

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460242

研究課題名(和文) 妊娠初期の低栄養による脳およびミクログリア発生異常と生後の精神疾患との関連の解析

研究課題名(英文) Analysis of the relationship between the developmental disabilities in the offspring and the disturbance of the development of the brain including microglia by maternal undernutrition

研究代表者

宇田川 潤 (Udagawa, Jun)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10284027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット妊娠初期(5.5日から10.5日)に食餌量を対照群の40%あるいは50%に制限し、母体の低栄養と仔の行動異常との関連およびそのメカニズムについて解析した。生後8週に低栄養群の仔ラットは多動および抗不安様行動を示した。生後9週の脳におけるモノアミン基礎値や代謝回転、活性化ミクログリアの分布は両群間で差が無かった。しかしながら、前頭前皮質におけるリン脂質生合成経路の酵素の遺伝子発現やリン脂質構成に両群間で差が認められた。リン脂質は情動との関連が示唆されてきており、低栄養ストレスは生後の脳内リン脂質代謝の変化を介して行動異常を誘発している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the impact of maternal undernutrition in the early pregnancy on behavior of the offspring. Maternal undernutrition led to hyperactivity and anti-anxiety-like behavior in the offspring at 8 weeks of age. The expression of the genes related to the biosynthesis of the phospholipid and the ratio of the phospholipid composition were altered in the prefrontal cortex of the undernourished group even though the level and turnover of monoamines and the distribution of the activated microglia were not changed. Recently, some studies suggest the relationship between the phospholipid and the behavior in the developmental disabilities. Taken together, alteration of the phospholipid composition in the prefrontal cortex may be one of the main causes of the abnormal behavior in the offspring, which was exposed to malnutritional stress.

研究分野：発生学

キーワード：胎生初期 低栄養ストレス 行動異常 前頭前皮質

1. 研究開始当初の背景

胎生期の低栄養は生後の統合失調症やうつ病、自閉症スペクトラム障害などの精神疾患の発症リスクを高めることが疫学研究により示唆されている。マウスやラットの実験においても、妊娠全期間、あるいは神経発生がはじまる胎生 11 日以後の栄養制限により、仔に生後の行動異常を引き起こすことが報告されている。しかしながら、これまで妊娠初期に限定した栄養制限と生後の仔の行動との関連はほとんど調べられていない。

一方、我々はこれまでの予備実験において、妊娠初期(妊娠 5 日から 10 日)の母体における 50%の食餌制限により、仔ラットがオープンフィールド試験で多動などの行動異常を示すことを見出した。

この時期の母体の栄養制限は、胚盤胞の着床直前から神経管の完全閉鎖前までの時期の発生に影響を与えると考えられ、初期胚の発生と精神疾患との関連を示唆している。過去の研究では、二分脊椎などの催奇形性を有するバルプロ酸について、同時期の母体での大量暴露が仔ラットの自閉症様の行動異常を誘発することが報告されている。しかしながら、我々の予備実験において、低栄養による仔ラットの行動異常は注意欠如・多動性障害(ADHD)症候モデルである SHRSP ラットの行動異常に類似していた。ADHD の発症に関して遺伝的要素の関与が指摘されているが、いまだ原因不明の疾患である。我々の予備の実験結果は、ADHD の発症原因の一つとして妊娠初期の低栄養が関与しているという可能性を指摘する新しい知見と考えられた。

ラットにおいて胎生 5 日から 10 日は、白血病抑制因子(LIF)反応性の未分化な神経幹細胞が発生し、続いて塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)反応性の神経幹細胞に入れ替わる時期にあたる。このことは、胎生初期の低栄養が未分化神経幹細胞のエピジェネティクスに変化を引き起こし、組織形成異常あるいは神経系細胞の機能異常を誘発して、ADHD 様の行動異常という表現型を呈している可能性を示唆している。

また、脳内のミクログリアは神経細胞のシナプス調節に関与していることが近年明らかとなってきており、ミクログリアの機能異常は様々な精神疾患に関与していると考えられている。一方、マウス脳内のレジデントミクログリアは、胎生 8.5 日に卵黄嚢に存在するミクログリア前駆細胞が、胎生 10.5 日に脳内に移動したものと考えられている。したがって、胎生初期の低栄養は、未分化な神経幹細胞のみならず、レジデントミクログリアの前駆細胞にエピジェネティックな変化を引き起こし、レジデントミクログリアの機能異常を介した生後の行動異常を惹起している可能性も考えられる。

さらに、統合失調症患者の死後脳では前頭皮質のリン脂質分布が正常コントロールと

異なっていることが示され、脳のリン脂質分布や構成と疾患の精神症状との関連が示唆されている。

いずれにしても、これまで発達障害などの発症原因としてほとんど注目されることのなかった胎生初期の非常に未分化な幹細胞あるいは前駆細胞における変化が、ADHD など生後の発症リスクと関わることを示唆している。そこで、妊娠初期の低栄養による未分化神経幹細胞およびミクログリア前駆細胞のエピジェネティックな変化と生後の行動異常との関連を形態および機能的に解析した。

2. 研究の目的

本研究は、胎生初期(5 日~10 日)の低栄養ストレスにより生じる仔の行動異常とその発症メカニズムの解明を目的とする。

(1) オープンフィールドなどの行動試験により、多動や不安様行動などの行動評価を行う。

(2) 情動や行動と関連のある脳内モノアミンやミクログリアの活性化、リン脂質構成異常、および遺伝子の発現に関し、精神疾患関連の脳領域(前頭前皮質や大脳基底核、海馬、脳幹部)において検討し、行動異常の原因を探る。

(3) 胎生期および成獣のミクログリア、神経幹細胞における遺伝子発現やエピジェネティクスの変化を解析し、胎生初期の未分化な細胞の性質の変化と生後の行動異常との関連を解析する。

3. 研究の方法

(1) 食餌

Wistar ラットを低栄養群と対照群に分け、妊娠 2 日前より出産まで標準粉末飼料 AIN-93G を与えた。低栄養群はさらに 2 群に分け、ラット妊娠初期(5 日~10 日)に対照群の 50%あるいは 40%量に食餌制限を行った。対照群には食餌を自由摂取させた。出産後の母獣および離乳後の仔ラットには標準固形飼料 CE2 を与えた。

(2) ラット胚

食餌制限終了時(胎生 10.5 日)にラット胚を採取した後、頭部を OCT コンパウンドに包埋した。体部から DNA を採取し、PCR により SRY 遺伝子の有無を確認して雌雄判定を行い、雄のみ実験に使用した。

(3) ラット胚前脳の網羅的遺伝子発現解析

胎生 10.5 日のラット胚について厚さ 10 μ m の凍結切片を作成し、レーザーマイクロディセクション法により前脳を採取した。RNA を採取後、RNA 増幅キットにより得た増幅 cDNA について RNA アレイ解析を行い、低栄養ストレスによる胚の前脳の遺伝子発現変化を調べた。

(2) 行動試験

50%食餌制限群は生後 8 週および 12 週齢に仔ラット雄にオープンフィールド試験を

行った。また、40%食餌制限群については生後8週齢に同様の行動試験を行い、40%食餌制限群、50%食餌制限群および対照群の行動を比較した。オープンフィールドテストには直径90cmの円形のフィールドを用い、9ルクス下でフィールドの中心にラットを放し、Limelight ビデオトラッキングシステムにより10分間行動を追跡した。

(3) 脳内モノアミンの定量

行動実験後、生後13週齢のラットから前頭前皮質、海馬、大脳基底核、中脳、橋および小脳を採取し、モノアミンを抽出した。ノルアドレナリン、セロトニン、ドーパミン、ドーパミンの代謝物である3,4-ジヒドロフェニル酢酸(DOPAC)およびホモバニリン酸(HVA)、セロトニンの代謝物の5-ハイドロキシインドール酢酸(5-HIAA)含量をHPLCにより測定した。

(3) 血漿およびCSFメタボローム解析

40%食餌制限群および対照群において、行動試験後の生後9週雄の血漿およびCSFを採取し、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて糖およびアミノ酸のメタボローム解析を行った。メタボローム解析は神戸大学質量分析総合センターとの共同研究により行った。

(4) 前頭前皮質内のリン脂質含量の解析

40%食餌制限群および対照群の生後9週雄の脳を凍結し、薄切切片をITOスライドにのせ、マトリックスを塗布した。その後、質量顕微鏡を用いて負イオン測定を行い、400から1,000 m/zの範囲のリン脂質含量を前頭前皮質において測定した。

(5) 前頭前皮質の遺伝子発現解析

40%食餌制限群および対照群の生後9週雄の脳の凍結切片を作成し、レーザーマイクロダイセクション法により前頭前皮質を採取した。組織からRNAを抽出した後、RNA増幅キットにより増幅したcDNAを用いてqPCRを行い、リン脂質生合成経路における酵素の遺伝子発現解析を行った。また、ラット胚前脳のRNAアレイ解析において両群で発現に顕著な差が認められた遺伝子についても生後9週の前頭前皮質においてqPCRにより発現解析を行った。

(6) ミクログリア活性化の検討

40%食餌制限群および対照群の生後9週雄の脳の凍結切片について、抗Iba1抗体および抗CD11b抗体による免疫染色を行い、前頭前皮質および線条体における活性化ミクログリアの分布を観察した。

4. 研究成果

(1) 胎生初期の低栄養ストレスは仔の行動異常を引き起こす。

胎生期50%食餌制限群では、生後8週の仔ラットのオープンフィールドテストにおいて多動およびcrossingの増加が、生後12週ではさらに中心領域滞在時間の増加が認められた。一方、40%食餌制限群では、生後8週においてすでに多動、ならびに中心領域滞

在時間およびcrossingの増加が認められた。したがって、胎生初期の低栄養ストレスは、生後に多動や抗不安様行動を誘発することが明らかとなった。

(2) 胎生初期の低栄養ストレスは、生後の脳内モノアミンの基礎値を変化させない。

生後9週の前頭皮質、線条体、海馬および中脳のノルアドレナリン、セロトニン、5-HIAA、ドーパミン、DOPAC、HVA含量に両群で有意差が認められなかった。したがって、胎生期低栄養ラットでは脳内のモノアミン基礎値や代謝回転に変化は生じていないと考えられた。

(3) 胎生期低栄養ストレスは仔の前頭前皮質のリン脂質代謝および構成を変化させる。

生後9週の血漿メタボローム解析により、胎生期低栄養ラットでは、うつ病との関連が指摘されているエタノールアミンリン酸の前駆物質である、エタノールアミン濃度が増加していた。リン脂質の1つであるホスファチジルエタノールアミン(PE)は、エタノールアミンリン酸から生合成されるため、脳内リン脂質の異常が胎生期低栄養ラットの行動異常の原因の一つである可能性が示唆された。さらに、情動と関連の深い前頭前皮質では、real-time PCR解析によりリン脂質代謝関連遺伝子のうち、*Pcyt1/2*、*GPAT1*、および*PSS1*の発現増加を認めた。これらはPE、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジン酸、およびホスファチジルセリン(PS)生合成経路の律速酵素であり、胎生期低栄養ラットでは前頭前皮質におけるリン脂質構成異常が生じている可能性が考えられた。そこで、前頭前皮質の質量顕微鏡解析を行ったところ、500.27 m/zおよび506.32 m/zのlyso PE、774.54 m/zのPE、さらには848.54 m/zおよび870.62 m/zのPSが低栄養群において増加していた。したがって、前頭前皮質のリン脂質構成異常が多動や抗不安様行動を誘発している可能性が考えられた。

(4) 低栄養ストレスによりラット胚前脳の遺伝子発現は大きく変化する。また、その一部は成獣まで継続する可能性がある。

40%食餌制限群の胎生10.5日のラット胚の前脳のRNAアレイ解析により、低栄養群では性腺刺激ホルモン放出ホルモン(*GnRH*)や神経幹細胞の発生・分化に関わる遺伝子、11

ヒドロキシステロイド脱水素酵素タイプ2(*Hsd11b2*)やLeptin receptor overlapping transcript(*Leprot*)、糖代謝や小胞輸送関連遺伝子の発現に変動が認められた($P < 0.05$)。成獣では*Pcyt1/2*やヘキソキナーゼ1(*HK1*)など、胎生10.5日で発現変化の認められなかった遺伝子の中で低栄養群と対照群間に有意差が認められるものもあったが、*GnRH*や*Leprot*など胎生期に有意差があり、成獣でも増加傾向にあるものも認められた($p < 0.10$)。*GnRH*は胎生期の神経発生や移動に関連するだけでなく、成獣では認知機能への関与が示唆されている。また、*Leprot*

はレプチン受容体の発現を負に制御すること、さらにレプチン受容体の発現減少は不安様行動と関連することから、*GnRH* や *Lepr^{ot}* の発現変化も生後の脳機能形成に関連している可能性も考えられる。

(5) 仔の行動異常はミクログリア活性化に帰因しないと考えられる。

前頭前皮質および線条体に活性化ミクログリアはほとんど認められず、両群でその分布に差は認められなかった。

これらの結果から、胎生初期の低栄養ストレスは、仔の脳のモノアミン代謝ではなく、リン脂質構成を変化させることで行動異常を引き起こしている可能性が考えられた。これまでに PE と行動との関連を研究した報告はほとんどなく、本研究で選抜された特定の PE の投与により多動や抗不安様行動が再現できれば、行動を制御する新規の経路を特定できることになる。また、*GnRH* や *Lepr^{ot}* などラット胚ですでに認められる遺伝子変化が成獣にまで継続する可能性のあるもの、また *Pcyt1/2*、*HK1* のように胎生期では差がなく成獣で差が明らかになるものがあり、神経幹細胞の性質の変化がニューロンやグリアに受け継がれる様式の解明は、今後の課題である。今後、神経幹細胞に生じたエピゲノム変化がニューロンやグリアにどのように受け継がれ、行動異常に結びついているのか明らかにする必要がある。

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 11 件)

Otani H, Udagawa J, Naito K.

Statistical analyses in trials for the comprehensive understanding of organogenesis and histogenesis in humans and mice. *J Biochem*, Epub ahead of print, 2016, 査読有

DOI: 10.1093/jb/mvw020

Fujiyama F, Nakano T, Matsuda W, Furuta T, Udagawa J, Kaneko T.

A single-neuron tracing study of arkypallidal and prototypic neurons in healthy rats. *Brain Struct Funct*, Epub ahead of print, 2015, 査読有

DOI: 10.1007/s00429-015-1152-2

Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H.

Interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic ureteric epithelium: Possible implication for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Congenit Anom (Kyoto)*, 56:127-34, 2016, 査読有

DOI: 10.1111/cga.12150

Okano J, Kojima H, Katagi M, Nakae Y, Terashima T, Nakagawa T, Kurakane T, Okamoto N, Morohashi K, Maegawa H, Udagawa J. Epidermis-dermis junction as a novel location for bone marrow-derived cells to reside in response to ionizing radiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 461:695-701, 2015, 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.094.

Sugiura S, Tazuke M, Ueno S, Sugiura Y, Kato I, Miyahira Y, Yamamoto Y, Sato H, Udagawa J, Uehara M, Sugiura H. Effect of prolactin-induced protein on human skin: new insight into the digestive action of this aspartic peptidase on the stratum corneum and its induction of keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol*, 135:776-85, 2015, 査読有

DOI: 10.1038/jid.2014.448

宇田川潤、胎児プログラミングと脳の形成、最新医学、70 巻、pp. 39-46、2015、査読無

Naito K, Notsu A, Udagawa J, Otani H. Statistical analysis with dilatation for development process of human fetuses. *Stat Methods Med Res*, Epub ahead of print, 2014, 査読有

DOI: 10.1177/0962280214543405

Inoue T, Hashimoto R, Matsumoto A, Jahan E, Rafiq AM, Udagawa J, Hatta T, Otani H. In vivo analysis of Arg-Gly-Asp sequence/integrin $\alpha 5 \beta 1$ -mediated signal involvement in embryonic enchondral ossification by exo utero development system. *J Bone Miner Res*, 2014 Jul;29(7):1554-63, 2014, 査読有

DOI: 10.1002/jbmr.2166

Jahan E, Matsumoto A, Rafiq AM, Hashimoto R, Inoue T, Udagawa J, Sekine J, Otani H. Fetal jaw movement affects Ihh signaling in mandibular condylar cartilage development: the possible role of Ihh as mechanotransduction mediator. *Arch Oral Biol*, 59:1108-18, 2014, 査読有

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.06.009

Okano J, Udagawa J, Shiota K. Roles of retinoic acid signaling in normal and abnormal development of the palate and tongue. *Congenit Anom (Kyoto)*, May;54(2):69-76, 2014, 査読有

DOI: 10.1111/cga.12049

Katagi M, Terashima T, Okano J, Urabe H, Nakae Y, Ogawa N, Udagawa J, Maegawa H, Matsumura

K, Chan L, Kojima H. Hyperglycemia induces abnormal gene expression in hematopoietic stem cells and their progeny in diabetic neuropathy. FEBS Lett, 588:1080-6, 2014, 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2014.02.030

〔学会発表〕(計 27 件)

日野広大、胎生期低栄養暴露による生後の脳内リン脂質代謝の変化と行動異常、第 121 回日本解剖学会、2016 年 3 月 30 日、福島

木村智子、間葉系幹細胞の低栄養ストレスは生後における後肢骨の成長を抑制する、第 121 回日本解剖学会、2016 年 3 月 30 日、福島

日野広大、低栄養暴露直後の神経幹細胞の遺伝子発現変化と生後の行動異常、第 4 回日本 D0HaD 研究会、2015 年 8 月 1 日、東京

木村智子、胎生初期の低栄養暴露は生後における後肢骨成長を抑制する、第 55 回日本先天異常学会学術集会、2015 年 7 月 26 日、神奈川

Kaneko S, Exposure to malnutrition in early pregnancy leads to hyperactivity in rat offspring. NeuroScience 2014、2014 年 11 月 17 日、ワシントン DC

木村智子、胎生初期低栄養暴露による生後の後肢骨成長変化についての解析、第 119 回日本解剖学会、2014 年 3 月 28 日、栃木

宇田川潤、げっ歯類の胎生期および新生児期における中枢神経系発生とレプチンとの関わり、第 33 回関西生殖発生毒性フォーラム、2014 年 4 月 19 日、大阪
宇田川潤、子宮内環境と精神疾患及び発達障害-動物実験を中心に-、第 53 回日本先天異常学会、2013 年 7 月 23 日、大阪

河野匡暁、胎生期の低栄養により多動を生じる仔ラットの脳の解析、第 53 回日本先天異常学会、2013 年 7 月 23 日、大阪

〔図書〕(計 1 件)

宇田川潤、日本組織細胞化学会、組織細胞化学 2014-じっくり学ぶ組織細胞化学の基礎と応用そして未来-、2014 年、pp. 53-63

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田川 潤 (UDAGAWA, Jun)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：10284027

(2) 研究分担者

岡野 純子 (OKANO, Junko)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50447968

早川 孝宏 (HAYAKAWA, Takahiro)
北海道大学・医学部・特任助教
研究者番号：90415927

武井 史郎 (TAKEI Shiro)
浜松医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：60398576

(3) 連携研究者

小島 秀人 (KOJIMA, Hideto)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：00225434

(4) 研究協力者

日野広大 (HINO, Kodai)
滋賀医科大学・大学院生
研究者番号：なし

木村智子 (KIMURA, Tomoko)
滋賀医科大学・医学部・助手
研究者番号：00449852

金子隼也 (KANEKO, Shunya)
滋賀医科大学・医学部医学科・学生
研究者番号：なし

原澤俊也 (HARASAWA, Toshiya)
滋賀医科大学・医学部医学科・学生
研究者番号：なし

河野匡暁 (KONO, Tadaaki)
滋賀医科大学・医学部医学科・学生
研究者番号：なし