発達期における腸内細菌叢の構成が正常なストレス応答や免疫機能の確立、さらに神経発達にまで関与するということが報告され始めている。これらのことから、**EW** によって仔の腸内細菌叢の構成が変化し、そのことが成長後の変化を引き起こしている可能性や、**EW** の影響が次世代に伝承される現象も腸内細菌叢の垂直伝播によってもたらされる可能性が考えられる。そこで本研究では、**EW** マウスをモデルに、主に無菌（**Germ free: GF**）マウスへの腸内細菌叢移植法を用いることで、幼少期の行動発達における腸内細菌叢の役割解明を目指した。

第 1 章では早期離乳マウスの発達期と成熟後の不安行動やうつ様行動を調査し、それらの早期離乳による行動変化に腸内細菌叢が関与するかを調べた。床敷きに置かれた新奇物体であるガラス玉への反応から不安様行動を測定する **Marble burying test** では、**EW** マウスは 4 週齢時のテストで通常離乳（**Normal weaning: NW**）マウスよりも多動だった。また、マウスの尾を固定して空中にぶら下げ、マウスの不動時間からうつ様行動を測定する **Tail suspension test** では、**EW** マウスは 4 週齢時のテストで **NW** マウスよりも不動時間が長く、発達期にうつ様行動が増加すると考えられた。またこれらマウスの糞便を用いた細菌叢解析から、門レベルの比較でバクテロイデス門およびウェルコミクロビウム門の比率が **EW** マウスで有意に高いことがわかった。次に、**EW** マウスまたは **NW** マウスの糞便由来菌液をビニルアイソレーター内にて出産後 10 日齢の仔マウスを育てている **GF** 母マウスに経口投与した。**EW** マウスの糞便由来菌液を投与された **GF** マウスの仔（**GF-EW** マウス）と **NW** マウスの糞便由来菌液を投与された **GF** マウスの仔（**GF-NW** マウス）を発達段階ごとに、ビニルアイソレーター内にて行動テストを実施した。結果として、**GF-EW** マウスは **GF-NW** マウスと比較して 4 週齢時の **Marble burying test** で多動であり、また **Tail suspension test** で高いうつ様行動を示した。これら **GF-EW** マウスと **GF-NW** マウスの糞便を用いた細菌叢解析からは、**GF-EW** マウスと **GF-NW** マウスの腸内細菌叢の構成は、それぞれの母マウスとは同様であったが、両者間では異なっていた。これらのことから、**EW** でみられた発達期のうつ様行動の増加や新奇物体への反応性の増加には、**EW** による腸内細菌叢の構成変化が関与することが示唆された。また免疫細胞の発現プロファイルを計測した結果、**GF-EW** マウスでは脾臓における **CD4** 陽性 T 細胞の細胞数が低下していたことなどから、腸内細菌叢の構成変化は免疫系に影響を与えることも示唆された。

第 2 章では、第 1 章と同様に **EW** マウスまたは **NW** マウスの腸内細菌叢を **GF** マウスに定着させた **GF-EW** マウスと **GF-NW** マウスの母性行動を観察し、**EW** による母性行動変化への細菌叢の関与を調べた。先行研究からは **EW** マウスは自身の仔マウスへ示す母性行動のなかでも仔を舐めるリッキン

グ・グルーミングがNWマウスよりも低く、このEWマウスに育てられた次世代マウスが成体になった時も、母と同様の低い母性行動を示すことが示唆されている。出産後1日目から9日目の母性行動を観察した結果、GF-NWマウスと比較して、GF-EWマウスではリッキング・グルーミングの割合が低下する傾向がみられ、巣の出入り回数が多かった。このことから、EWマウスの低下したリッキング・グルーミングが次世代にまで伝播される現象にも腸内細菌叢の構成変化が関与することが示唆された。

第3章では、雌マウスの性成熟に対する腸内細菌叢の影響を調べた。第2章では細菌叢構成変化によって母性行動が変化することが示唆されたが、そもそも細菌叢の構成変化によって母性発現の基盤となる性成熟が影響を受けた可能性も考えられる。方法として、4週齢の雌のGFマウスにSPFマウスまたはモルモット (Guinea pig : GP) の糞便由来菌液を投与して雌の各細菌叢マウス (GF-SPFマウス or GF-GPマウス) を作出し、これらマウスとGFマウスおよびSPFマウスの糞中ステロイドホルモン (エストラジオール、プロゲステロン、コルチコステロン) の濃度を8週齢まで継時的に測定した。また8週齢時には、これら雌マウスが雌雄どちらの匂いを選択するかを調べる匂い嗜好性テストも実施した。結果として、SPFマウスでは週齢を追うごとに各ホルモンレベルの増加がみられたが、GFマウスのホルモンレベルはどれも顕著に低く、週齢による増加もみられなかった。GF-SPFマウスとGF-GPマウスのホルモン変動はSPFマウスのものと類似していたが、GF-GPマウスのホルモンレベルはGF-SPFマウスよりも低かった。これらのことから、腸内細菌叢は性成熟に伴うステロイドホルモンの合成・分泌促進に重要であり、その効果はその種に特有の細菌叢のほうが大きいことが示唆された。また、テストケースの2つの区画にそれぞれ雄マウスと雌マウスの尿を含む床敷きを提示する匂い嗜好性テストでは、雌のGF-SPFマウスは雌の匂いより雄の匂いを嗅ぐ時間が長かった。しかし、雌のGFマウスは逆に雌の匂い嗅ぎ時間が長かった。これらのことから腸内細菌叢は正常な性嗜好性の発達に関与することも示唆された。

本研究では幼少期の母仔関係によって仔の情動や社会行動が発達するプロセスにおける腸内細菌叢の役割を、GFマウスへの細菌叢移植という手法を用いて解明することを目指した。本研究から、マウスを通常よりも早く離乳すると、通常時期に離乳されたマウスとは腸内細菌叢の構成が変化し、そのことによって発達期にうつ様行動が増加し、また母となった際には仔マウスへのリッキング・グルーミング行動が減少することが実証された。また種特有の腸内細菌叢が発達期のステロイドホルモンの合成・分泌機能および性嗜好性の発達にも重要な役割を果たしていることも見出した。細菌叢の構成変化がどのように中枢神経に作用して行動発達を調節するのかといったメカニズムに関しては今後の課題といえるが、幼少期の母仔関係によって仔の行動発達が変容するという哺乳類に特徴的な発達過程における細菌叢の役割を、GFマウスを利用して示した成果は大きいと考えられる。細菌叢による行動や神経系の発達調節は、将来的には伴侶動物や産業動物、またヒトの育仔においても応用的価値を生み出すことが期待されるものであり、本研究はこの新たな分野の礎となりうるものといえる。

以上のことから、本研究は博士 (学術) の学位を授与するのにふさわしい業績と判断した。