

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240062

研究課題名(和文) マウス胎生妊娠期の栄養環境による発達障害発症機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of pathogenesis of developmental disorders induced by maternal nutritional condition in the fetal stage.

研究代表者

若菜 茂晴 (Wakana, Shigeharu)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・チームリーダー

研究者番号：90192434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,000,000円、(間接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期における生育環境が後の疾患感受性に影響を与えるという概念・成人病胎生期発症仮説(DOHaD)が近年注目されている。我々は、マウスの胎児期における低栄養が行動表現型に与える影響を網羅的表現型解析、遺伝子発現解析、DNAメチル化の定量を行い検討し、DOHaD仮説の検証を行った。その結果、低タンパク食により胎児期低栄養状態が再現された。また、離乳後の個体の行動解析を行ったところ、低タンパク食群で行動表現型の差異が認められた。成獣の脳の遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、発現様式に差異が見られ、遺伝子発現とゲノムメチル化の相関を検討したところ、それぞれ遺伝子群において稀だった

研究成果の概要(英文)：The Developmental Origins of Health and Disease:DOHaD paradigm is a concept that in utero experiences reprogram an individual for later-in-life risk of diseases. In this study, we conducted experiments to validate the DOHaD theory in the developmental disorder with well-controlled experimental procedures using mouse model. We provided AIN93G as control diet and low-protein diet (LP) to pre-pregnant and pregnant females. After birth, behavioral phenotypes of offspring, gene expression level in brain, and genomic methylation levels in promoters of genes were examined. The offspring which were exposed to malnutrition in utero exhibited increased activity in the home cage, decreased contact to novel object, and decreased social investigation. The adult offspring of LP group group exhibited different pattern of mRNA expression and genomic methylation pattern relative to AIN93G group. However, no direct interaction between expression levels and methylation levels of genes were detected.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：DOHaD 発達障害 行動解析 実験動物学 胎児期栄養 CAPSタンパク質 葉酸 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

胎児期における生育環境が成人した後の疾患感受性に影響を与えるという概念は成人病胎生期発症仮説 (Developmental Origins of Health and Disease: DOHaD) と呼ばれ近年注目されている。しかし、疫学調査による検証はヒトの遺伝的不均一性、生育環境の統御の困難さから、DOHaDの詳細な検証に必要な精度の高いデータを得ることは困難であるため、動物モデルを用いた実験系で詳細に検討する必要がある。上記の生活習慣病、二分脊椎症といったドラスティックに表現型の現れる疾患モデルに関しては適切なものが既に存在していた。また、胎児期に低栄養を経験したマウスの肝臓や脂肪組織等の臓器のDNAにおけるメチル化やヒトにおける生活習慣病的な表現型の異常と葉酸添加による改善など、環境と遺伝子の分子レベルでのエピジェネティックな解析が齧歯類を用いて既に行われてきた。しかし、胎児期に低栄養にさらされた動物がヒトの自閉症や注意欠如多動障害(AD/HD)といった発達障害や統合失調症などの精神疾患的な表現型の異常(行動異常)を起こすかどうかという検討は、「胎児期の低栄養」という視点では未だ行われていなかった。

### 2. 研究の目的

上記のとおり、当時未確立であった胎児期低栄養が行動異常に与えるマウスのモデルの作製を行うことを主目的とした。さらに、マウスの胎児期における栄養条件、特に低栄養が行動表現型に与える影響を、高度に統制された飼育条件、表現型解析プラットフォーム、DNAメチル化の定量を用いて検討し、発達障害、精神疾患におけるDOHaD仮説の検証を目指した。

### 3. 研究の方法

母体栄養環境が受精前の卵子形成に与える影響、母マウスの栄養条件が養育環境に与える影響を排除するため、採卵、妊娠、養育をそれぞれ別の個体を用いて実験を行った。卵子を供給するマウス、産仔の養育を行うマウスには実験開始4週間前から標準飼料(AIN93G)を与えた。また、実際に妊娠するマウス(仮親)に関しては、胚移植4週間前から、標準食(AIN93G)、低栄養食(LP)、低栄養食に葉酸を付加したもの(LP+FA)を給餌する。出生したマウスに関しては、行動レベルの表現型解析を行うとともに、エピジェネティックな変化を検討するため、それぞれの栄養条件で生育した新生仔、成獣の脳やその肝臓などの臓器のサンプリングを行い、主要な遺伝子の発現、DNAのメチル化の異常に関して定量を行った。行動解析としては、次の通り行った: 5週齢: Open-field test(1回目)、6週齢: Open-field test(2回目)、6週齢: 物体探索試験、7週齢: 社会行動、8-9週齢: Home-cage activity、10週齢:

Light/Dark-transition test、11週齢: Fear-conditioning test、12週齢: Tail suspension test。

### 4. 研究成果

#### 1. 母獣の表現型

ICRマウス(母獣)とC57BL/6Jマウス(仔獣)を用いて実験を行った結果、妊娠前の母獣の体重に関しては各群に有意な差は認められず、妊娠後に低タンパク食群(LP)、低タンパク食に葉酸を添加した群(LP+FA)で低下が見られ(図1-1)、妊娠前の血中タンパク質、血中脂質、血糖値などのパラメータにLP群と通常食群との間に差がみられた(図1-2)。

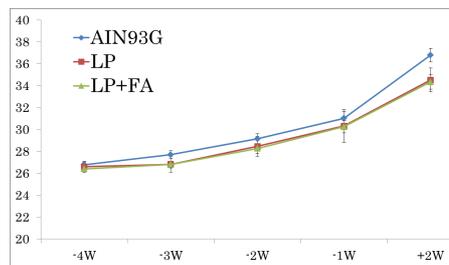


図1-1: 母獣の体重変化  
縦軸: 体重(g)、横軸 (移植からの週数)

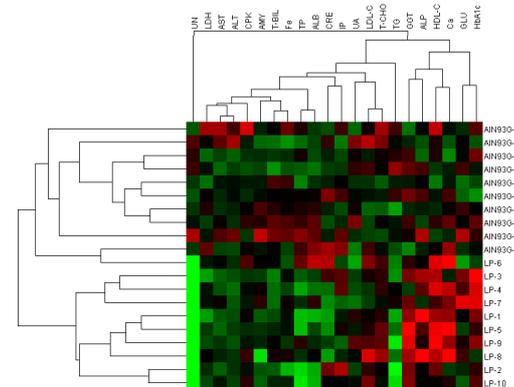


図1-2: 母獣の血液生化学結果のヒートマップ。赤色は高値、緑色は低値を示す

#### 2. 仔の表現型

また、新生仔の体重に関してはLP群において標準食群と比較して有意に低下しており、LP+FA群は標準食とLP群の中間的な値となった(図2-1)。

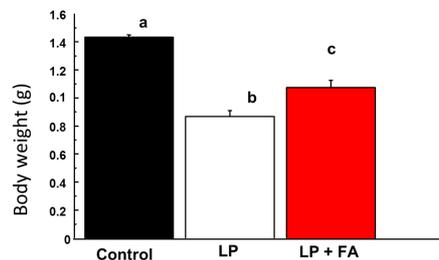


図2-1: 新生児の体重  
異なるアルファベットは、各群で有意差があることを示す

新生仔の脳における遺伝子発現の変化に関して顕著な差は見られなかったが、成獣の脳の遺伝子発現には標準食-低タンパク食群で明瞭な差が見られた(図2-2)。離乳後の雄個体に関して行動表現型解析を行ったところ、低タンパク食で行動表現型の差異(物体探索、社会探索行動の減少)が認められた(表2-1)。

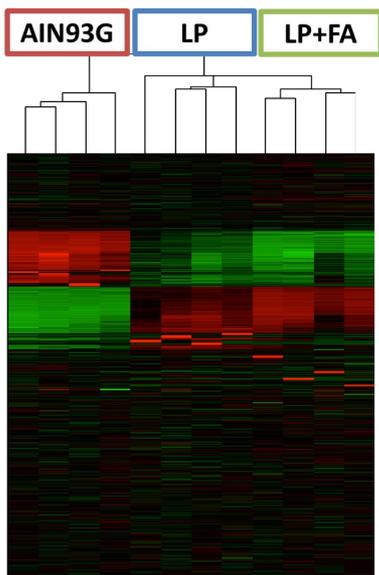


図2-2 成獣の脳における発現アレイ解析  
赤色は高値、緑色は低値を示す

表2-1 行動解析結果まとめ(AIN93G群との比較)

週齢	試験	実験群	
		LP	LP + FA
5W:	Open-field test (1)	中心滞在率 ↓	中心滞在率 ↓
6W:	Open-field test (2)	中心滞在率 ↓	中心滞在率 ↓
6W:	物体探索試験	物体探索行動 ↓	物体探索行動 ↓
7W:	社会行動試験	社会探索行動 ↓	社会探索行動 ↓
9-10W	ホームケージ試験	行動量 ↑	変化なし
11W	明暗箱往來試験	変化なし	変化なし
12W	恐怖条件付け学習	変化なし	変化なし
13W	尾懸垂試験	変化なし	変化なし

前述の遺伝子発現を行うとともに、プロモーター領域におけるゲノムメチル化解析を行ったところ、低タンパク食群において、標準食群と異なるパターンが観察された(胎児期低栄養群でメチル化低下: 198 遺伝子、胎児期低栄養でメチル化増大: 171 遺伝子)。さらに、発現量・ゲノムメチル化に差のあった遺伝子に関して遺伝子ネットワーク解析を、既存のデータベース DAVID (The Database for Annotation, Visualization and

## Integrated Discovery

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて行ったところ、遺伝子発現に関しては嗅覚刺激伝達系関連遺伝子を中心に変化が認められた。また、メチル化低下遺伝子群に関しては、いくつかの転写調節関連遺伝子が抽出された。しかし、発現アレイとメチル化アレイに関し、それぞれの実験結果において差のあった遺伝子間に直接的な一致は見受けられなかった。今後は、発現量に差のあった遺伝子とメチル化パターンに差のあった遺伝子間の相互作用を検討する必要がある。

## 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12件)

古瀬民生, 若菜茂晴 “マウス胎児期低栄養モデルを用いたDOHaD仮説の検証”, 精神科, 査読無, 24:335-339, 2014

久保田健夫 “発達障害とエピジェネティクス・環境と遺伝子をつなぐ新しい見方”, 発達障害の進歩, 査読無, 26:61-67, 2014

Suzuki T, Furuse T, Yamada I, Motegi H, Kozawa Y, Masuya H, Wakana S. “Pheno-Pub: a total support system for the publication of mouse phenotypic data on the web”, Mammalian Genome, 査読有, 24:473-483, 2013, DOI: 10.1007/s00335-013-9482-y

Sadakata T, Kakegawa W, Shinoda Y, Hosono M, Katoh-Semba R, Sekine Y, Sato Y, Tanaka M, Iwasato T, Itohara S, Furuyama K, Kawaguchi Y, Ishizaki Y, Yuzaki M, Furuichi T. “CAPS1 deficiency perturbs dense-core vesicle trafficking and Golgi structure and reduces presynaptic release probability in the mouse brain”, J. Neurosci., 査読有, 33:17326-17334, 2013, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2777-13.2013

Sadakata T, Shinoda Y, Oka M, Sekine Y, Furuichi T. “Autistic-like behavioral phenotypes in a mouse model with

copy number variation of the CAPS2/CADPS2 gene”, FEBS Lett., 査読有, 587:54-59, 2013, DOI: 10.1016/j.febslet.2012.10.047

Sadakata T, Shinoda Y, Sato A, Iguchi H, Ishii C, Matsuo M, Yamaga R, Furuichi T. “Mouse models of mutations and variations in autism spectrum disorder-associated genes: mice expressing caps2/cadps2 copy number and alternative splicing variants”, Int J Environ Res Public Health, 査読有, 10: 6335-6353, 2013, DOI: 10.3390/ijerph10126335

Shinoda Y, Sadakata T, Furuichi T. “Animal Models of Autism Spectrum Disorder (ASD): A Synaptic-level Approach to Autistic-like Behavior in Mice”, Exp. Anim., 査読有, 62:71-78, 2013, DOI: 10.1538/expanim.62.71

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. “Epigenetics in neurodevelopmental and mental disorders”, Med Epigenet, 査読有, 1:61-67, 2013

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. “The role of epigenetics in Rett syndrome”, Epigenomics, 査読有, 5:583-592, 2013, DOI: 10.2217/epi.13.54.

Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, Andoh T, Kurosawa H, Akamatsu W, Oyama M, Okano H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. “Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome”, PLoS ONE, 査読有, 8:e66729, 2013, DOI:10.1371/journal.pone.0066729

久保田健夫 “特集 メタボリックシンドロームと周産期管理(DOHaDを含む) 「DOHaD 仮説とエピジェネティクス」”, 周産期医学, 査読無, 42:837-840, 2012

Furuse T, Yamada I, Kushida T, Masuya H, Miura I, Kaneda H, Kobayashi K, Wada Y, Yuasa S, Wakana S. “Behavioral and neuromorphological characterization of a novel Tubal mutant mouse” Behavioural Brain Research, 227:167-174, 2012, 査読有, DOI:10.1016/j.bbr.2011.11.002

〔学会発表〕(計 14 件)

Furuse T, Yamada I, Kaneda H, Kobayashi K, Kohda T, Ishino F, Miyake K, Kubota T, Wakana S. “The effects of maternal malnutrition in utero on behavioral phenotypes of mouse—validation of DOHaD theory in mouse”, The 27th International Mammalian Genome Conference, 2013 年 9 月 17 日, Salamanca, Spain

古瀬民生 “マウスモデルを用いた DOHaD 仮説の評価：母体低栄養が産仔の行動表現に与える影響”, 包括脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ, 2013 年 8 月 31 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

若菜茂晴, 古瀬民生 “マウス胎児期低栄養曝露された新生仔の遺伝子発現と表現型解析”, 第 40 回日本毒理学学会学術年会, 2013 年 6 月 19 日, 幕張メッセ (千葉市)

古瀬民生, 若菜茂晴 “マウス胎生期低栄養モデルからの知見”, 第 2 回日本 DOHaD 研究会年会, 2013 年 6 月 7 日, 厚生労働省戸山研究庁舎 (新宿区)

古瀬民生, 幸田尚, 串田知子, 柏村実生, 山田郁子, 金田秀貴, 小林喜美男, 石野史敏, 古市貞一, 久保田健夫, 若菜茂晴 “マウスモデルを用いた DOHaD 仮説の実証 2 : 母体低栄養が新生仔の行動表現型に与える影響”, 第 60 回日本実験動物学会総会, 2013 年 5 月 15 日, つくば国際会議場 (つくば市)

若菜茂晴, 古瀬民生, 幸田尚, 古市貞一, 三宅邦夫, 久保田健夫 “マウスを用いた DOHaD 検証計画 胎児期低栄養曝露された新生仔の遺伝子発現”, 第 83 回日本衛生学会学術総会, 2012 年 3 月 25 日, 金沢大学 (金沢市)

古瀬民生, 幸田尚, 山田郁子, 三浦郁生, 金田秀貴, 小林喜美男, 石野史敏, 久保田健夫, 若菜茂晴 “マウスモデルを用いた DOHaD 仮説の実証: 遺伝子発現パターンからみた胎生期低栄養の影響の脳-肝臓間差異”, 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 21 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

古瀬民生, 幸田尚, 串田知子, 山田郁子, 金田秀貴, 小林喜美男, 石野史敏, 久保田健夫, 若菜茂晴 “マウスモデルを用いた DOHaD 仮説の検証その 1: 母体低栄

養が新生児の出生体重と遺伝子発現に与える影響” 第 26 回モロシヌス研究会, 2012 年 6 月 15 日, 東京大学 (東京都)

古瀬民生、幸田尚、串田知子、山田郁子、尾崎藍、金田秀貴、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴 “マウスモデルを用いた DOHaD 仮説の実証 1: 母体低栄養が新生児の出生体重と遺伝子発現に与える影響”, 日本実験動物科学・技術九州 2012, 2012 年 5 月 24 日, 別府コンベンションセンター (別府市)

Wakana S. “Overview of the high throughput phenotyping program and pipelines in the Japan Mouse Clinic and its role in IMPC”, Rodent Pathology in Translational Research and Phenotyping Workshop (招待講演), 2011 年 10 月 17 日, Taipei, Taiwan

Furuse T. “Introduction of mouse models for human psychiatric diseases in RIKEN ENU mutagenesis program”, Rodent Pathology in Translational Research and Phenotyping Workshop (招待講演), 2011 年 10 月 17 日, Taipei, Taiwan

古瀬民生 他 6 名(若菜 7 番目) “IMPC 参加に向けた各表現型解析センター間における行動表現型のデータ変換と比較”, 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 17 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

若菜茂晴, “なぜマウスクリニックは展開されるか”, 第 58 回日本実験動物学会総会, 2011 年 5 月 26 日, タワーホール船堀 (東京都)

金田秀貴 他 11 名(若菜 12 番目) “個体発生期の環境要因の差異による網羅的マウス表現型解析その 1 出産方法および里親による検討”, 第 58 回日本実験動物学会総会, 2011 年 5 月 25 日, タワーホール船堀 (東京都)

〔図書〕(計 1 件)

山村研一、若菜茂晴 編 “疾患モデルマウス表現型解析指南” 中山書店、2011、477 頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若菜 茂晴 (WAKANA, Shigeharu)  
独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・チームリーダー  
研究者番号: 90192434

### (2) 研究分担者

久保田 健夫 (KUBOTA, Takeo)  
山梨大学・医学工学総合研究部・教授  
研究者番号: 70293511

古市 貞一 (FURUICHI, Teiichi)  
東京理科大学・理工学部応用生物学科・教授  
研究者番号: 50219094