

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670512

研究課題名(和文) 発達障害発症基盤としての胎生期脂質代謝異常の研究

研究課題名(英文) Embryonic lipid metabolism dysfunction as etiology of developmental disorder

研究代表者

松崎 秀夫 (Matsuzaki, Hideo)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号：00334970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期高脂肪環境が発達障害の発症基盤となるかどうかを検証する目的で、胎生期高脂肪環境を経験した動物の発達に伴う表現型を解析し、出生後の行動に与える影響を精査した。妊娠したICRラット・C57BL/6マウスに高脂肪負荷(45%または50%脂肪Test Diet)を与え、出生した仔の成熟後の社会行動、自発的移所行動量、薬物応答、テストバッテリーによる網羅的解析を検討した。対照群には妊娠期に22%脂肪Test Diet基礎飼料を与えた動物から出生した仔を用いた。しかし、どの実験でも有意差が認められなかった。このため、当初予定された行動実験以外の形態学的検討や遺伝子解析は行わず、実験計画を中止した。

研究成果の概要(英文)：Embryonic lipid metabolism dysfunction may work in human as etiology of developmental disorder. We examined if the lipid metabolism dysfunction of pregnant rodent has brought about great changes in their offspring as developmental disorder phenotype. In this study, we fed the Test diets including 45% fat content to pregnant rodent and examine behavior of their offspring by using open field test and so on. We used offspring from pregnant rodent fed by the standard Test diets including 22% fat content as control. However, the offspring exposed by high fat feeding in embryo stage has not shown any significant difference compared to controls in every experiments. Then, we ceased this study.

研究分野：分子精神医学

キーワード：脳・神経 発達障害 脂質

1. 研究開始当初の背景

我々は100例以上の未服薬の高機能自閉症男性の血清を収集して早期診断マーカー候補の探索を続けてきた。先天性のコレステロール合成酵素 (DHCR7) 欠損症である Smith-Lemli-Opitz 症候群の半数が自閉症を合併する報告 (Bukelis et al 2007) から、自閉症者の血清中脂質プロファイル調べたところ、健常対照に比して血清中脂質の総量が低く、とくに中性脂肪の超低密度リポ蛋白質 (VLDL) 分画成分の低下が著しいと判明した。年齢との相関を調べたところ、年少者ほどこの傾向が強いため、発達との相関が疑われた。全採血対象者に肝機能・甲状腺異常がなく、全て朝食前採血で食事の影響は除外できたので、この脂質所見は自閉症者特異的な現象と考えられた。

発達障害の基になる異変は、胎生期に始まると考えられる (Pardo and Eberhart 2007, Ploeger et al 2011)。Chang らは母親の妊娠期の脂質栄養が胎児脳に与える影響をみるため、在胎6日目から高脂肪食負荷を妊娠ラットに与えて胎児脳の組織を観察した。その結果、胎児の視床下部で神経新生が促され、摂食・体重の制御分子発現が出生時に認められた (Chang et al 2008)。このラットを再現したところ、予備実験で出生仔が12週齢で多動を示すことを発見した。この表現型は発達障害モデルとなる可能性を示唆するが、同ラットの発達に伴う表現型の変化は不明である。そこで、我々は「胎生期の高脂肪環境が、視床下部の再プログラムを介して胎児の発達障害をもたらす」と仮説を立て、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では動物モデル解析と出生コホート研究により、胎児脳が暴露する脂質環境と出生後の発達に焦点を当て、発達障害の生物学的基盤の解明を目指す。胎内で異常な栄養環境に曝されると、それに呼応して胎児脳が異常を修復する方向に再プログラムされる可能性がある。まず胎生期高脂肪環境を経験した動物の発達に伴う表現型を検討することにより、胎生期高脂肪環境が出生後の脂質代謝・行動に与える影響を精査する。この行動異常に結びつくメカニズム解明のため、視床下部に発現するオレキシン神経、ドパミン神経の形態学的解析を進める。さらに、モデル脳の発達に伴う遺伝子機能修飾機構を調べること、胎生期高脂肪環境が行動異常につながる遺伝子発現を調節する仕組みを明らかにできる。最後に、臍帯血出生コホートを用いたヒトでの胎生期脂質代謝と発達の相関の精査により、脂質と発達の関連性を臨床面から検討する。以上を総合して、胎生期脂質代謝と発達の相関の解明を試みる。

胎生期の栄養は中枢神経の成熟・分化に広く影響を及ぼすことを考えると、胎生期の母体の脂質栄養変化と発達障害の関連を検討

すべきであるが、そのような視点に立つ研究がなかった。本研究は、脂質代謝の側面から発達障害を理解しようとする独自の試みであり、この点が独創的である。この研究の展開によって、長く不明であった発達障害の病態解明、ひいては治療手段の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

Chang らは妊娠期に高脂肪食負荷を受けたラットから出生した仔が、成長後に視床下部に作用して、室傍核の神経新生およびオレキシンなど摂食・体重を制御するペプチドの発現を刺激することを示した。この研究で示された方法を参考に以下の実験を行う。

(1)平成25年度

胎生期高脂肪食負荷・ICR ラットの作製 (担当: 出雲・岩田)

ICR ラット8週齢の雌雄を12匹ずつ購入し、通常の給餌・給水で飼育する。飼育2週目に交配を開始 (妊娠0日目) し、3~4日間後に雄ラットをケージより取り出す。妊娠ラットを6匹ずつ2群に分け、うち1群について妊娠8日目から給餌を45%脂肪 Test Diet (#58G8) に変更して高脂肪食群とする。もう一方は対照群として22%脂肪を含む Test Diet 基礎飼料 (#5755) を給餌する。この給餌を出産日まで続ける。出産により各群60匹の出生が見込まれる。出産後、親ラットの給餌は直ちに通常の給餌に切り替える。離乳後より各群の雄ラットを個別に飼育し、雌ラットは安楽死処分とする。

胎生期高脂肪食負荷・ICR ラットの行動実験 (担当: 出雲)

上記の雄ラットを生後4週、生後8週、生後12週の時点で、以下の行動実験に供する。

A) 社会性評価: 各群10匹をあてる。open field test により、動物同士が行う身体接触の回数をカウントし、社会行動 (social interaction) の障害の有無を評価する。さらにラットの自発的な移所行動量変化を行動解析装置 (Scanet SV-20) により評価する。

B) 薬物応答: 各群10匹をあてる。メタンフェタミン (2mg/kg) ないしメチルフェニデート (10mg/kg) を腹腔内投与し、投与後2時間の行動量の変化を行動解析装置 (Scanet SV-20) により評価する。

C) 生化学的評価: 各群10匹をあてる。線条体における細胞外ドパミン放出量をマイクロダイアリス法により測定する。また、各個体より採血して、血清中脂質分画をクロマトグラフ分析により確認する。

胎生期高脂肪食負荷・C57BL/6 マウスの作製 (担当: 吉原・岩田)

種の相違による表現型の違いを考慮して、C57BL/6 マウスを用いた行動実験を併行して進める。C57BL/6 マウス8週齢の雌雄を12匹ずつ購入し、通常の給餌・給水で飼育する。以下、と同様に妊娠マウスを作製し、6匹ずつ2群に分けて1群の給餌を45%脂肪

Test Diet (高脂肪食群)に、もう一方は22%脂肪を含む Test Diet 基礎飼料(対照群)を給餌する。この給餌を出産日まで続け、満期出産により出生する各群 30 匹の雄マウスを次の実験に供する。

胎生期高脂肪食負荷・C57BL/6 マウスの行動実験(担当:吉原)

マウスを通常の給餌・給水で飼育し、自閉症や ADHD 等の発達障害の表現型を検討する目的で4週齢、8週齢、12週齢の各段階でテストバッテリー方式の網羅的行動解析を実施する。

(網羅的行動解析の内容)

- A) 自発活動・自発行動量、open field test
- B) 情動性・高架式十字迷路、明暗往来 test
- C) 学習・記憶・恐怖条件付け、モリス水迷路、Y字迷路
- D) 注意機能・Prepulse Inhibition、潜在抑制試験、物体弁別
- E) 運動機能・Roter-rod test、Balance beam test
- F) 社会性行動・個体間相互作用の検討

胎生期高脂肪食負荷ラット・マウス脳の形態学的検討(担当:松崎、連携:山野)

上記の行動実験に用いたラット・マウス各10匹をペントバルビタール(50mg/kg)による深麻酔下に経心臓的に灌流固定して脳を採取し、下記の実験に供する。

A) 生化学的評価:視床下部におけるOX1/OX2 オレキシン受容体、線条体におけるD1 ドパミン受容体およびD2 ドパミン受容体の発現量をウェスタンブロット法により測定する。

B)形態学的評価:視床下部におけるオレキシン神経、線条体におけるドパミン神経の分布を、各神経のマーカー分子を標的とした In situ hybridization および免疫組織化学で評価する。

(2)平成26年度

胎生期高脂肪食負荷ラット・マウスの脳内遺伝子発現解析(担当:岩田、連携:秦)

高脂肪食負荷後24、48、72時間後および4週齢、8週齢、12週齢のラット・マウスの脳から mRNA を用時抽出する。これらの mRNA を用い、ラット・マウス用発現解析アレイ(SurePrint G3 Rat Gene Expression 8x60K および SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K)によって遺伝子発現の網羅的解析を行う。クラスタリング解析後、高脂肪食負荷ラット・マウスにおいて有意に変化する遺伝子を抽出し、定量的 real time PCR で確認する。このときメチル化酵素である DNA methyltransferase (DNMT) のサブタイプのほか発達障害と関連が指摘される遺伝子も検討の対象に加える。有意な変化がみられた遺伝子については、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法によって脳内のタンパク質発現を検討する。なお、内部標準(internal control)として β -actin もしく

は GAPDH を用いる。

胎生期高脂肪食負荷ラット・マウスの脳内遺伝子メチル化解析(担当:岩田、連携:秦)

1) DNA メチル化の網羅的解析

前年度同様に高脂肪食負荷後24、48、72時間後および4週齢、8週齢、12週齢の段階のラット・マウスの脳から genomic DNA (gDNA) を抽出する。網羅的なメチル化解析が可能なアジレント社 CpG Island Array Mouse CpG Island Microarray (105K フォーマット)または次世代シーケンサーを用いる。得られた結果を基に統計学的解析を行い、有意にメチル化が変化した遺伝子、特に遺伝子解析の結果と合致する遺伝子を抽出する。

2) Genomic DNA メチル化部位の特定

1)で得た結果を確認するため、またより詳細なメチル化部位を特定するために Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) 法を用いて gDNA のメチル化解析を行う。gDNA を Bisulfite 処理した後、対象遺伝子配列を PCR で増幅する。メチル化部位特異的制限酵素を用いて PCR 産物を切断する。これによりメチル化された DNA は断片化し、非メチル化 DNA は断片化しない。続いて、Agilent Bioanalyzer 2100 にてキャピラリー電気泳動を行うことで、断片長の違いによって異なるバンドを得、その比から DNA メチル化率を算出する。

3) 結果の比較・統合

以上の解析から、高脂肪食負荷により脳でメチル化異常が起こる遺伝子群を同定する。さらにその異常の継続される期間を明確にし、遺伝子の特性と組み合わせ発達障害の病態への関与を考察する。

4. 研究成果

初年度に ICR ラット・C57BL/6 マウスで胎生期高脂肪食群を作成し、12週齢の段階で45%脂肪 Test Diet 高脂肪食群と対照群(22%脂肪 Test Diet 基礎飼料)の社会行動、自発的移所行動量、薬物応答を比較検討したが、いずれの実験でも有意差が認められず、予備実験結果の再現はならなかった。

ついでテストバッテリーにて、8週齢の胎生期高脂肪食負荷マウスの行動を網羅的に解析したところ、活動性の増大傾向、プレパルス抑制の障害傾向は認められた。

そこで翌年度には、胎生期高脂肪食群の負荷を50%脂肪 Test Diet に変更して ICR ラット・C57BL/6 マウスによる胎生期高脂肪食群を作成し、8週齢の段階での社会行動、自発的移所行動量、薬物応答を対照群(22%脂肪 Test Diet 基礎飼料)と比較検討した。しかしどの実験でも有意差が認められなかった。ついでテストバッテリーにて、8週齢の胎生期高脂肪食負荷マウスの行動を網羅的に解析したが、こちらでも結果は同様で、有意差は見られなかった。このため、当初予定された行動実験以外の形態学的検討や遺伝子解析は行わず、実験計画を中止した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 秀夫 (Matsuzaki, Hideo)
福井大学・子どものこころの発達研究センター・教授
研究者番号：00334970

(2) 研究分担者

吉原 亨 (Yoshihara, Tohru)
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・助教
研究者番号：00401935

岩田 圭子 (Iwata, Keiko)
福井大学・子どものこころの発達研究センター・特命助教
研究者番号：30415088

出雲 信夫 (Izumo, Nobuo)
横浜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：70368976

(3) 連携研究者

秦 健一郎 (Hata, Kenichiro)
国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長
研究者番号：60360335

山野 真利子 (Yamano, Mariko)
大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・准教授
研究者番号：80192409