

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504011

研究課題名(和文)胎生期低栄養によって精神疾患発症脆弱性が生じるメカニズムを探る

研究課題名(英文)Malnutrition in early life and later neurodevelopmental disability

研究代表者

須田 史朗(Shiro, Suda)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40432207

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)：わが国では低出生体重児が増加傾向にある。疫学研究成果から、その原因の一端である胎生期低栄養は統合失調症をはじめとする精神疾患の発症脆弱性を生じさせることが示されており、早急な対策が求められている。本研究では胎生期低栄養と精神疾患発症脆弱性の形成との関連を検討するために、ラットを用いた胎生期低栄養暴露による動物モデルを作成した。胎生期の低栄養暴露と出生時体重の減少との関連は明らかであった。組織学的検討から、胎生期の低栄養暴露と成人期の海馬神経新生の低下との関連を示唆する結果が得られた。妊娠期間中の母ラットに対する観察から、母体への低栄養暴露が母性行動に変化を与える可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Evidences from both of neurobiological and epidemiological studies raise the possibility that malnutrition in early life could lead to the later development of physical as well as psychiatric disorders. In the present study, we examined the effect of food deprivation during pregnancy, to simulate maternal malnutrition, on later neurodevelopment and behavioral disturbance in the rat. The results suggest that exposure to maternal nutrient-restriction in utero is associated with decreased neurogenesis in the hippocampus in the adult rat. Furthermore, behavioral studies revealed that food deprivation during pregnancy had significant effects on maternal behaviors. These results are suggestive of possible involvement of malnutrition in early life in the pathophysiology of psychiatric disorders.

研究分野：分子精神医学、うつ病、発達障害

キーワード：胎生期低栄養 統合失調症 発症脆弱性 動物モデル エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

1990年代以降、糖尿病や心血管障害などの生活習慣病の研究領域では、低出生体重がこれらの疾患の危険因子であることが発見され、以後、その病因の起源を胎生期に求める概念が提唱されている。環境の変化に対する感受性が極めて高い胎生期に低栄養状態を経験すると、遺伝子発現パターンの恒久的な変化を引き起こされ、低栄養に順応した儉約型の表現型が生じる。そのような個体が出生後に通常量の栄養を摂取すると取り戻し成長と言われる過剰な成長が生じ、それが将来の糖尿病や心血管障害などの生活習慣病発症へのリスク因子となる。

一方、近年の疫学研究の成果から精神疾患においても胎生期低栄養や低出生体重がその病因の起源となる可能性があることが報告されている。最もよく研究されているのは統合失調症との関連であり、第二次大戦中にオランダで生じた深刻な食料危機に関するコホート研究から、胎生期の低栄養状態への暴露が統合失調症の危険因子となることが示された。その後も統合失調症については、妊娠期間中の母親の低体重や貧血、低出生体重が発症リスクを上昇させるとの報告が続いている。また、うつ病についても子宮内胎児発育遅滞や超低出生体重での出生と青年期のうつ病罹患率との関連が報告され、注目を集めている。さらに、低出生体重は自閉症やADHD、精神遅滞などの心理発達の障害のリスクとなることも指摘されている (Suda and Takei, 2011)。

わが国では年々妊産婦のエネルギー摂取量が低下しており、その結果、低出生体重児の出生率が増加している。これは、先進諸国では日本だけに見られる傾向であり、将来、生活習慣病のみならず、精神疾患の罹患率が増加することが危惧される。従って、特にわが国では、胎生期の低栄養が軽視できない現実的状況がある。しかし、子宮内胎児発育遅滞や低出生体重などの胎生期の低栄養が想定される病態と成年期の精神疾患との関連を直接的に説明する生物学的メカニズムは解明されていない

2. 研究の目的

統合失調症、うつ病などの精神疾患は通常青年期以降に発症するが、疫学研究の成果から病因の起源は胎生期から生じている可能性が指摘されている。さらに、将来の発症の予測因子となる徴候は比較的早期に出現することも指摘されている。すなわち、幼少期の低いIQ、知識獲得・発達の遅滞は統合失調症をはじめとする精神疾患発症のリスク因子であることが報告されており、これらの認知機能発達障害は精神疾患の中間表現型であるとの理解が進んでいる。さらに、幼少時の低いIQや認知機能の障害は低出生体重と関連していることが指摘されている。そこで、申請者はこれらの知見を元に、胎生期低栄養

はエピジェネティクスによる遺伝子発現修飾を介して神経発達の障害を生じ、その結果、認知機能の発達が障害され、精神疾患の発症脆弱性が形成されるという仮説を着想した。本研究では、この仮説を立証するためにラットを用いた動物モデルを作成し、胎生期低栄養によって精神疾患の発症リスクが増加する生物学的メカニズムの解明を目指す。

我が国は人口が減少に転じ、未曾有の高齢化社会に突入しつつある。このため、次世代を担う子ども達の健全な育成を目指す取り組みが強く求められている。そのような背景において、本研究は妊産婦の低栄養が将来の子どもの精神発達に及ぼす影響を科学的に検証し、妊娠中の適切な栄養管理の必要性を国民に啓蒙するための基礎データを取得していくことを目的としており、時代に即したものであると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では胎生期低栄養と精神疾患発症脆弱性の形成との関連を検討するために、ラットを用い、胎生期低栄養暴露による動物モデルを作成する。そして以下の手順により、統合失調症・うつ病に関連した神経病理学的変化が生じることを確認する。特に、胎生期低栄養による影響が強いと考えられている統合失調症との関連について、詳細に検討する。まず、神経発達障害の指標である神経新生の低下、神経栄養因子群の発現変化について検討する。次に、脳内微小透析法によるドパミン放出量の検討、免疫組織学的検討、行動薬理学的検討を行う。続いて、統合失調症・うつ病関連遺伝子のメチル化解析を行い、精神疾患発症脆弱性の形成におけるエピジェネティクスの関与を検討する。以上を通じて胎生期低栄養による精神疾患の発症脆弱性形成の分子機構を解明し、最終的にはその予防・新規治療方法の開発につながる知見を得る。症で認められるドパミン神経系の伝達異常の有無について検討する。

1). 胎生期低栄養暴露モデルの作成
Sprague-Dawley系雌ラットを雄と交尾させ、膣プラグを確認した日を妊娠0日目とする。ラットの場合、ヒトの妊娠後期 (third trimester) に相当する時期は出生後より出生後12日目までの期間であるという指摘があるため (Quinn, 2005)、妊娠ラットをコントロール、妊娠初期暴露群、妊娠中期暴露群、妊娠後期暴露群の4群に分け、胎生期低栄養を暴露させる (Desai et al, 2005)。

コントロール群：妊娠中、出生後ともに母ラットへのカロリー制限なし。

妊娠初期低栄養暴露群：妊娠0日目より10日目まで妊娠ラットのカロリー摂取量を通常の50%に制限する。

妊娠中期低栄養暴露群：妊娠10日目より

21 日目まで妊娠ラットのカロリー摂取量を通常の 50% に制限する。

妊娠後期低栄養暴露群：妊娠中母ラットへのカロリー制限なし。出生後、母ラットのカロリー摂取量を通常の 50% に制限する。出生後 12 日目以降はカロリー制限を解除する。

妊娠中、授乳中は母ラットの体重を連日測定する。出生後、全ての仔ラットの体重を計測し、以後の解析で得られるデータと出生時体重との関連を検討する。保育仔数の差によって生じる実験への影響を排除するために、体重の多いものと少ないものは間引きし、代理母ラット一頭あたりの保育仔数を 8 匹に統一する。離乳した後は群ごとに 3 匹/ケージに分けて飼育する。生後 12 日齢、6 週齢と 12 週齢（それぞれラットの third trimester 終了期、思春期、成年初期に相当）の各時点で以下の実験に供する。

2) 神経病理組織学的評価

各処置群のラットを灌流固定し、脳を取り出す。冠状断連続切片を作成し、免疫組織化学にてニューロン (anti-GFAP)、アストロサイト (anti-GFAP)、オリゴデンドロサイト (anti-APC)、ミクログリア (anti-CD11b)、神経細胞新生 (anti-BrdU、anti-nestin) を可視化する。三次元顕微鏡画像解析システムを用い、前頭前野および海馬の神経細胞とグリア細胞の数とその分布密度、および、側脳室下帯と海馬顆粒細胞層下帯の神経細胞新生数を測定する。ドパミン・セロトニン神経系の変化について、各種抗体 (anti-TH、anti-DAT、anti-D1、anti-D2、anti-TPH、anti-5HTT) での免疫組織化学染色を行い、各処置群間での変化を観察する。

3) 脳内微小透析法によるドパミン・セロトニン・GABA 放出量の検討

統合失調症で認められるドパミン神経系の活動異常に着目し、脳内微小透析法により前頭前野、側坐核における覚せい剤投与後のドパミン、DOPAC、HVA の放出量を測定する。また、定常状態における前頭前野、側坐核、海馬のセロトニン・GABA 放出量も併せて検討する。

4) 行動学的評価

統合失調症者は、社会的引きこもりを呈する傾向がある。ラットの社会的行動が障害されるかどうかオープンフィールドで評価を行う。各処置群のラットを 60cm × 60cm のオープンフィールド内で異なるケージで飼育された対象ラットと対峙させ、5 分の観察時間内に見られた社会的行動に費やす時間を測定する。また、強制水泳試験を行い、うつ病関連行動の有無についても検討する。直径 25cm、高さ 65cm の円形シリンダーを用い、ラットに 25 ± 1 の水での強制水泳を 15 分間経験させる。24 時間後に再びラットを水

で満たしたシリンダー内に戻し、5 分の観察時間内で climbing、swimming、immobility に費やされた時間を測定し、うつ病関連行動の有無を判定する (Suda et al, 2008)。

2) 感覚運動系機能評価

統合失調症では感覚運動系の障害が生物学的なマーカー(中間表現型)として着目されている。この系は聴覚刺激に対する驚愕反応の先行刺激による抑制(Prepulse inhibition: PPI)として計測されるが、統合失調症ではこの PPI が障害されている。小動物用 PPI 測定装置を用いて聴覚刺激による驚愕反応を用い、各処置群のラットにおいて感覚運動情報処理能力 (sensorimotor gating) を評価する。

5) ラット胎児脳のエピジェネティクス解析

統合失調症やうつ病との関連が示唆されている遺伝子について、遺伝子のメチル化状態を解析する。候補遺伝子は、COMT、GAD67、DRD2、RSG4、CNP、OLIG2、GRM3、NRG1、ERBB4、KCNH2、DISC1、PCM1、ZNF804A、DAO、UMHK1、BDNF とする (Kleinman et al, 2011)。

6) 候補遺伝子の発現解析

上記で同定されたメチル化異常遺伝子の発現量の変化を解析する。リアルタイム PCR、イムノプロット法により mRNA、蛋白量を解析し、メチル化の変化が遺伝子/蛋白発現に異常をもたらしていることを確認する。解析は各タイムポイントで行い、同定された遺伝子のメチル化および発現の異常が生後どの時点まで持続するかを検討する。

4 . 研究成果

本研究では胎生期低栄養と精神疾患発症脆弱性の形成との関連を検討するために、Sprague-Dawley 系ラットを用いた胎生期低栄養暴露による動物モデルを作成した。ヒトにおいて、胎生期低栄養と統合失調症発症リスクとの関連については、妊娠初期 (first trimester) および妊娠後期 (third trimester) の暴露が発症と相関することが指摘されているため、妊娠初期、妊娠中期、妊娠後期の低栄養暴露モデルをそれぞれ作成し、表現系の差異について詳細な検討を加えた。

胎生期の低栄養暴露と出生時体重の減少との関連は明らかであった。組織学的検討から、胎生期の低栄養暴露と成人期の海馬神経新生の低下との関連を示唆する結果が得られている。また、統合失調症、うつ病などの精神疾患と関連の深いドパミン・セロトニン神経系の変化、神経栄養因子群の発現変化についての検討、作出された動物モデルの行動学的指標の検討を行っている。

妊娠期間中の母ラットに対する観察から、母体への低栄養暴露が母性行動に変化を与えている可能性が示唆されており、母性ホルモ

ンであるオキシトシン系の変化との関連に対する検討も行った。

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3件)

1. Makiguchi A, Nishida M, Shioda K, Suda S, Nisijima K, Kato S. Mirtazapine-induced restless legs syndrome treated with pramipexole. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2015;27:e76.

2. Inoue K, Inoue K, Suda S, Shioda K, Kobayashi T, Kishi K, Kato S. Differences in vulnerability to traumatic stress among patients with psychiatric disorders: One-year follow-up study after the Great East Japan Earthquake. Psychiatry Clin Neurosci. 2015;69:587-95.

3. Nishiyori Y, Nishida M, Shioda K, Suda S, Kato S. Unilateral hippocampal infarction associated with an attempted suicide: a case report. J Med Case Rep 2014;8:219

〔学会発表〕(計2件)

1. 須田史朗, 栄養学からみた精神疾患予防の可能性について, 第19回日本精神保健・予防学会学術集会(招待講演), 仙台国際医療センター、仙台, 2015年12月12日~2015年12月13日

2. 須田史朗, 妊娠・産褥期のうつ病と精神科医の関わり, 第12回日本周産期メンタルヘルス学会, 自治医科大学, 下野市, 栃木, 2015年10月31日

〔図書〕(計1件)

Suda S, Sugihara G, Takei N. History and perspective on psychiatry in Japan. In: Bhugra D, Tse S, Ng, R, Takei N (eds). Routledge Handbook of Psychiatry in Asia. Taylor & Francis, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

須田史朗 (SHIRO SUDA)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40432207

(2)研究分担者

塩田勝利 (KATSUTOSHI SHIODA)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40398516

西多昌規 (MASAKI NISHIDA)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10424029

(3)連携研究者

武井教使 (NORI TAKEI)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号: 80206937