

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791111

研究課題名(和文) BDNF から解明する新生児期ストレスの脳への影響

研究課題名(英文) Effect of early life stress on BDNF-mediated lipid homeostasis

研究代表者

鈴木 辰吾 (SUZUKI, SHINGO)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50451430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究から、脳由来神経栄養因子(BDNF)によるコレステロール合成がシナプス形成に重要であることが示唆された。一方、生後早期のストレスがBDNFの発現低下を誘導するという報告から、ストレスが同過程を阻害する可能性が考えられた。そこでストレスとBDNFによる脂質合成との関連を調べた結果、母子分離ストレスによってコレステロール合成酵素の発現が有意に低下することを見出した。一方、神経細胞のコレステロール合成はストレスホルモンの影響を受けなかった。これらの結果から、新生児期のストレスが、BDNFとコレステロール合成酵素の発現低下を介してシナプス形成に影響する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mediates neuronal cholesterol biosynthesis during synapse development. However the effect of early life stress on the BDNF-dependent lipid homeostasis in neurons is not well understood. Thus, we here investigated the crosstalk between stress and BDNF signaling. First, it was shown that cholesterol biosynthesis in neurons were not affected by the treatment with corticosterone while stress hormones were known to inhibit cholesterol biosynthetic pathway in non-neuronal cells. Second, we found that maternal deprivation reduced the expression of cholesterol biosynthetic enzymes. These results indicated a possibility that early life stress influenced BDNF-mediated cholesterol biosynthesis by decreasing their expression.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：BDNF コレステロール 母子分離 パルミトイル酸

## 1. 研究開始当初の背景

生後早期におけるストレスは、思春期や成熟期における精神疾患の発症の一因となる可能性が考えられ、その原因の解明や脆弱性の探索が急務である。

出生早期に母親から引き離されたサルやラットでは、成長後においても学習性無力状態(うつ様症状)や不安行動の亢進、さらに海馬の形態の変化などが観察されることから、幼児期のストレスが精神機能の適切な発達を阻害する可能性が示されている(Houtら, Brain res. 2002; Houtら, Psychopharma. 2001; Mirescuら, Nat Neurosci. 2004)。また、幼児期のストレスがストレス応答系(HPA系)の亢進や脳内モノアミン系神経伝達の変化などを誘発し、最終的には、シナプスの発達・形成に關与する脳由来神経栄養因子(BDNF)の作用を低下させるという仮説が示唆されているが、ストレスとBDNFの分子メカニズムは十分に解明されていない。つまり、幼児期のストレスとBDNFの機能障害との関係を理解できれば、ストレスによる健全な精神発達の阻害メカニズムを解明できる可能性が考えられ、予防法や治療法の開発に道が開ける可能性が考えられる。加えて、幼児期のストレスが気分障害や不安障害などの精神疾患を発症させる要因になり得るといふ仮説が提唱されていることから(吉岡充弘ら、日本薬理学雑誌 2005)、ストレスが発達過程の脳に及ぼす影響の早期解明が一層求められている。

一方、これまでに申請者は、BDNFがシナプスの発達や機能を調整するメカニズムの解析を行ってきた。その研究の中で、BDNFが幼若期神経細胞のコレステロール(Chol)の自家合成を誘導することを見出し、さらに合成されたコレステロールがシナプス蛋白質の適切な機能発揮に必要であることを生化学、電気生理学の実験などによって確認した(Suzukiら, J Neurosci, 2007)。つまり「BDNF コレステロール合成 シナプス形成」の過程は脳の発達に極めて重要である可能性が示唆された。一方、前述のように幼児期のストレスがBDNFの機能を低下させる可能性が示唆されているため、幼児期のストレスが「BDNF コレステロール合成 シナプス形成」の過程を障害する可能性が考えられた。実際、幼児期のストレスによってBDNFの発現が低下することや、コレステロール合成酵素の機能不全によって、精神疾患が発病することなども報告されているため、本研究においてこの仮説の検証を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ストレスとBDNFによる脂質合成との関連解明を目的として、BDNFの機能低下が脳の適切な発達を阻害するメカニズムの解明とストレスホルモンがコレステロール合成活性を直接阻害する可能性の解

明を目指した。また、発展的な研究として、幼児期神経細胞のストレスを高感度検出するアッセイ系の基盤技術の開発、さらに、BDNFに依存して発現誘導される脂質の探索を目指した。

## 3. 研究の方法

### (i) BDNFの機能低下が脳の適切な発達を阻害するメカニズムの解明

上記した「仮説」に基づき、母仔分離モデルラットにおいてコレステロール合成酵素の発現解析を実施した。

Sprague-Dawleyラットを用いて、生後2日目から6日目の間、一日当たり計六時間の母仔分離を実施した(三時間の母仔分離後を二回)。生後7日目に三時間の母仔分離を与えた後、麻酔下で生食による還流を行い、脳の冠状断面(1mm)を作成した。それぞれの切片からBDNFの機能と関連の深い海馬とmPFC(medial prefrontal cortex)に相当する領域を取得した。その後、total RNAを精製し、qPCRによってコレステロール関連遺伝子の発現を解析した。

### (ii) ストレスホルモンがコレステロール合成活性に与える影響の解明

ステロイドホルモンが非神経細胞のコレステロール合成を阻害することが報告されている。そこで、化合物として同じ骨格を持つストレスホルモンがコレステロール合成を直接阻害する可能性について検証した。

初代培養神経細胞を妊娠20日齢のラットより調整し、四日間培養後、コルチコステロンおよびBDNFを投与した。さらに三日間培養後、神経細胞を回収し、そこに含まれるコレステロール量を酵素学的に測定した。また、神経細胞を培養するにあたり、コルチコステロンやプロゲステロンなどのステロイドを含まない培養液を特別に調整し、これを使用した。

### (iii) 幼児期神経細胞のストレスを高感度検出するアッセイ系の構築

ストレスを受けた神経細胞を高感度に検出可能にし、ストレスと神経細胞の関係を細胞レベルで詳細に解析可能なin vitro実験系の基盤技術を開発した。

ストレスの受容によって神経細胞のカルパインが活性化することが知られているため、カルパインの活性化を感知してレポーター遺伝子を発現できる人工蛋白質センサーを作成した。そして、人工蛋白質の遺伝子を挿入した発現ベクターとtetO-ElucレポータープラスミドをBHK細胞へ導入し、レポーターが細胞内カルシウムの上昇とカルパイン活性に依存して発現されることを確認した。

### (iv) BDNFに依存して発現誘導される脂質

## の探索

コレステロール以外の脂質も BDNF により神経細胞で合成誘導され、シナプス形成などの過程に關与する可能性が考えられた。そこで、ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて、BDNF により発現誘導される脂質の同定を試みた。

初代培養神経細胞を妊娠 20 日齡のラットより調整し、四日間培養後、BDNF を投与した。さらに三日間培養後、神経細胞を回収し、そこからイソプロパノール・ヘプタン混合溶液を用いて脂質を抽出した。脂質をけん化した後、トリメチルシリル化修飾を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析計で脂肪酸成分の分析を行った。

## 4. 研究成果

### (i) BDNF の機能低下が脳の適切な発達を阻害するメカニズムの解明

コントロール群と母仔分離ストレスを与えた群におけるコレステロール合成酵素の発現を比較した結果、海馬においては、ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼとステロールイソメラーゼが有意に減少していた。一方 mPFC におけるこれらの発現は有意な変化を示さなかった。また、コレステロール合成酵素のうち、CYP51 およびスクアレンシンターゼの発現変動は海馬および mPFC でも確認できなかった。ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼはコレステロール合成系初期の律速酵素であり、これまでの鈴木らの研究により、ステロールイソメラーゼも発達過程の神経細胞においては律速酵素である可能性が示唆されている。そのため、少なくとも海馬においては、コレステロール合成系の酵素の発現が母仔分離ストレスの影響を受けていると考えられた。

### (ii) ストレスホルモンがコレステロール合成活性に与える影響の解明

これまでの報告と同様に、BDNF によって神経細胞のコレステロールが有意に増加していることを確認できた。しかし、予想に反して、コルチコステロンの投与は BDNF によるコレステロール合成に対してほとんど影響を及ぼさなかった。そこで、同様にステロイド骨格を持ち、コレステロール合成への阻害活性が示されているプロゲステロンについても同様の実験を実施したが、神経細胞においては、プロゲステロンのコレステロール合成への阻害効果についても確認できなかった。これらの結果から、非神経細胞においてコレステロール合成阻害活性が報告されているステロール分子も発達過程の神経細胞に対しては作用しない可能性が考えられた。

### (iii) 幼児期神経細胞のストレスを高感度検出するアッセイ系の構築

tetO-Eluc レポーター単独を空の発現ベクターと共にトランスフェクションした場合に比べて、人工蛋白質を発現させた場合、レポーター活性が約 2.5 倍上昇した。また、この上昇はカルパイン特異的阻害剤である inhibitor III および BAPTA-AM の投与により阻害されることが明らかになった。これらの結果から、作成した人工蛋白質が平常状態の細胞内カルシウムとそれを受けて活性化したカルパイン活性を検知し、レポーター遺伝子の発現を適切に誘導したものと考えられた。

### (iv) BDNF に依存して発現誘導される脂質の探索

ガスクロマトグラフィー質量分析計によって、海馬神経細胞および大脳皮質由来の神経細胞からの脂肪酸を分析した結果、どちらの神経細胞においても BDNF の投与依存的にパルミトオレイン酸の有意な増加が確認できた。一方、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸の量は BDNF による変化を受けなかった。これらの結果から、BDNF がパルミトレイン酸の合成を特異的に誘導している可能性が考えられた。

## 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 12 件)

Miki T, Liu JQ, Ohta K, Suzuki S, Kusaka T, Warita K, Yokoyama T, Jamal M, Ueki M, Yakura T, Tamai M, Sumitani K, Hosomi N, Takeuchi Y. Early postnatal maternal separation causes alterations in the expression of  $\beta$ -adrenergic receptor in rat adipose tissue suggesting long-term influence on obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Dec 6;442(1-2):68-71. 査読あり

Ohta KI, Miki T, Warita K, Suzuki S, Kusaka T, Yakura T, Liu JQ, Tamai M, Takeuchi Y. Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *Int J Dev Neurosci.* 2013 Oct 31;33C:15-21. 査読あり

Miki T, Yokoyama T, Kusaka T, Suzuki S, Ohta KI, Warita K, Wang ZY, Ueki M, Sumitani K, Bellinger FP, Tamai M, Liu JQ, Yakura T, Takeuchi Y. Early postnatal repeated maternal deprivation causes a transient increase in OMPg and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination. *J Neurol Sci.* 2014 Jan

15;336(1-2):62-7. 査読あり

Miki T, Kusaka T, Yokoyama T, Ohta KI, Suzuki S, Warita K, Jamal M, Wang ZY, Ueki M, Liu JQ, Yakura T, Tamai M, Sumitani K, Hosomi N, Takeuchi Y. Short-term ethanol exposure causes imbalanced neurotrophic factor allocation in the basal forebrain cholinergic system: a novel insight into understanding the initial processes of alcohol addiction. *J Neural Transm.* 2014 Feb;121(2):201-10. 査読あり

Warita K, Mitsuhashi T, Ohta K, Suzuki S, Hoshi N, Miki T, Takeuchi Y. Gene expression of epigenetic regulatory factors related to primary silencing mechanism is less susceptible to lower doses of bisphenol A in embryonic hypothalamic cells. *J Toxicol Sci.* 2013;38(2):285-9. 査読あり

Warita K, Mitsuhashi T, Fukui S, Ohta K, Suzuki S, Miki T, Takeuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Sugawara T, Hoshi N. Immunohistochemical analysis of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and StAR-binding protein (SBP) expressions in the testes of mice during fetal development. *Reprod Biol.* 2013 Mar;13(1):92-5. 査読あり

Warita K, Mitsuhashi T, Ohta KI, Suzuki S, Hoshi N, Miki T, Takeuchi Y. In vitro evaluation of gene expression changes for gonadotropin-releasing hormone 1, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2, in response to bisphenol A treatment. *Congenit Anom (Kyoto).* 2013 Mar;53(1):42-5. 査読あり

Suzuki K, Maekawa F, Suzuki S, Nakamori T, Sugiyama H, Kanamatsu T, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H. Elevated expression of brain-derived neurotrophic factor facilitates visual imprinting in chicks. *J Neurochem.* 2012 Dec;123(5):800-10. 査読あり

Takeuchi Y, Miki T, Liu JQ, Ohta KI, Warita K, Matsumoto Y, Suzuki S, Tamai M, Ameno K, Bedi KS, Yakura T. Morphological Evidence of an Altered Process of Synaptic Transcytosis in Adult Rats Exposed to Ethanol. *Alcohol Alcohol.* 2012 Nov-Dec;47(6):671-6. 査読あり

Suzuki S, Hongli Q, Okada A, Kasama T, Ohta K, Warita K, Tanaka K, Miki T and

Takeuchi Y. BDNF-dependent accumulation of palmitoleic acid in CNS neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 Nov;32(8):1367-73. 査読あり

Warita K, Mitsuhashi T, Tabuchi Y, Ohta K, Suzuki S, Hoshi N, Miki T, Takeuchi Y. Microarray and gene ontology analyses reveal downregulation of DNA repair and apoptotic pathways in diethylstilbestrol-exposed testicular Leydig cells. *J Toxicol Sci.* 2012;37(2):287-95. 査読あり

Lee KY, Miki T, Yokoyama T, Ueki M, Warita K, Suzuki S, Ohta KI, Wang ZY, Jamal M, Yakura T, Liu JQ, Hosomi N, Takeuchi Y. Neonatal repetitive maternal separation causes long-lasting alterations in various neurotrophic factor expression in the cerebral cortex of rats. *Life Sci. Life Sci.* 2012 Apr 20;90(15-16):578-84. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

鈴木辰吾 「ニューロンによるコレステロール合成とシナプス発達」 香川脳神経化学研究会 2013.1.18 口頭発表

鈴木辰吾 「神経回路の新しい可視化法の開発」 包括的神経グリア研究会 2013.1.12 口頭発表

Suzuki S 「BDNF-regulated cholesterol metabolism for synapse development」 The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry September 30 - October 2, 2012 ポスター発表

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 辰吾 (SHINGO SUZUKI)

香川大学 医学部 神経機能形態学

研究者番号：50451430