

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591612

研究課題名(和文) 新生児期の栄養環境変化に着目した発達障害ならびに成人期疾患発症機序の解明

研究課題名(英文) later

研究代表者

桑形 麻樹子 (Kuwagata, Makiko)

昭和大学・医学部・客員教授

研究者番号：70398684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：出生前の胎児にとっては悪影響をもたらす栄養制限が生後環境では良い効果をもたらすという逆作用に着目し、C57マウス新生児期の栄養環境変化(50%給餌制限あるいは60%高脂肪食摂取)に起因した成人期疾患発症リスクに關する責任候補遺伝子群の選抜を試みた。肝臓の遺伝子解析の結果から、新生児期の栄養環境の変化は新生児期の栄養環境変化初期には摂取エネルギーに非依存的に自然免疫系(Fos、Il1b、Rgs1、Ppp1r3g、Hamp、Igl11)が優位になること、離乳時にはアセトアルデヒドの分解能が低下(Aldh1a7)することが考えられた。また、免疫組織の発達にも影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although undernutrition during gestation is harmful for fetuses, calorie restriction is a strategy proven to extend healthy and maximum life span after birth. By focusing our attention on genes whose expression oppositely regulated between under- or high-nutrition during neonatal period, we selected candidate genes responsible for DOHaD. The results of microarray in C57BL mouse pup's liver exposed to neonatal under- (50% food restriction) and high-nutrition (60% high fat food) demonstrated that innate immune system (Fos, Il1b, Rgs1, Ppp1r3g, Hamp, Igl11) was activated shortly after exposure. At weaning, expression of Aldh1a 7 was decreased resulting of low resolution of acetaldehyde regardless of the nutritional conditions. By histopathological examination, abnormal development of immune tissues such as thymus and spleen was detected.

研究分野：生殖発生毒性学

キーワード：DOHaD 網羅的遺伝子解析 マウス 新生児期栄養環境変化 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

成人期に発症する多くの疾患の原因が胎生期および新生児期といった発達期の環境に起因するという成人期疾患発達期起源説 (DOHaD) が提唱されるようになった。疫学研究により、出生児の低体重 (2.5kg 以下) と成人期の高血圧、心血管疾患ならびに型糖尿病の発症リスクとの関連が明らかになってきたが、近年では、うつ病、注意欠陥多動性障害、自閉症といった精神疾患にも出生児低体重が関連していると報告され始めた。DOHaD を検討する動物実験においては、胎生期から授乳期を通して栄養環境を変化させる実験を行っている研究が多い。しかし、DOHaD 説における栄養環境の点では、その制限は生後においては生活習慣病の予防や長寿に繋がるとされているのに対し、胎児期では発症のリスクを増加させる。即ち、生後と生前 (胎児) では同じ低栄養環境という事象に対して全く逆の影響がみられることである。我々は、この逆の作用に注目し、胎児期と生後での各遺伝子群の変動を比較解析することが、生活習慣病あるいは精神疾患の発症リスクに關与する真の責任候補遺伝子の絞込みには重要であると考えた。遺伝子解析研究の多くは遺伝子発現の増減のみで評価をし、特定の原因遺伝子の同定をエンドポイントとしていることに対し、本研究では網羅的な遺伝子解析を行い「責任候補遺伝子群」を検索する計画を立てた。

我々は既に胎生期に栄養制限した胎児脳および肝組織での遺伝子解析を行っており、胎児肝臓および脳は免疫系に關連した遺伝子発現が減少していることを確認している^{a)}。本研究では、免疫系組織への影響も考慮にいれて新生児期に栄養環境を変化させ、「責任候補遺伝子群」を検索した。

2. 研究の目的

出生前の胎児にとっては悪影響をもたらす栄養制限が生後環境では良い効果をもたらすという逆作用に着目し、新生児期の栄養環境変化に起因した成人期疾患発症リスク (精神疾患を含む) に關与する責任候補遺伝子群を選抜することを目的とした。

中枢神経系だけでなく免疫系への影響を考慮し、新生児期の栄養環境の変化に起因した精神疾患発症リスクに關与する責任候補遺伝子群を絞り込むために、以下の実験を行った。

(1) 新生児期栄養環境変化後の児における遺伝子群の解析

マウス新生児期の栄養環境を低栄養あるいは高栄養に変化させて育成し、生後 1 週 (哺育期) および 3 週 (離乳期) に脳、肝臓 (新生児期は免疫系の発生に深く關与する) 褐色脂肪 (3 週のみ) の遺伝子解析を行った。栄養変化による遺伝子変動の比較を行い、新生児期の栄養環境の変化により、将来の脳疾患あるいは生活習慣病発症と關連する遺伝子があるかに注目して解析を行

った。

(2) 発達期の栄養環境変化による免疫系への影響

(1) の結果から、免疫系に關与する遺伝子群の変動に注目して、発達過程の胸腺、脾臓、肝臓の T リンパ球 (CD-3)、B リンパ球 (CD45R)、抗原指示細胞である樹状細胞 (Iba-1) の局在を免疫組織学的検討により確認した。

(3) 新生児期栄養環境変化後の児における遺伝子群の解析 (胎生期栄養環境変化後の胎児組織における遺伝子解析結果との比較^{a)})

我々が既に得ている胎生期の栄養制限により得られた胎児組織での遺伝子解析の結果^{a)} と本実験結果を比較解析して、出生前後で、どのような遺伝子群が逆向きの発現をしたかを検証し、また、メチル化アレイの結果も合わせて、責任遺伝子の選抜を行った。a) T. Ogawa and M. Kuwagata et al., Cong Anom. 2014.

3. 研究の方法

(1) 新生児期栄養環境変化

C57BL/6J マウスを用いた。妊娠期は母動物に固形飼料 (CE-2) を自由摂取させ自然分娩後、生後 0 日から、(1) 50% 給餌制限群 (FR 群、8 腹)、(2) 高カロリー給餌群 (60% kcal% 脂肪食 Research DIET、HF 群、13 腹)、(3) 対照群 (CE-2 自由摂取群、Cont 群、13 腹) に分け給餌環境を変化させた。生後 0 日、以降週 1 回体重を測定し、生後 1 週 (7 日) および離乳期 (生後 21 日) に出生児を解剖し、肝臓、脳および褐色脂肪 (3 週のみ) を採取して DNA マイクロアレイ解析用にサンプリングした。離乳後は生後 10 週まで飼育し、一部の出生児組織は病理組織学検査用に保存した。

(2) DNA マイクロアレイ解析

生後 1 週および 3 週の組織について、Dye-Swap 法に従いアジレント社の Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイキット (G4122F, Agilent 社) を用いて各個体の遺伝子発現解析を 2 回行った。なお生後 1 週の脳は各群 4~6 匹をプールしてサンプル数 2 として解析した。2 回実施した結果から、対照群と比較して 1.5 倍以上のものを増加、0.75 倍以下のものを減少として遺伝子解析を行った。

(3) 栄養環境変化による免疫系組織の病理組織学的検査

生後 1 週および 3 週の肝臓、脾臓、胸腺について HE 染色標本および免疫組織染色 (CD3、CD45R、Iba-1) を実施し形態学的変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 新生児期栄養環境変化動物実験

出産後の 50% 給餌制限の継続により、母動物マウスが児を食殺する行動が認められたことから、制限期間を 1 週間とし、その

後は対照群と同様に自由摂取させた。その結果、哺育期間中の母動物当たりの総カロリー摂取量は、対照群は725(9.7)、FR群は503(6.7)、HF群は760(50.8)kcalであった(カッコ内は脂肪量 g)。哺育期間中の出生児の体重推移を Fig.1 に示す。

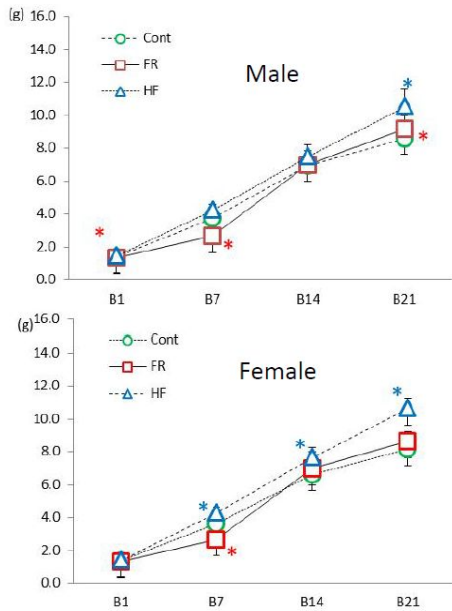


Fig.1 出生児の体重推移

FR 群では給餌制限期間は低値を示したがその後は回復し、生後 2-3 週で急激に体重が増加した(Catch up growth)。HF 群では対照群と比較して高値に推移した。離乳後は3群ともに生後10週まで同様に推移した。

器官重量の結果を Fig.2 に示す。生後 21 日ではFR 群、HF 群ともに心臓および脾臓は高値を示した。

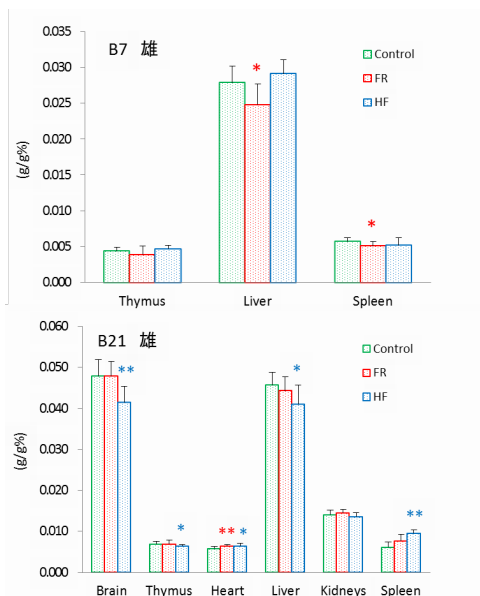


Fig.2 雄出生児の器官重量

(2) DNA マイクロアレイ解析

生後1週および3週に実施したアレイ解

析の結果を下図に示す。

1 週および3 週ともに脳は比較的変動する遺伝子数が少なかった。1 週のFR 群では酸化ストレスに關与する *Cyp2a5* の発現が増加し、GABA-A 受容体の発現は減少していた。

1W	脳		肝臓	
	FR	HF	FR	HF
Up	3	27	170	12
Down	6	5	112	8
Total	9	32	282	20

1 週肝臓の網羅的遺伝子発現解析の結果、FR 群では、*Ifng*, *Stat1*, *I11b*, *Cd40*, *Cxcl10*, *Ccl7*, *Irf1*, *Igf1* などの遺伝子発現が顕著な増加を示した。自然免疫系が優位になっていることに加え、インスリン結合タンパクである *Igf1* 遺伝子の増加は、低栄養暴露直後のFR 児の生理的状態を示している。また、低栄養暴露により、成長因子(*Igf1*)および脂肪代謝因子(*Khk*)の遺伝子発現が減少していることが明らかになった。

HF 群では、炎症を示唆する *I11b*, 脂肪合成、代謝にかかわる *Scd1* の発現が増加した。即ち、1 週間の高脂肪食暴露により、脂肪合成/代謝に關与する遺伝子が動き始めている。

3 週の肝臓の網羅的遺伝子発現解析の結果、FR 群では、コレステロール合成系の遺伝子群(*Mvk*, *Pcsk9* など 13 遺伝子)や、脂肪細胞の分化/肝細胞の増殖に關与する *Cebpb* の発現が減少した。即ち、3 週のFR 群は体重が回復しているにもかかわらず肥満を示唆する遺伝子群の発現は減少していることを示している(新生児期の低栄養により肥満になりにくい)。

3W	脳		肝臓		褐色脂肪	
	FR	HF	FR	HF	FR	HF
Up	1	8	44	360	83	232
Down	6	3	105	217	69	190
Total	7	11	149	577	152	422

HF 群では、マクロファージ賦活化を示すケモカインシグナル系遺伝子群(*Cxcl1*, *Cxcl9*, *Tlr4*)、NFκB シグナル系遺伝子群(*Egfr*, *Fas*, *Tollip*, *Tlr4*, *I116*)の増加がみられた。さらに脂肪蓄積(*Rxra*)、脂肪酸合成酵素(*Fas*)の増加、動脈硬化に關与する *Vwf* の増加も認められた。

3 週の褐色脂肪細胞の網羅的遺伝子発現解析の結果、FR 群ではインスリン抵抗性や脂肪/コレステロール合成に關与(*Lep*, *Igf1*, *Fasn*, *Acasa*, *Retn*, *Apoc3*, *Ldlr*)する遺伝子の減少、グルココルチコイド受容体(*Sgk1*, *Per2*)の増加、Th1 有意を示唆する *Irf4* の増加、*Junb* の減少がみられた。

HF 群ではマクロファージ賦活化を示す

ケモカインシグナル系遺伝子群 (*Cxcl1*, *Cxcl2*) の増加、T 細胞活性化遺伝子 (*Icam1*) の増加、脂肪代謝低下を示唆する *ApoE* の減少、脂質合成を示唆する遺伝子群 (*Cpt1a*, *Gyk*, *Ehhadh*, *Klf4*, *Cebpb* など) の増加、アディポカインシグナル活性 (*Serpine1*) の増加が観察された。

また、FR 群と HF 群間での遺伝子の変動を比較した結果、脳では、1 週で両群共通して 3 個の遺伝子 (*Cyp2a5*, *Cyp2a4*, *Plunc*) が増加した。肝臓では、1 週の両群で発現が変化した遺伝子が 9 個あり、このうち自然免疫系の賦活化を示唆する遺伝子が 6 個 (*Fos*, *I1b*, *Rgs1*, *Ppp1r3g*, *Hamp*, *Igll1*) 含まれていた。また、3 週の FR 群と HF 群で共通して発現が変化した遺伝子は 1 個 (*Aldh1a7*) 見出され、減少していた。これらの結果から、新生児期の栄養環境変化初期には摂取エネルギーに非依存的に自然免疫系が優位になること、離乳時にはアセトアルデヒドの分解能が低下することが考えられた。

(3) 栄養環境変化による免疫組織系の形態学的影響

生後 1 週の脾臓の免疫組織学検査の結果を Fig.3 に示す。脾臓では顕著な髄外造血像が観察される時期である。FR 群では髄外造血像は減弱し、CD3、CD45R、Iba-1 陽性細胞が減少していた。HF 群では、脾臓重量には差はなかったが、これらの陽性細胞数の分布が減少していた。

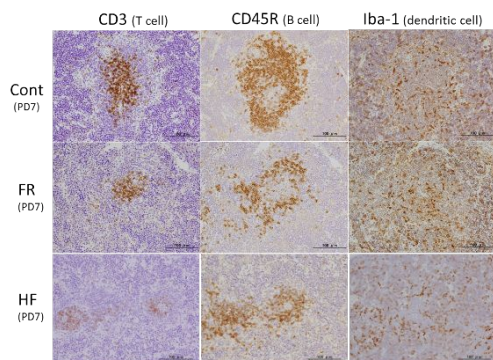


Fig.3 マウス新生児期低栄養暴露の脾臓組織学変化(生後7日)

FR 群の生後 1 週の胸腺では、被膜直下に大型で CD45R 陽性を示す胸腺細胞の分布が対照群、HF 群と比較して多かった。

生後 3 週の脾臓の免疫染色の結果を Fig.4 に示す。FR 群では CD3、CD45R、Iba-1 陽性細胞が少なく、局在性も弱かった。HF 群においても FR 群と同様の結果であった。

生後 3 週の対照群の胸腺では、皮質および髄質に CD3 陽性細胞が確認され、陰性細胞も確認できた。FR 群では CD3 陽性が対照群よりも多く観察され、被膜下に大型陽性細胞も観察された。HF 群では対照群と差はなかった。

その他、肝臓および腎臓についても形態学的観察を行った。肝臓については、Iba-1 陽性細胞の分布が FR 群、HF 群ではやや増加する傾向がみられた。また腎臓では、対

照群では認められなかった皮質表面の尿管

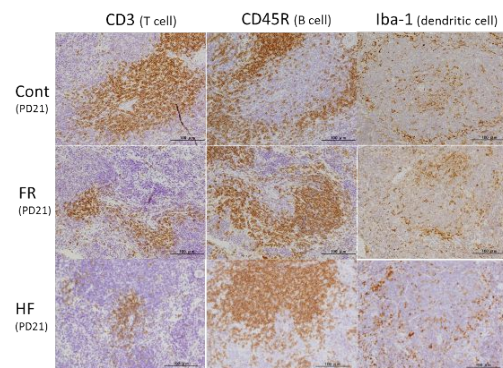


Fig.4 マウス新生児期低栄養暴露の脾臓組織学変化(生後21日)

管異形成が FR 群で顕著に観察された (FR 群: 9/22 例、HF 群 1/22 例)。この異形成は生後 10 週においても確認されたことから、腎機能へ継続的な影響も示唆された。

(4) 発達期の栄養環境に起因した成人期疾患発症に關与する遺伝子の選抜

胎生期低栄養実験によりプロモーター領域の DNA メチル化に変化を受ける肝臓の遺伝子群 (Ogawa, Kuwagata et al., 2014) と、本プロジェクトで実施した新生児期低栄養曝露による肝臓の遺伝子発現変動の比較を行い、発達期の低栄養曝露による成人期疾患責任遺伝子の検索を行った。生後 1 週の肝臓では 245 個の遺伝子発現に変化がみられたが、このうち胎生期低栄養実験によりプロモーター領域の DNA メチル化に変化を受けていた遺伝子は 37 個であった。さらに 21 個が胎児期と新生児期で低栄養に対する発現が逆方向に変化していたことから、成人期疾患責任遺伝子群の候補として、今後の研究基盤となり得る結果を得た。これらの中には自然免疫系 (*Cd274*, *Gbp3*, *I1b*, *Xcl1* など)、脂肪代謝 (*Mrap*)、肥満 (*Sulf2*)、糖新生 (*Sds*) に關与するものが含まれていた。

(5) まとめ

本研究期間内に実施ができなかったが、本モデル動物にて成熟後に再度、動物に負荷をかけ生体反応の違いを確認する必要性が残された。本研究の結果から、新生児期の栄養環境の変化は、低栄養でも過栄養でも免疫系器官の発達に影響を及ぼすことが示唆された。また、自然免疫系が優位になることが明らかになった。

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 7 件)

Muneoka, K, Kuwagata M., Ogawa, T., Shioda, S., Mother/Offspring Co-administration of the Traditional Herbal Remedy Yokukansan During the

Nursing Period Influences Grooming and Cerebellar Serotonin Levels in a Rat Model of Neurodevelopmental Disorders. *Cerebellum* 査読有 14, 2015, 86-96. DOI 10.1007/s12311-014-0611-2

Ogawa T, Shibato J, Rakwal R, Saito T, Tamura G, Kuwagata M, Shioda S. Seeking genes responsible for developmental origins of health and disease from the fetal mouse liver following maternal food restriction. *Congenit Anom (Kyoto)* 査読有 54, 2014, 195-219. doi: 10.1111/cga.12062.

Senuma M, Mori C, Ogawa T., Kuwagata M. Prenatal sodium arsenite affects early development of serotonergic neurons in the fetal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 査読有 38, 2014, 204-212. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.09.005.

Ogawa T, Kuwagata M, Muneoka M, Wakai C, Senuma M, Shioda S. : Abnormal brain function of the rat neonate in a prenatal 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-induced developmental disorder model. *Inter. J. Dev. Neurosci.* 査読有 30, 2012, 507-515. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2012.05.002.

Kuwagata M. Current problems of *in vivo* developmental neurotoxicity tests and a new *in vivo* approach focusing on each step of the developing central nervous system *Congenit Anom (Kyoto)* 査読有 52, 2012, 129-139. doi: 10.1111/j.1741-4520.2012.00376.x.

〔学会発表〕(計 10 件)

等々力舞、瀬沼美華、熊谷文明、白見憲司、千坂亜希子、野口聡、小川哲郎、齊藤義明、桑形麻樹子、新生児低栄養環境による児の免疫組織への形態学的影響 第 31 回日本毒性病理学会, 2015.01.29-30 (タワーホール船堀、東京、江戸川)

瀬沼美華、柴藤淳子、Randeep Racwal, 小川哲郎、桑形麻樹子 DOHaD 説に基づいた胎児期あるいは新生児期の低栄養曝露による成人期疾患責任遺伝子の検索 第 54 回日本先天異常学会学術集会, 2014.07.26-27(麻布大学、神奈川、相模原)

瀬沼美華、柴藤淳子、Randeep Racwal, 小川哲郎、桑形麻樹子 第 41 回日本毒性学会学術集会 新生児期の低栄養による成人期疾患責任遺伝子の検索, 2014.07.02-04(神戸国際会議場、兵庫、神戸)

桑形麻樹子、瀬沼美華、熊谷文明、柴藤淳子、Randeep Randeep、齊藤義明、丸茂秀樹、小川哲郎、塩田清二: Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説に基づいた新生児期栄養変化による生後発達への影響 第 30 回日本毒性病理学会, 2014.01.30-31(あわぎんホール、徳島) 小川哲郎、柴藤淳子、Rakwal

Randeep, 斎藤智美、宗岡克政、小川哲郎、桑形麻樹子、塩田清二 Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 責任遺伝子の解析 第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013.07.21-23 (千里ライフサイエンスセンター、大阪)

瀬沼美華、Randeep Randeep、柴藤淳子、斎藤智美、宗岡克政、小川哲郎、塩田清二、桑形麻樹子: DOHaD 説に基づいた精神疾患リスクに関する遺伝子の検索 第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013.07.21-23(千里ライフサイエンスセンター、大阪)

瀬沼美華、古谷真美、高島宏昌、太田亮、森千里、小川哲郎、桑形麻樹子: ラット胎生期ヒ素曝露の胎児脳発達への影響: セロトニン神経発生への影響. 第 39 回日本毒性学会学術集会 2012.07.17-19(仙台国際センター、宮城、仙台)

Ogawa T, Kuwagata M, Shioda S. : Searching gene candidates responsible for risk of mental disorders in the mouse intrauterine undernutrition model. 51th SOT (2012, 3 San Francisco, USA)

Kuwagata, M Ogawa T, Shioda S. : Sodium (meta) arsenite exposure effects on the early developing rat fetal brain: A morpho-histopathological examination. 51th SOT (2012, 3 San Francisco, USA)

〔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

特に該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑形麻樹子 (KUWAGATA, Makiko)
昭和大学・医学部・顕微解剖学教室・客員教授、食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部・病理学研究室・室長

研究者番号: 70398684

(2) 研究分担者

塩田清二 (SIODA, Seiji)
昭和大学・医学部・顕微解剖学教室・教授

研究者番号: 80102375

柴藤淳子 (SHIBATO, Junko)

昭和大学・医学部・顕微解剖学教室・研究員

研究者番号: 10611121

(3) 連携研究者

なし