

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08441

研究課題名(和文)胎生期の幹細胞ストレスによる生後の脳内リン脂質構成異常と発達障害発症機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism, through which the disturbances in the behavior and the brain phospholipid composition are caused by prenatal stress to the neural stem cells.

研究代表者

宇田川 潤 (Udagawa, Jun)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10284027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠5.5日から10.5日まで対照群の4.0%に食餌を減らした母獣から生まれた仔ラット雄では、生後に多動、および脳内のリン脂質合成酵素の発現上昇とリン脂質構成異常が認められた。また、変化したリン脂質の一つのPE(18:0p-22:6)の投与により、胎生期低栄養ラットの多動の一部を再現することができた。一方、リン脂質シグナリングに関連するプロテインキナーゼC経路を抑制しても行動に変化が生じなかった。これらの結果により、胎生期低栄養は仔の神経胚などの幹細胞の性質を変化させ、生後にニューロンあるいはグリア細胞のリン脂質の構成異常を引き起こすことによって、行動異常を生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では1990年代後半から低出生体重児が増え続け、現在では約1割となっている。低栄養をはじめ胎生期のストレスは生後の統合失調症、発達障害の発症リスクを増加させることが疫学的にも示されており、本邦では今後これらの疾患の罹患率増加が危惧されている。本研究では幹細胞ストレスによる生後の行動異常の原因として、特定のリン脂質が関与していることを動物実験により示した。また、これらの行動異常は生後の環境により改善できる可能性を提示した。本研究は、現在増えつつある発達障害の予防のみならず、リン脂質投与や環境改善など発達障害の治療に対する知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：Undernutrition in the rat dams during early pregnancy led to hyperactivity, and the activation of genes related to phospholipid biosynthesis and the disturbance in the phospholipid composition in the prefrontal cortex of male offspring. Injection of ethanolamine plasmalogen (18:0p-22:6), which was most increased in the prenatal undernourished offspring, reproduced a part of those behavioral disturbances. However, inhibition of protein kinase C pathway involved in phospholipid signaling, did not affect the behavior of the prenatal undernourished rats. These results suggest that prenatal undernutrition causes postnatal behavioral disturbances by inducing the change in the phospholipid composition in the prefrontal cortex mediated through an alteration of the characteristics of the neural stem cells.

研究分野：DOHaD

キーワード：ストレス 胎生期 脳 リン脂質 行動異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠期の低栄養や感染、災害の経験など様々なストレスは胎生期の脳の発生に影響を与えると同時に、その変化は胎児プログラミングという形で生後の細胞・組織あるいは器官内に蓄積される。妊娠期のウイルス感染による母体免疫系活性化や、高脂肪食あるいは母体の肥満も子の脳における炎症性サイトカイン誘導やミクログリア活性化を引き起こし、不安行動などの行動異常の原因となる可能性が報告されている。また、これまでの疫学調査および動物実験により、妊娠母体の低栄養や精神的なストレスも子の精神疾患や発達障害発症との関連が示唆されてきた。これらのストレスは子の脳内セロトニンあるいはドーパミン作動性神経異常、あるいは DNA メチル化を介して GABA 合成酵素 (GAD67) や Reelin など統合失調症関連遺伝子の発現異常を誘導することがマウスで報告されている。以上のように、これまでは脳内の免疫系バランスや神経伝達物質と行動異常との関連を探る研究が主流であり、胎生期の幹細胞ストレスによるリン脂質構成変化に着目した研究はなされてこなかった。

一方、我々のこれまでの研究により、ラット胚盤胞着床時期の胎生 5.5 日から神経管閉鎖前の胎生 10.5 日における低栄養ストレスによって生後に抗不安様行動を呈するようになること、および当該ラットでは血中エタノールアミン (Etn) 濃度が上昇していることが明らかとなった。不安症状を呈するうつ病では血中エタノールアミンリン酸 (P-Etn) の減少が報告されていることから、我々は Etn、あるいはその代謝物の増加が本ラットの抗不安様行動を引き起こす原因の一つと考え研究を進めてきた。生体内では Etn から P-Etn を経て、リン脂質の一種であるフォスファチジルエタノールアミン (PE) が生合成されるため、ラットの情動行動制御に関与する前頭前皮質において、PE 生合成経路に関わる酵素群について遺伝子発現を検討したところ、低栄養群ではリン脂質生合成経路の酵素遺伝子の発現亢進が認められた。リン脂質の原料となるグリセロールの濃度も低栄養群の血漿及び CSF で上昇していたため、エタノールアミンおよびグリセロールの両代謝経路を介して PE、フォスファチジルセリン (PS) の生合成が亢進した可能性が考えられた。これらの予備的実験結果は、胚性幹細胞から神経幹細胞までの時期に与えられた低栄養ストレスが、幹細胞にエピゲノムの変化を生じ、成熟ニューロンやグリアに受け継がれて、膜リン脂質合成代謝異常をきたすことを示唆している。以上より、我々は脳内のリン脂質構成に注目して胎生期の幹細胞ストレスと生後の発達障害発症との関連を明らかにする研究を進めた。

2. 研究の目的

- (1) リン脂質合成経路の酵素遺伝子発現解析により、胎生初期の幹細胞に対する低栄養ストレスが生後の脳のリン脂質構成異常を引き起こすメカニズムについて明らかにする。
- (2) 脳内のリン脂質構成異常の解析、および変化した特定のリン脂質投与実験を行い、多動に関連するリン脂質の同定を行う。
- (3) リン脂質の産生あるいはシグナリングに関連するプロテインキナーゼ C の阻害による行動への影響を観察し、リン脂質シグナリングの抑制効果を確認する。
- (4) DNA やヒストンのメチル化においてメチル基供与体となる葉酸をラット妊娠母体へ投与し、胎生期低栄養による行動異常の改善効果を検討する。また、離乳後のハンドリングによる仔の行動異常の発症予防効果についても検討する。

3. 研究の方法

- (1) リン脂質生合成酵素の遺伝子発現解析
妊娠初期 (妊娠 5.5 日から 10.5 日) に食餌量を対照群の 40% にした母獣から生まれたラット、および対照群の前頭前皮質、側坐核、線条体から RNA を抽出し、qPCR により mRNA 量を定量・比較した。
- (2) 前頭前皮質、側坐核、線条体の凍結切片を作成し、質量顕微鏡を用いて PE、PS およびホスファチジルイノシトール (PI) 量を測定した。また、リボソームに 18:0p-22:6 エタノールアミンプラズマローゲン (PIsPE(18:0p-22:6))、あるいは PE(16:0-18:1) を組み込み、生後 14 週のラットに投与することによって、それらのリン脂質の行動に対する効果を調べた。行動評価にはオープンフィールドテストと高架式十字迷路試験を用いた。
- (3) 胎生期低栄養群および対照群のラットに PE およびホスファチジルコリン (PC) の産生阻害、ならびに PS や PI がシグナリングに関与する PKC 経路の阻害剤 (chelerythrine: 3 mg/kg BW) を投与し、高架式十字迷路およびオープンフィールドテストを行った。
- (4) 対照群及び妊娠初期低栄養母獣の全妊娠期間中に通常の 5 倍の葉酸濃度 (25 mg/kg food) の餌を与え、産仔の行動実験を行った。

4. 研究成果

- (1) 胎生 5.5 日から 10.5 日に低栄養負荷を行った雄ラットの生後 9 週の前頭前皮質では、ジアシル型リン脂質の合成酵素の他、Agps などプラズマローゲン合成酵素の遺伝子発現が増加していた。そこで、質量顕微鏡解析を行ったところ、前頭前皮質では 18:0p-22:6 エタノールアミンプラズマローゲン (PIsPE(18:0p-22:6))、およびリゾホスファチジルエタノールアミン (20:1) の有意な増加が認められた。一方、側坐核、線条体ではこれらに変化はなかった。これらの結果から、前頭前皮質の PE、特にエタノールアミンプラズマローゲンが胎生期低栄養

ラットの行動異常に関連していることが示唆された。

(2) 生後 14 週のラットに PlsPE(18:0p-22:6) を投与し、生後 8 週で行った行動実験結果と比較したところ、PlsPE 投与群では crossing および中心領域滞在時間の週令による減少が抑制された。さらに本ラットでは投与した PlsPE が前頭前皮質で増加していた。すなわち、前頭前皮質の PlsPE(18:0p-22:6) は、胎生期低栄養群でみられた行動異常のうち、crossing および中心領域滞在時間の増加に関連していると考えられた。PlsPE(18:0p-22:6) は特徴的な 3 つの構造、() 頭部のエタノールアミン、() プラズマローゲンに特徴的な sn-1 位にビニールエーテル結合、() sn-2 位に結合するドコサヘキサエン酸 (DHA) を有する。この 3 つの構造のうち、まずは頭部のエタノールアミンが機能を発揮するのに主要な役割を果たすかどうか調べるために PE(16:0-18:1) を投与したところ、ラットに行動変化は生じなかった。したがって、PlsPE(18:0p-22:6) の機能はビニールエーテル結合、あるいは尾部に結合する脂肪酸が特に重要な役割を持っていることが示唆された。

(3) 次に、リン脂質の機能抑制時の行動への影響を調べるため、chelerythrine を投与し行動試験を行った。対照群では高架式十字迷路試験で crossing の減少や closed arm での滞在時間の増加など不安様行動を誘発したが、胎生期低栄養群ではオープンフィールドおよび高架式十字迷路試験共に chelerythrine による変化が認められなかった。また、胎生期低栄養ラットの不安様行動は、離乳後の毎日のハンドリングにより改善可能であった。

(4) 妊娠期の葉酸強化による行動異常予防効果について調べたところ、妊娠初期低栄養群では葉酸強化により仔の不安様行動が、葉酸未投与群のみならず対照群よりも減少した。低栄養胚では葉酸による感受性が亢進しており、過剰葉酸投与は仔の脳機能に複雑な影響を与えることが示唆された。

以上より、本研究では以下のことが明らかとなった。

1) 胎生期低栄養ラットでは、生後に脳内のリン脂質生合成酵素の発現上昇とリン脂質構成異常が認められ、脳内リン脂質の変化が行動異常を誘発する可能性を示した。

2) PlsPE(18:0p-22:6) は胎生期低栄養ラットの行動異常の一部に関連していることが示唆された。

3) 胎生期低栄養ラットの行動異常は、PKC 経路の活性化との関連性が低いと考えられた。

4) 胎生期低栄養ラットの不安様行動は、若年期の毎日のハンドリングなど、生後の環境により改善できる可能性が示唆された。

5) 胎生期低栄養胚は葉酸に対する感受性が亢進しており、妊娠中の低栄養状態における過剰葉酸投与は、仔に過剰な抗不安効果を引き起こす可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Hino K, Kimura T, Udagawa J. Handling has an anxiolytic effect that is not affected by the inhibition of the protein kinase C pathway in adult prenatal undernourished male rat offspring. *Congenit Anom (Kyoto)* 査読有 in press
DOI: 10.1111/cga.12332.

Kimura T, Hino K, Kono T, Takano A, Nitta N, Ushio N, Hino S, Takase R, Kudo M, Daigo Y, Morita W, Nakao M, Nakatsukasa M, Tamagawa T, Rafiq AM, Matsumoto A, Otani H, Udagawa J. Maternal undernutrition during early pregnancy inhibits postnatal growth of the tibia in the female offspring of rats by alteration of chondrogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 査読有 260:58-66, 2018
DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.12.008.

Kaneda R, Saeki Y, Getachew D, Matsumoto A, Furuya M, Ogawa N, Motoya T, Rafiq AM, Jahan E, Udagawa J, Hashimoto R, Otani H. Interkinetic nuclear migration in the tracheal and esophageal epithelia of the mouse embryo: Possible implications for tracheo-esophageal anomalies. *Congenit Anom (Kyoto)* 査読有 58(2):62-70, 2018
DOI: 10.1111/cga.12241.

宇田川潤、自閉症スペクトラムと妊娠中の関連要因、日産婦医会報、第 70 巻第 3 号、2018、10 - 11 DOI なし

The LMSR method for providing a multidimensional understanding of growth standard in human fetuses. *Stat Methods Med Res* 査読有 ;27(9):2809-2830, 2017
DOI: 10.1177/0962280216687339.

宇田川潤、日野広大、妊娠期のストレスと、子の精神疾患・発達異常、*Neonatal Care*、査読なし、Vol.30、No.12、1169、2017、DOI なし

宇田川潤、日野広大、脳のリン脂質組成変化と情動の関連、*Medical Science Digest*、査読なし、Vol.43、No.12、2017、597-600、DOI なし

宇田川潤、日野広大、妊娠期の母体ストレスと脳機能形成異常、*日本衛生学雑誌*、査読有、71 巻、2016、188 - 194

DOI: <https://doi.org/10.1265/jjh.71.188>

〔学会発表〕(計 9 件)

宇田川潤、妊娠中のストレスと生後の疾患の関連について、第 28 回滋賀県母性衛生学会、2019
日野広大、木村智子、宇田川潤、妊娠中の低栄養ストレスは母乳成分の変化をもたらす、第 7 回日本 DOHaD 学会、2017
木村智子、日野広大、宇田川潤、胎生初期低栄養曝露による閉経モデルラットは非アルコール性脂肪性肝疾患を呈する、第 7 回日本 DOHaD 学会、2018
日野広大、小野哲男、木村智子、小島秀人、村上 節、宇田川潤、胎生期低栄養ストレス下での過剰葉酸曝露は生後に抗不安様行動を引き起こす、第 123 回日本解剖学会、2018
木村智子、日野広大、小野哲男、西倉紀子、宇田川潤、胎生期低栄養ストレスと閉経後高度肥満ならびに非アルコール性脂肪性肝疾患の関連、第 123 回日本解剖学会、2018
日野広大、金子隼也、木村智子、武井史郎、森田真也、杉原洋行、山崎文義、瀬藤光利、小島秀人、宇田川潤、Phosphatidylethanolamine 投与による脳内リン脂質組成と行動の変化、第 6 回日本 DOHaD 学会、2017
小野哲男、日野広大、木村智子、内村康寛、小島秀人、村上節、宇田川潤、妊娠初期 40 パーセント栄養制限と過剰葉酸 (10mg/kg) が仔ラットに及ぼす影響、第 6 回日本 DOHaD 学会、2017
日野広大、金子隼也、武井史郎、森田真也、杉原洋行、瀬藤光利、小島秀人、宇田川潤、phosphatidylethanolamine 投与による脳内リン脂質組成の変化と行動異常、第 122 回日本解剖学会、2017
日野広大、金子隼也、武井史郎、森田真也、杉原洋行、瀬藤光利、小島秀人、宇田川潤、胎生期低栄養ストレスによる生後の脳内リン脂質代謝の変化と行動異常、第 56 回日本先天異常学会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：木村 智子

ローマ字氏名：Tomoko Kimura

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：客員講師

研究者番号 (8 桁)：00449852

研究分担者氏名：武井 史郎

ローマ字氏名：Shiro Takei

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部

職名：特任助教

研究者番号 (8 桁)：60398576

研究分担者氏名：山崎 文義

ローマ字氏名：Fumiyoshi Yamazaki

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：80725755

研究分担者氏名：内村 康寛

ローマ字氏名：Yasuhiro Uchimura

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：90803990

(2)研究協力者

研究協力者氏名：日野 広大

ローマ字氏名：Kodai Hino

研究協力者氏名：金子 隼也

ローマ字氏名：Shunya Kaneko

研究協力者氏名：河野 匡暁

ローマ字氏名：Tadaaki Kono

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。