

令和元年6月13日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14340

研究課題名(和文) 妊娠期高脂肪食が仔マウスの多動性障害を引き起こす一脂肪酸の神経細胞への影響

研究課題名(英文) Maternal high-fat diet caused hyperactivity in the offspring of mice

研究代表者

山野 眞利子 (Yamano, Mariko)

奈良県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：80192409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠2週目の母マウスに50%高カロリーの脂肪食(HFD)を1週間与えると、仔マウスは著明なhyperactivity(多動)を示し、普通食(ND)と比較すると脳の視床下部外側野の摂食に関連するとされるオレキシン神経細胞の活性化と肥大化が認められることを見つけた。さらにオレキシン受容体の選択的ブロッカーや、受容体拮抗薬物の投与により、仔の多動が大幅に抑制された。これらのことは母親マウスの妊娠中の高脂肪食により胎児の脳におけるneurogenesisが何らかの影響を受け、オレキシン等特定の神経細胞の活動が増加し、仔の多動という行動異常を引き起こしたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス妊娠中期の高脂肪餌とオレキシン神経細胞の発生分化に注目し検討した結果、ND、HFD両群とも胎生14日にオレキシン神経細胞は出現し、転写因子であるFoxp2がすでに細胞内に認められた。このことよりオレキシン神経細胞は胎生後期より既に脳内で働いていることが示唆された。またHFD群ではE17からオレキシン神経細胞内に細胞の活動性を示すc-fosが出現し、さらに出生直後からHFD群で優位に多く認められたことより、高脂肪食により仔のオレキシン神経細胞の活動自体が胎児期後期より高まっていることを示唆している。オレキシン神経細胞の活動の異常上昇がADHDに関連する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：It is well known that fetal nutritional environment has an influence on the postnatal development of various diseases including mental disorders. We previously reported that offspring mice of dams on a high-fat diet showed increased expression of orexin (OX) containing neurons in the lateral hypothalamus. Moreover they showed abnormal spontaneous motor activity. OX neurons are well known to play a key role in the control of arousal, locomotion and motivation. These findings suggest that maternal high-fat diet is one of the causes of mental disorders characterized by hyperactivity such as ADHD in children, probably through the increased proliferation of OX neurons in the hypothalamus in fetal period.

研究分野：神経解剖学

キーワード：妊娠期高脂肪食 生まれた子マウス hyperactivity オレキシン細胞 発達障害

1 . 研究開始当初の背景

(1) 近年、食の欧米化により脂質の多い食事摂取頻度が増えたことから、食事に占める脂肪エネルギー比が増加している。健康増進や疾病予防の観点から国の施策の「健康日本21」では20～40歳の1日あたりの平均脂肪エネルギー比率の目標値を30～25%以下と定めているが、しかし国の調査では男女とも殆どの世代で平均値がこの目標値を超えており、国民的に脂質の摂取過多が問題となっている。また、胎児期における母体内環境が胎児の将来のメタボリックシンドローム（肥満・高血圧・糖代謝異常・脂質代謝異常）や生活習慣病の発症を左右するというエピジェネティクスの概念が提唱されてきた。エピジェネティクスとは遺伝子の本体であるDNAあるいはヒストンの化学修飾による遺伝子発現調節システムである。これは神経発達においても重要な役割を果たしており、その破綻は様々な先天性発達障害や疾患の原因になるとされている。これに加え、胎児期の微細な神経回路の形成障害が将来の疾患の発症の脆弱性基盤に関係するとされ、胎児期の母体内環境が脳の発達にも大きく影響を及ぼす可能性が指摘されている。近年、広汎性発達障害（自閉症など）、学習障害（LD）、注意欠陥多動性障害（ADHD）などの発達障害を持つ患者が増えているがこのことに神経発達障害仮説が関係していると考えられる。

(2) 妊娠期から授乳期にわたって母親に高脂肪食を摂取させると胎生期(E14)に視床下部ニューロンに移行する第3脳室周辺での neurogenesis の増加が示されている。また仔マウスが成長した時に視床下部で Dynorphin, Galanin, Enkephalin(室傍核), Orexin, MCH (外側野)などを産生するニューロンが増えること、摂食量が増え、体重・体脂肪の増加、血中の中性脂肪、遊離脂肪酸、レプチン、インスリンの増加が報告されている(Chang et al.)。このことは、母親の食習慣が子供の成人後の生活習慣病の原因にもなることを示しており興味深い。

2 . 研究の目的

我々は妊娠2週目の母マウスに高脂肪食餌(High Fat Diet: HFD)を与えると、生後8週頃から雄の仔マウスが著明な hyperactivity(夜間のみ)を示し、脳の視床下部外側野の Orexin 産生ニューロンの増大が認められた(山野他、図1&2)。さらに Orexin 受容体の選択的なブロッカーである SB334867A (1 mg/mouse, i.p.)を投与したところ、hyperactivity などの行動異常が抑制された。これは母親の妊娠中の高脂肪食により胎児の脳に影響を受け、生後の行動異常の原因となる、いわゆる発達障害のモデルとなると考えられる。

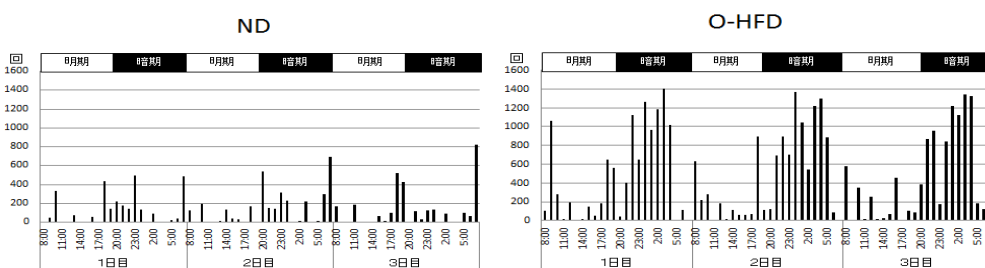


図1. 3日間の自発運動の比較。右のHFD群で自発運動が著明に亢進している。

このモデル動物の脳機能異常を形態学的に明らかにすること、さらにどの脂肪酸成分が胎児期の神経細胞の分化に作用するのか、また胎生期から生後の neurogenesis への影響について詳細に解析することにより、「発達障害」の原因究明と予防・治療に資することを目的とする。

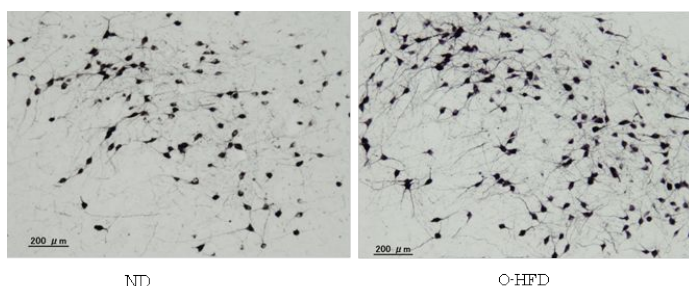


図2. 視床下部外側野におけるオレキシン陽性細胞顕微鏡写真。右側HFD群で細胞の肥大と突起の伸展が認められる。

3. 研究の方法

本研究は公立大学法人大阪府立大学及び奈良県立医科大学動物実験規定に基づき実施した。飼料及び水は自由摂取とし、飼育は個別ケージで室温 22 ± 2 °C, 1日12時間の採光周期(8:00 am ~ 8:00 pm 明期)の動物舎で行った。妊娠1日目のICRマウス(日本SLC)20匹を普通食群(ND群; n=10)、高脂肪食群(HFD群; n=10)に分けた。普通食群には継続して普通食飼料(オリエンタル酵母社製: MF/脂質12.8%, たんぱく質25.7%, 炭水化物61.5%)を与えた。高脂肪食群には妊娠7日目から14日目にのみ60%カロリー比高脂肪飼料(オリエンタル酵母HFD-60/脂質35%, たんぱく質23%, 炭水化物23.5%)を与えた。それ以外の期間は普通食を与えた。妊娠14, 16, 17日胎児は母体を犠牲死させ、出産後のマウスは0, 2, 4, 7, 14日の仔マウスの脳を取り出し、4%パラフォルムリンサン緩衝液で固定した。30% sucrose にて置換後、クリオスタット(Leica社/ドイツ)で20 μmの凍結切片を作製し、種々の抗体を用いて多重免疫組織染色を施行した。胎生期から新生児期における脳での下記の神経活性物質や転写因子等出現についてHFD群とND群を比較して検討した。

胎生期から生後にわたって神経系の解剖学的特徴・異常の検索

胎生期から生後の神経幹細胞の増殖と分化について多重蛍光免疫染色法による検討

胎生期から生後の神経グリアをGFAP陽性 astrocyte やIba1陽性 microgliaでの差異
ニューロンに分化する時期において脂肪酸結合蛋白である fatty-acid binding protein (FABP5, FABP7) への影響の差異

DNA 転写因子Forkhead box protein 2 (Foxp2) Forkhead box protein a2 (Foxa2) 等の差異

4. 研究成果

胎生早期に神経幹細胞は専ら増殖し、中期にはニューロンに分化し、後期になると astrocyte への分化が起こる。また本実験の準備段階で高脂肪環境により妊娠中期に大脳皮質で神経細胞への分化が亢進していることを報告している。ニューロンに分化する妊娠14日目(E14)以降の視床下部について検討を行った。

(1) オレキシン神経細胞は神経幹細胞がニューロンへの分化する時期 E14 に両群ですでに出現が認められた。胎生期では高脂肪環境により第 3 脳室周辺での neurogenesis の増加が報告されているが、オレキシン神経細胞は第 3 脳室周辺ではなく視床下部の外側部に出現した。これは Ogawa らの E12 よりオレキシン promoter が発現し E14 より神経分泌される報告と一致した。しかし我々が生後に認めたニューロンの肥大や突起の伸長等の差異は確認できなかった。また Ogawa らによると、オレキシン神経細胞は生後 3 週間ゆっくりと成熟し活動電位がおこるのは生後 21 日ごろとされる。しかし今回、オレキシン細胞内に活性を示す c-fos が生直後より HFD 群で多く認められたことより、母体内高脂肪環境がオレキシン神経細胞の活動を上昇させていると考えられる。

(2) 我々は成獣のオレキシン神経細胞が GABA のマーカーである Calbindin 免疫陽性を示すことを見つけている。しかし胎児期には Calbindin はオレキシン細胞に出現しなかった。このことは生後にニューロンが成熟した後に GABA 系の働きが加わり複雑な機能を発揮すると考えられる。

(3) GFAP 陽性 astrocyte は生後に出現し HFD 群でやや強かった。また Iba1 陽性 microglia は胎生後期から出現し、視床下部外側野では HFD 群で免疫陽性が強く、microglia が活性化する何らかの変化が起こっている可能性が示唆される。

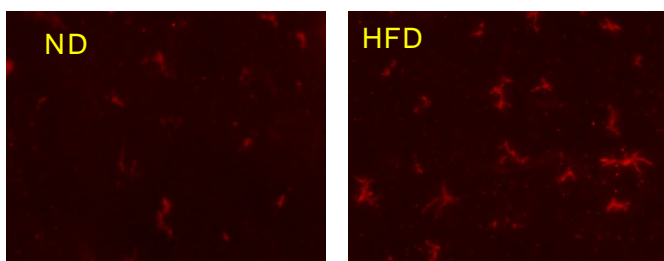


図 3 生直後マウス視床下部の Iba1 免疫陽性細胞。HFD 群の方が ND 群に比較して赤い蛍光が強い。

(4) マウス胎生期における脂肪酸結合蛋白 FABP5 および FABP7 は neuronal progenitor cell や astrocyte に発現するとされるが、今回胎生期には両者の発現は少なく、HFD 群と ND 群とに差はなかった。またオレキシン神経細胞には出現しなかった。母体の高脂肪環境はこれらの脂肪酸結合蛋白の発現には影響していないと考えられる。

(5) DNA 転写因子である Foxp2 と Foxa2 は胎生期にすでに出現していた。さらに Foxp2 は E14 にオレキシン細胞に共存したことより、オレキシン神経細胞の転写活性に直接関与していることが明らかになった。また最近 ADHD 患者の遺伝子の異常相違領域に Foxp2 遺伝子があることが報告され、Foxp2 とオレキシン神経細胞の活動等異常に何らかの関係があると考えられる。

以上のことよりオレキシン神経細胞はドーパミン神経細胞の出現と同時期の胎生中期に始まる neurogenesis の初期から視床下部に出現する重要な神経細胞であり、母体の高脂肪環境がオレキシン神経細胞に何らかの影響を及ぼし神経活動の上昇をおこしていることが考えられる。またこのことがマウスが成熟した際に 行動異常 hyperactivity を示す原因ではないかとも考えられる。今後全脳における高脂肪環境による影響を詳細に検討し、発達障害との関連を解明していく予定である。

<引用文献>

澤井 彩、黒瀬結子、山野眞利子、妊娠期高脂肪食は仔マウスに影響する、J Life Sci Res, 11 巻 2103,11-15.

丹間瑞季、菅 詩音、山野眞利子、妊娠期高脂肪食は仔マウスに影響するーオリーブ油の検討、J Life Sci Res, 11 巻,2104,21-24.

Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. J Neuroscience, 2008, 28: 12107-12119.

Ogawa Y, Kanda T, Vogt K, Yanagisawa M, Anatomical and electrophysiological development of the hypothalamic orexin neurons from embryos neonates. J Comp Neurology,2017,525: 3809-3820)

5 . 主な発表論文等

Kawaguchi AT, Salybekov AA, Yamano M, Kitagishi H, Sekine K, Tamaki T. PEGylated carboxyhemoglobin bovine (SANGUINATE) ameliorates myocardial infarction in a rat model. *Artif Organs*, 2018;42:1174-84.

[雑誌論文](計 1 件)

[学会発表](計 1 件)

Namihira M, Yamano M, Hirano K, Otsuka MI, Igarashi K, Maternal high-fat diet alters neurogenesis in the embryonic mouse forebrain. *Neuroscience (Shikago)*2015

[図書](計 0 件)

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：仙波恵美子

ローマ字氏名：Senba Emiko

所属研究機関名：和歌山県立医科大学医学部

部局名：リハビリテーション学科

職名：博士研究員