

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591280

研究課題名（和文）脳の発達にとって良い環境と悪い環境が鑑別できるか？

研究課題名（英文）Distinguishing the effects of maternal environment on the development of fetal brains

研究代表者

富士岡 隆（FUJIOKA TAKASHI）

山口大学・大学院医学系研究科・非常勤研究員

研究者番号：50304473

研究成果の概要：

胎仔脳の発達に影響を及ぼす母体ストレス環境下において、母体血液中に変動した物質について検討した。プロテオーム解析の結果、弱いストレス群と強いストレス群が逆の変動をした蛋白質は全体の約3%であり、antioxidant や apolipoprotein 関連の蛋白質が含まれていた。強いストレス群のみで変動したのは matrix metalloproteinase 関連蛋白質などであった。さらに母体血液中に変動するグルココルチコイドについて検討し、マーカーおよびメカニズムとしての重要性を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：脳神経、発生分化

1. 研究開始当初の背景

これまでの臨床的・基礎的研究によって、母体のストレス環境は胎児の発達にさまざまな影響を与えることが明らかになった。脳への影響についても少しずつ明らかになってきたが、まだわかっていないことが多い。動物を用いた基礎研究では、母体のストレスは脳の性分化や生後のストレス反応、情動行動などに影響を与えることが報告された。これらの研究で用いられたストレスは強いものが多く、その影響は一様に悪いものであった。私たちは妊娠動物を用いた実験で、母体のストレスが軽度なときには、胎仔脳に良い影響を及ぼすことを明らかにした。すなわち、母体のストレスが胎仔脳に与える影響はストレスの強さに依存しており、ストレスの強さが異なれば胎仔脳に異なった影響をもたらすのである。これまで、母体ストレスの強さの違いによる胎仔脳への影響を検討した研究はなかった。

2. 研究の目的

私たちは、母体ストレスの強さにより胎仔脳への影響が異なることを明らかにした。しかしながら、どのような母体ストレスが胎仔脳の発達にとって良いのか悪いのか、詳細なことはまだよく分かっていない。妊娠母体をとる環境には様々なストレスが存在する。胎児脳の発達への影響が予測できるような母体のマーカーが明らかになれば大変有用である。本研究の目的は、母体ストレスによる胎仔脳への影響を予測する母体血中マーカーを明らかにすることである。そのためにプロテオーム解析などの方法を用いて実験を行った。

3. 研究の方法

8～12週齢の妊娠SDラットを、狭いケージに短時間（30分間）あるいは長時間（240分間）拘束するストレスモデルを用いた。さらにトレッドミルを用いて、低速と高速の強制歩行運動を負荷するストレスモデルについても検討した。

（1）ストレス強度の検討

各モデルにおいてストレスを負荷した後に母体血液を採取し、アッセイキットを用いて血清コルチコステロン濃度を測定した。血液中のコルチコステロン濃度はストレスの強さの指標になると考えられており、各ストレスモデルのストレス強度を検討した。

（2）母体ストレスによる発達脳への影響
母体ストレス負荷後の胎仔脳への影響について、海馬などの神経新生、神経細胞の分化、神経細胞死について検討した。

①神経新生への影響

新生神経細胞に取り込まれたBrdUを指標にした。BrdU投与後に摘出した脳を、クリオスタットにより海馬を含む連続切片を作製した。BrdUの抗体を用いて免疫組織化学染色をした後に、海馬の歯状回におけるBrdU陽性細胞の数を定量した。

②神経細胞の分化への影響

Ramon-Moliner法によるGolgi染色を用いた。摘出した脳をK2Cr2O7, HgCl2, K2CrO4, K2WO4溶液に浸した後、LiOH, KNO3溶液で処理をした。クリオスタットにて海馬などの切片を作製し、画像解析装置を用いて神経細胞の突起の数や長さを測定した。

③神経細胞死への影響

TUNEL変法を用いて神経細胞死、アポトーシスについて検討した。クリオスタットで作製した脳の連続切片を過酸化水素水で処理し、組織の内因性ペルオキシダーゼをブロックした。terminal deoxynucleotidyl transferaseによりビオチン化dUTPを断片化DNAとハイブリダイズさせた。その後、ペルオキシダーゼをラベルしたストレプトアビジンと反応させた。DABを用いて発色させ、陽性細胞の数を定量した。

④海馬の培養神経細胞への影響

海馬の初代培養を作製し、トリパンブルーなどで標識してストレスによる生存率への影響を検討した。さらに、グルココルチコイドによる培養神経細胞の生存率への影響について調べた。

（3）プロテオーム解析

胎仔脳への影響が確認された母体血清を用いてプロテオーム解析を行った。試料をiTRAQ試薬によりペプチド標識し、全自動大規模蛋白質解析システムにより蛋白質同定を行った。同定された蛋白質について、ペプチド配列のマスマスペクトルに見られる同位体由来シグナルのピーク値を比較し、相対的な定量を行った。同定蛋白質の相対定量値とアノテーション情報に基づいて解析し、ストレスによる胎仔脳への影響を推測できるマーカーについて検討した。

4. 研究成果

妊娠ラットを狭いケージに短時間あるいは長時間拘束した後に母体血液を採取し、コルチコステロン濃度を測定した。長時間ストレス群のコルチコステロン濃度は短時間ストレス群より高値であり、長時間ストレス群が強いストレスであることを示した。このストレスモデルによる発達脳への影響を、生体神経細胞と培養神経細胞について検討した。強いストレスにより胎仔脳の神経細胞の新生や分化は抑制され、神経細胞死が増加した。生後の脳の神経新生や神経突起にも同様の影響がみられた。また、強いストレスを負荷した後の培養神経細胞は生存率が減少したが、弱いストレス負荷では逆に生存率が増加した。グルココルチコイドによる培養神経細胞への影響を検討したところ、グルココルチコイド高濃度下の培養神経細胞は生存率が減少した。以上の実験では、ストレスによる発達脳への影響にはグルココルチコイドが関与しており、母体血中のグルココルチコイドが高濃度の時は胎仔脳の障害を示唆することが明らかになった。

次に胎仔脳の発達に影響を及ぼす母体ストレスモデルを用いて、母体血液のプロテオーム解析を行った。強制運動モデルはコルチコステロン濃度の差が有意ではなかったため、プロテオーム解析には用いなかった。妊娠ラットを短時間あるいは長時間拘束した後に母体血液を採取した。対照群を含めた3群の血清試料を大規模蛋白質解析システムにより蛋白質同定を行った。同定された蛋白質について相対的な定量を行い、3群間の変動パターンにより以下のようにグルーピングした。グループ①、変動のなかったもの(42%)。グループ②、短時間ストレス群と長時間ストレス群が同様な変動をしたもの(21%)。グループ③、短時間ストレス群と長時間ストレス群が逆の変動をしたもの(3%)。グループ④、短時間ストレス群のみ変動したもの(19%)。グループ⑤、長時間ストレス群のみ変動したもの(15%)。グループ③には **antioxidant**、**apolipoprotein** 関連の蛋白質などが含まれていた。短時間と長時間の拘束ストレスは胎仔脳の発達に逆の影響を及ぼしており、このグループの蛋白質はストレス時の発達脳の変化を反映するマーカー候補として重要である。グループ④には **TGF** 受容体関連の蛋白質が、グループ⑤には、**matrix metalloproteinase**、電位依存性 **potassium channel** の関連蛋白質が含まれていた。また、**hemoglobin**、**complement component**、**coagulation factor** の関連蛋白質などがストレス群で変動していた。この実験によりストレス時に母体血中で変動する蛋白質を明らかにした。いくつかの蛋白質は、スト

レスによる発達脳への影響を反映するマーカーとして有用と思われる、現在検討中である。本研究の成果は、将来的に発達脳の障害予測や予防などに役立つ可能性があり、大変意義のあるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Endoh H, Fujioka T, Endo H, Inazuka Y, Furukawa S, Nakamura S, Stimulation of fetal hypothalamus induces uterine contractions in pregnant rats at term. Biol. Reprod. 79, 633-637, 2008 査読有

[学会発表] (計1件)

富士岡 隆

ストレスが脳に及ぼす2つの異なる影響

山口県 Neuroscience 研究会、平成20年2月7日、山口県宇部市

[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) 研究代表者

富士岡 隆 (FUJIOKA TAKASHI)

山口大学・大学院医学系研究科・非常勤研究員

研究者番号：50304473

(2) 研究分担者

坂田 義行 (SAKATA YOSHIYUKI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：10034927

泉 友則 (IZUMI TOMONORI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00261694

前川剛志 (MAEKAWA TSUYOSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60034972

富士岡 章 (FUJIOKA AYA)
山口大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50464334

(3) 連携研究者 なし