

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17987

研究課題名（和文）フルクトース摂取による次世代の中樞神経への影響：DOHaD仮説の検証

研究課題名（英文）Effects of Fructose Consumption on the Central Nervous System of the Next Generation

研究代表者

山田 宏哉（Yamada, Hiroya）

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：80610352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、フルクトースの過剰摂取が胎内環境を介して仔の海馬に与える影響を明らかにすることである。具体的には、母体のフルクトース摂取が海馬発達に関わる分子機構に影響し、表現型異常に寄与するという実験的根拠を構築する。さらに、新生仔から成熟期までの長期的な評価することにより、「母体のフルクトース過剰摂取」が仔の一生にわたる影響を明らかとする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「健康や疾患の素因は胎児期における栄養状態によって形成される」という新しい概念であるDOHaD（Developmental Origin of Health & Disease）説が提唱され、妊娠期の栄養状態が世代を超え、その子どもの将来にも大きく影響を及ぼすことが示唆されている。本研究はフルクトースの過剰摂取が、次世代に及ぼす影響を明らかにするものであり、現代社会におけるフルクトース過剰摂取の悪影響をDOHaD説により証明するものである。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the effects of maternal excessive fructose intake on the hippocampus of offspring. Specifically, we demonstrated that maternal fructose intake affects the molecular mechanisms involved in hippocampal development and contributes to phenotypic abnormalities.

研究分野：栄養学

キーワード：DOHaD エピジェネティクス 栄養 体質 DNAメチル化 海馬 フルクトース

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

フルクトースは、誰しもが日常的に摂取する天然甘味料である。消費量はここ数十年で10倍以上に増加しており、様々な疾患の原因になることが知られている。フルクトースの大量消費社会に伴い、妊婦の消費量も増えている。しかし、母体を介したフルクトース摂取が子どもの発達に与える影響は不明であり、科学的な実証が求められている。近年「健康や疾患の素因は胎児期における環境要因によって形成される」という概念を表すDOHaD (Developmental Origin of Health & Disease) 説が提唱されている。DOHaD説が示すように、これまでに胎児期の環境が生活習慣病や精神神経疾患など様々な疾患のリスク要因となることが示唆されている。過剰摂取された母体のフルクトースは胎盤や母乳を通じて仔へ配給され、発達の栄養源として使用される。特に、中枢神経系の発達は胎児期～授乳期が中心であり、母体栄養に大きく依存する。これらのことより、過剰なフルクトース暴露は仔の中枢神経系に影響を及ぼすことが予想される。そこで、本研究はDOHaD説に基づいて、「母体のフルクトース過剰摂取」が環境要因として疾患の素因を形成するか、中枢神経、特に海馬に着目して明らかとする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フルクトースの過剰摂取が胎内環境を介して仔の海馬に与える影響を明らかにすることである。具体的には、母体のフルクトース摂取が海馬発達に関わる分子機構に影響し、表現型異常に寄与するという実験的根拠を構築する。さらに、新生仔から成熟期までの長期的な評価することにより、「母体のフルクトース過剰摂取」が仔の一生にわたる影響を明らかとする。

3. 研究の方法

母体栄養が子どもに及ぼす影響を評価するにあたり、臨床研究では成育環境の変化や長期的な追跡の必要性など多くの制約があり、結果に影響を与える交絡因子が多い。そのような臨床研究の限界を補うため、動物を用いた基礎実験は非常に重要である。そこで動物モデルを用いて、妊娠期のフルクトース摂取が仔の海馬発達に悪影響を及ぼすか調べた。

具体的には、母獣のフルクトース過剰摂取モデルを作成し、出生後の仔の海馬組織を対象に研究を進めた。本研究では、20%フルクトース負荷を妊娠・授乳期にあたえ、出生した仔の海馬組織について、ミトコンドリアの機能と酸化ストレス、遺伝子発現、エピゲノムの解析をした。

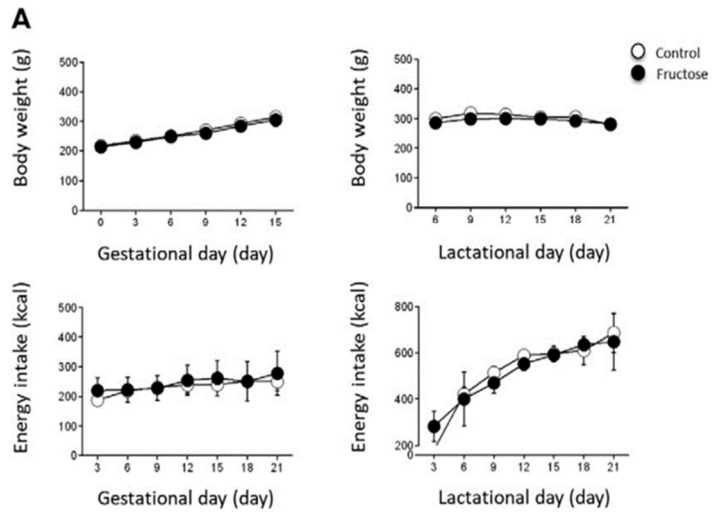
4. 研究成果

1. モデル動物の作成

週齢の雄と 8 週齢の雌の Sprague-Dawley ラットを 1 週間の馴化後、雄ラットと雌ラットを同居させた。膣栓の有無で妊娠を確認した後、雌ラットを 2 つの実験群に分けた。1 群には蒸留水を、2 群には 20% 果糖水溶液を投与した (n = 3)。留水または果糖含有水は、妊娠第 1 日目から離乳期の終わりである生後 21 日目まで投与した。雌ラットの体重およびカロリー摂取量は、妊娠中および授乳中に 3 日ごとに測定した (図 1)。

出生後 21 日齢での体重およびエネルギー摂取量の変化を図 1 の A に示す。実験期間中、体重およびエネルギー摂取量に大きな変化は見られなかった。また、体重およびカロリー摂取量に大きな変化は見られなかった。

図 1

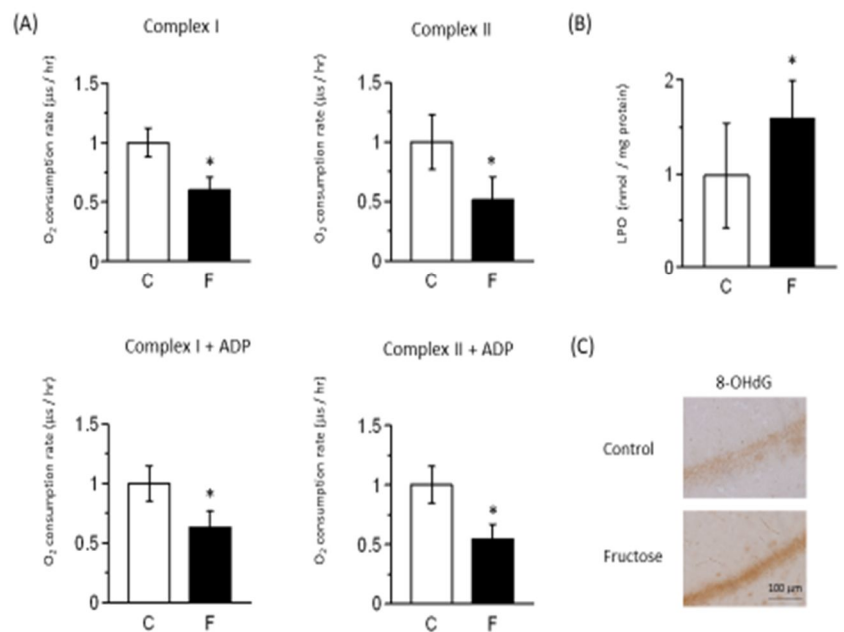


2. 仔の海馬組織の解析

・酸素消費量と酸化障害の解析

出生後 21 日齢の仔海馬を対象にミトコンドリア酸素消費量、過酸化脂質を測定した。また、海馬組織の 8-OHdG を免疫染色にて評価した (図 2)。子孫の海馬におけるミトコンドリアの O_2 消費量に対する母体の果糖の影響を調べた。海馬からミトコンドリアを分離 (PD21) した後、グルタミン酸 (複合体 I の基質) またはコハク酸 (複合体 II の基質) の存在下でこの速度を測定した。その結果、フルクトースを投与した子供の海馬では、グルタミン酸でもコハク酸でも OCR の低下が観察され、このグループではエネルギー代謝が損なわれていることがわかった (図 2A)。同様の現象は、ADP の存在下でも観察された (図 2A)。また、酸化障害の指標である過酸化脂質が有意に高値を示した。DNA の酸化障害の指標である 8-OHdG についてもフルクトース群で染色強度が強かった。

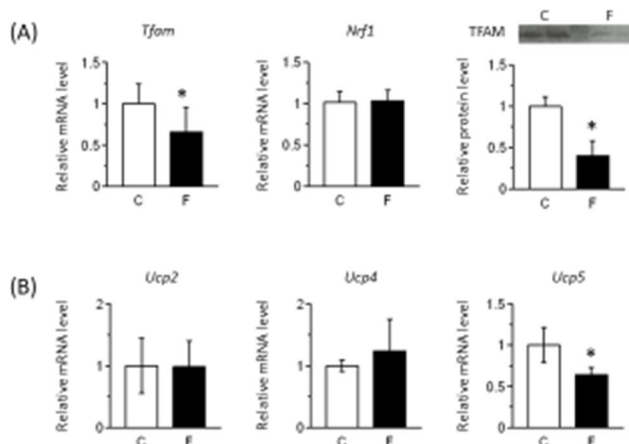
図 2



・遺伝子解析

図2の結果よりミトコンドリア関連遺伝子のmRNA発現を調べました。図3Aの結果より、海馬でのTFAMのmRNAの発現が減少していることが示された。また、TFAMタンパク質の発現量の減少も観察された。また、電子伝達系の分子をコードするmRNAも定量した(図4B)。UCPは、プロトンの輸送に関与し、その結果、活性酸素レベルを低下させることができる。そこで、UCP1-5のmRNAレベルを測定した。その結果、フルクトースを与えた子孫の海馬では、UCP5のmRNAの発現が有意に低下しており、母親のフルクトースによるUCP5のダウンレギュレーションが、少なくとも一部はLPOレベルの上昇につながっている可能性が示唆された。

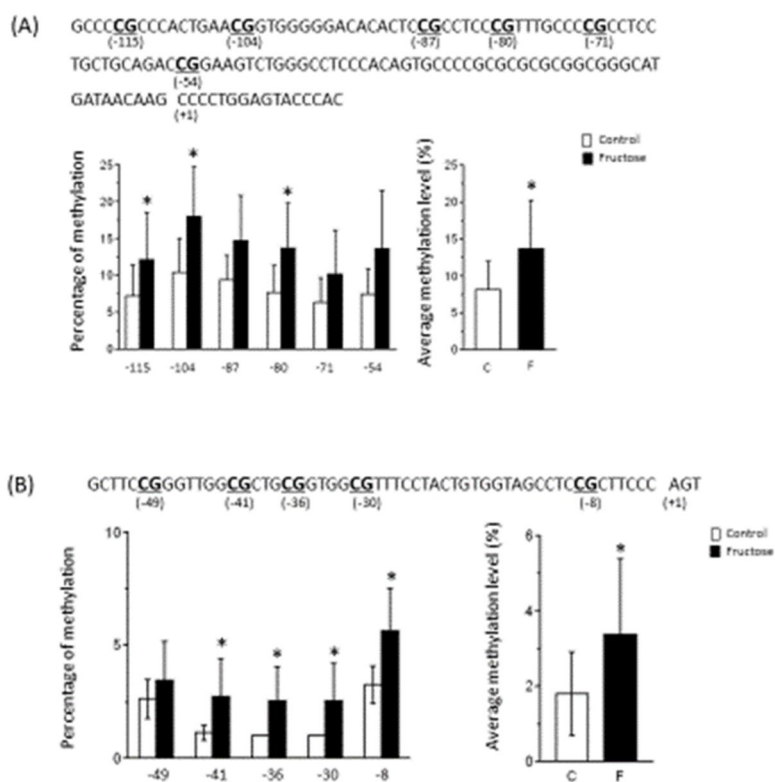
図3



・エピゲノム解析

TFAMの転写制御には、プロモーター領域でのDNAメチル化が関与していることが明らかになっている。図4は、Tfamプロモーター領域の地図で、標的となるCpGサイトを示している。6つのCpGサイトのDNAメチル化レベルをパイロシーケンスで定量した。その結果、母親が果糖を摂取すると、子供の海馬組織におけるTfamプロモーター領域のDNAメチル化が、対照の子供に比べて促進されることがわかった。このように、母親の果糖摂取によってDNAメチル化が亢進した。6つのCpGサイトのうち、-115位、-104位、-80位のDNAメチル化が増加していることが示された(図5A)。この結果は、母親が果糖を摂取するとTfamの転写が抑制され、その制御にはプロモーター領域のメチル化の変化が関与している可能性を強く示唆している。また、Ucp5遺伝子のプロモーターのDNAメチル化の変化についても解析した。パイロシーケンス分析の結果、5つのCpG部位(転写開始点の49、41、36、30、8bp上流)でDNAメチル化の上昇が認められたことから、母親の果糖がUcp5遺伝子周辺のDNAメチル化レベルにも影響を与えている可能性が示唆された(図4B)。また、平均メチル化レベルも向上していた。

図4



以上の結果より、母親が果糖を大量に摂取すると、仔の海馬組織のO2酸素消費量が減少し、酸化ストレスが増大するが、これは少なくともUcp5とTfamが関与するエピジェネティックなメカニズムによるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada H, Munetsuna E, Yamazaki M, Mizuno G, Sadamoto N, Ando Y, Fujii R, Shiogama K, Ishikawa H, Suzuki K, Shimono Y, Ohashi K, Hashimoto S.	4. 巻 33
2. 論文標題 Maternal fructose-induced oxidative stress occurs via Tfam and Ucp5 epigenetic regulation in offspring hippocampi.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 11431-11442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201901072R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Munetsuna E, Yamada H, Yamazaki M, Ando Y, Mizuno G, Hattori Y, Sadamoto N, Ishikawa H, Ohta Y, Fujii R, Suzuki K, Hashimoto S, Ohashi K.	4. 巻 67
2. 論文標題 Maternal High-Fructose Intake Increases Circulating Corticosterone Levels via Decreased Adrenal Corticosterone Clearance in Adult Offspring	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Biochem.	6. 最初と最後の頁 44-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2019.01.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Munetsuna E, Yamada H, Yamazaki M, Ando Y, Mizuno G, Ota T, Hattori Y, Sadamoto N, Suzuki K, Ishikawa H, Hashimoto S, Ohashi K.	4. 巻 202
2. 論文標題 Maternal fructose intake disturbs ovarian estradiol synthesis in rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life Sci.	6. 最初と最後の頁 117-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2018.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki M, Yamada H, Munetsuna E, Ishikawa H, Mizuno G, Mukuda T, Mouri A, Nabeshima T, Saito K, Suzuki K, Hashimoto S, Ohashi K.	4. 巻 32
2. 論文標題 Excess maternal fructose consumption impairs hippocampal function in offspring via epigenetic modification of BDNF promoter.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 2549-2562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201700783RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamada Hiroya.
2. 発表標題 Maternal fructose consumption during gestation and lactation downregulated Igf-1 expression in offspring rat.
3. 学会等名 11th DOHaD World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 貞本奈緒、山田宏哉山崎未来、山田宏哉、宗綱栄二、服部裕次、下平大輝、
2. 発表標題 母獣のフルクトース過剰摂取が仔海馬Uncoupling Proteins発現に与える影響
3. 学会等名 日本DOHaDg学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎未来、山田宏哉、宗綱栄二、貞本奈緒、服部裕次、下平大輝、
2. 発表標題 母獣のフルクトース過剰摂取は生後のストレス感受性を亢進する
3. 学会等名 日本DOHaD学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部裕次、村瀬悠理、山田宏哉、宗綱栄二、山崎未来、貞本奈緒、安藤嘉崇、石川浩章、鈴木康司、大橋紘二
2. 発表標題 妊娠授乳期の母体フルクトース過剰摂取が仔に及ぼす影響
3. 学会等名 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------