

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430098

研究課題名(和文) マウス胎児期低栄養により誘導される仔の発達障害様行動感受性遺伝子の探索

研究課題名(英文) Exploration of genes responsible to abnormal behavior of adult mouse caused by malnutrition in fetal life

研究代表者

古瀬 民生 (Furuse, Tamio)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・開発研究員

研究者番号：60392106

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)：妊娠期に母獣が低タンパク食を与えられたマウスの仔においては離乳後に行動表現型の変容がみられるとともに、脳において特徴的な遺伝子の発現パターンを示すことが明らかになった。発現量、メチル化に差の見られた中で機能的なアノテーションより行動表現型への関与が期待された遺伝子に関してKOマウスを作出して網羅的行動表現型解析を行った。その結果、恐怖条件付け記憶の若干の減弱、プレパルス抑制の減弱、社会行動の異常などを示すマウス系統が見受けられた。

研究成果の概要(英文)：Progenies that had been exposed to in utero protein restriction exhibited alteration of behavioral phenotypes, gene expression patterns, and genomic methylation patterns in the brain. We generated knockout (KO) mouse differentially expressed or methylated in the brain of the progenies of protein restricted group that are thought to be involved in developmental disorders. Behavioral phenotypes of the KO mice were analyzed comprehensively. In the analyses, the KO mice exhibited altered behavioral phenotypes relative to wild type such as deficit fear and short term memories, decrease of pre-pulse inhibition, suppressed social interaction.

研究分野：実験動物遺伝学

キーワード：胎児期栄養 マウス 行動 エピジェネティクス 発達障害

1. 研究開始当初の背景

胎児期における生育環境が成人した後の疾患感受性に影響を与えるという概念は成人病胎生期発症仮説 (Developmental Origins of Health and Disease: DOHaD) と呼ばれ近年注目されている。しかし、疫学調査による検証はヒトの遺伝的不均一性、生育環境を統御の困難さから、DOHaD の詳細な検証に必要な精度の高いデータを得る事は困難である。このためには、遺伝的背景の統一と環境の統御が容易な動物モデルを用いた実験系が必要となる(図1)。これに関してはすでにげっ歯類を用いた環境と遺伝子の分子レベルでのエピジェネティックな解析が存在する。しかし、胎児期に低栄養にさらされた動物がヒトの自閉症や注意欠如多動障害(AD/HD)といった発達障害や統合失調症などの精神疾患的な表現型の異常(行動異常)を起こすかどうかという検討は未だ行なわれていなかった。これに対し我々は、マウスの胎児期における栄養条件、特に低栄養が行動表現型に与える影響を、高度に統制された飼育条件、表現型解析プラットフォーム、発現アレイを用いて検討し、発達障害、精神疾患における DOHaD 仮説の検証を目指してきた。まず我々は、母体の妊娠時低体重モデルマウスを作製するため、妊娠前からマウスを低栄養状態で飼育し、その母仔に関して検討を行った。標準食としては、AIN93G を与え、低栄養状態は、母マウスに低タンパク食(標準より 1/4 に減じたもの(PR))を与えることにより作出した。母獣に関しては血液検査、体重測定を行い、新生仔に関しては、脳と肝臓を採取してマイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、離乳後には網羅的行動解析、マイクロアレイによる脳の網羅的発現解析を行った。ICR マウス(母獣)と C57BL/6J マウス(仔獣)を用いてこれまで行ってきた実験の結果、妊娠前の母獣の体重に関しては各群に有意な差は認められず、妊娠後に PR 群で有意な低下が見られた。妊娠前の血中タンパク質、血中脂質、血糖値などのパラメータに PR 群と通常食群との間に差がみられた。また、新生仔の体重に関しては PR 群において標準食群と比較して有意に低下しており、PR+FA 群は標準食と PR 群の中間的な値となった。また、成獣の脳の遺伝子発現に標準食-低タンパク食群で明瞭な差が見られた。さらに、離乳後の雄個体に関して行動表現型解析を行ったところ、低タンパク食で行動表現型の差異(物体探索、社会探索行動の減少)が認められた。

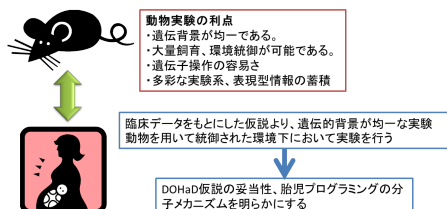


図1：マウスを用いた研究の利点と研究目的

2. 研究の目的

本研究においてはこれまでの研究結果を踏まえ、マウス胎児期低栄養により誘導された仔の発達障害様行動感受性遺伝子の探索を行うとともに、脳組織における異常を明らかにする(図2)。具体的には、下記の3点を明らかにする。

- (1) 胎児期低栄養暴露により脳組織で発現量に差の生じた遺伝子に関して変異マウスを作製し、発達障害モデルマウス評価に特化した行動表現解析系に供し、遺伝子機能を明らかにする。
- (2) 発達障害様行動を示した変異マウスに関してはより詳細な脳組織解析を行う。
- (3) これらのデータを統合し、マウス胎児期低栄養により誘導された仔の発達障害様行動の感受性遺伝子の探索を行うとともに、脳組織における機能異常を明らかにする。

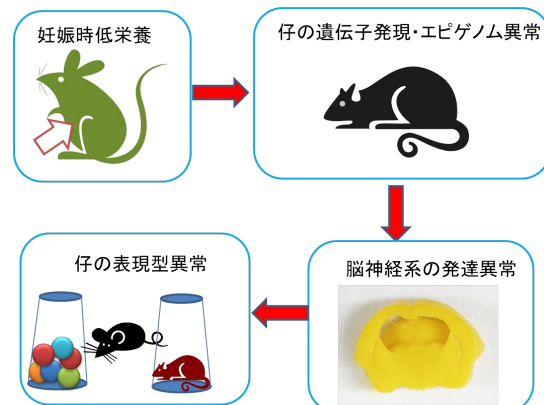


図2：胎児期低栄養により誘発された発達障害様行動の予測される発生機序

3. 研究の方法

妊娠時低栄養実験、表現型解析、発現解析はすでに行っている。本研究においては候補遺伝子の選定と変異マウスの作出、詳細な表現型解析を行う(図3)。

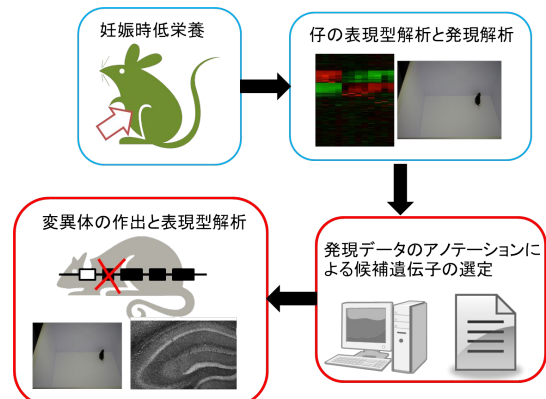


図3：本研究の流れ

(1) 胎児期低栄養暴露マウスの脳において特徴的な発現パターンを示した遺伝子群の機能アノテーション

これまでの我々の研究で、妊娠期に母獣が低タンパク食を与えられたマウスの仔は、離乳後に発達障害様の行動表現型とともに、脳において特徴的な遺伝子の発現パターンを示すことを明らかにしてきた(図1)。具体的には、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析において低タンパク食群は93の遺伝子の発現量が標準食群と比較して1/2以下に低下し、198の遺伝子の発現量が2倍増大した。これらの遺伝子をリスト化し、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)と呼ばれる発現アレイデータのアノテーション情報の解析データベースを用いて重要な遺伝子パスウェイの特定を行った。さらに、文献情報を精査し、そのパスウェイのカギとなる遺伝子を探索し、候補遺伝子とした。

(2) 変異マウスの導入と作出と表現型解析

上記の解析において重要と考えられる遺伝子に関して、既存のノックアウトマウス、もしくは新たにノックアウトマウスを作出する。既存の変異体の導入は理研バイオリソースセンターもしくは、Knockout mouse project (KOMP)(<https://www.komp.org/>)などの国際コンソーシアムより導入するか、現在急速に着目されつつあるCRISPRといったゲノム編集技術を用いて迅速に作出する。また、作出された変異体に関してはまず、理研マウスクリニック(http://www.brc.riken.jp/lab/jmc/mouse_clinic/)において網羅的表現型解析を行い、遺伝子の機能評価を行った。

(3) 変異マウスの詳細な行動解析

自閉症を含む発達障害モデルの評価として、J. Crawleyが提唱する自閉症モデル動物の3つの表面的妥当性(相互的な社会行動の異常・社会コミュニケーションの欠如・興味の限局)等を評価する。具体的にはそれぞれ、Crawleyの3チャンパー社会行動試験、超音波発声試験、常同行動もしくは固執行動の観察を軸に、多面的行動解析パイプラインを用いて発達障害モデルマウスとしての評価を行った。それぞれの試験は、マウスの発達に応じて適した時期に行う事とした(図4)。具体的には、上記の3つの実験の他、オープンフィールド試験、ホームケージ自発活動試験、明暗箱往來試験、恐怖条件付け学習試験、お懸垂試験、プレパルス抑制試験を行い、多面的に評価を行った。

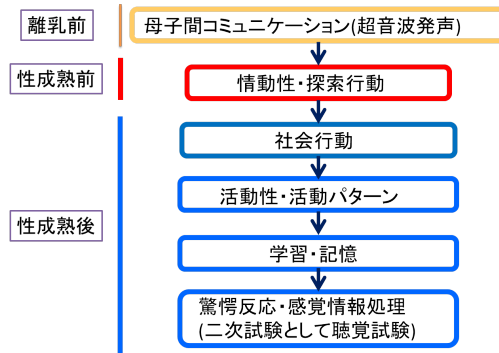


図4 マウスの発達段階に応じた行動実験

マウスの発達段階に適した実験系を構築する。離乳前は、母子間コミュニケーションに重要な新生仔の母子分離超音波発声を検討し、性成熟前に情動性、探索行動を検討する。性成熟に伴い、社会行動試験、学習・記憶試験、感覚処理試験を行った。

4. 研究成果

妊娠期に母獣が低タンパク食を与えられたマウスの仔においては離乳後に行動表現型の変容がみられるとともに、脳において特徴的な遺伝子の発現パターンを示すことが明らかになった。新生児の脳における遺伝子発現の変化に関して顕著な差は見られなかったが、成獣の脳の遺伝子発現とゲノムメチル化には標準食-低タンパク食群で明瞭な差が見られた。離乳後の雄個体に関して行動表現型解析を行ったところ、低タンパク食で行動表現型の差異(物体探索、社会探索行動の減少)が認められた。また、発現およびメチル化に変化の見られた遺伝子群に関して、データベースを用いた機能アノテーションを行ったところ、転写因子および、嗅覚関連遺伝子等に変化が見られた。そこで、これらの遺伝子群に含まれる中で、行動表現型に関与することが予測された *Rora*, *Ntrk2*, *Atxn2*, *Tgm3* の各遺伝子に関して KO マウスを作出した。これらの中で、*Rora*, *Ntrk2*, *Tgm3* に関しては網羅的表現型解析が終了した。その結果、*Rora* 遺伝子 KO マウスに関しては恐怖条件付け記憶の若干の減弱、*Ntrk2* KO マウスに関してはプレパルス抑制の減弱、*Tgm3* KO マウスに関しては、社会行動の異常が観察された(表1)。*Tgm3* KO マウスにおいて観察された社会行動の減少は低タンパク食群の産仔においても観察されており、当該遺伝子が胎児期低栄養により誘導される仔の発達障害様行動に関する感受性遺伝子の有力な候補の一つであることが示唆された。*Atxn2* KO マウスに関しては平成29年度中盤に行動解析が終了する予定である。

表1 候補遺伝子 KO マウスの表現型

行動	遺伝子名		
	<i>Rora</i>	<i>Ntrk2</i>	<i>Tgm3</i>
情動性	変化なし	変化なし	変化なし
社会行動	変化なし	変化なし	低下
学習・記憶	低下	変化なし	低下
プレパルス抑制	変化なし	減弱	変化なし

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 10 件)

Hirose M, Hasegawa A, Mochida K, Matoba S, Hatanaka Y, Inoue K, Goto, T, Kaneda H, Yamada I, Furuse T, Abe K, Uenoyama Y, Tsukamura H, Wakana S, Honda A, Ogura A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in wild-derived mice: generation of tamed wild-derived strains by mutation of the a (nonagouti) gene. *Scientific reports*. 【査読あり】 7, 42476. (2017). DOI: 10.1038/srep42476

Furuse T, Miyake K, Kohda T, Kaneda H, Hirasawa T, Yamada I, Kushida T, Kashimura M, Kobayashi K, Ishino F, Kubota T, Wakana S. Protein-restricted diet during pregnancy after insemination alters behavioral phenotypes of the progeny. *Genes & Nutrition*. 【査読あり】 12 (1). (2017). DOI: 10.1186/s12263-016-0550-2.

Ohba K, Takeda K, Furuse T, Suzuki T, Wakana S, Suzuki T, Yamamoto H, Shibahara S. Microphthalmia-associated transcription factor ensures the elongation of axons and dendrites in the mouse frontal cortex. *Genes to Cells*. 【査読あり】 21(12), 1365-1379. (2016). DOI: 10.1111/gtc.12450.

Yoshizaki K, Furuse T, Kimura R, Tucci V, Kaneda H, Wakana S, Osumi N. Paternal Aging Affects Behavior in Pax6 Mutant Mice: A Gene/Environment Interaction in Understanding Neurodevelopmental Disorders. *PLoS One*. 【査読あり】 11(11), e0166665 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166665>.

Yoshikawa F, Sato Y, Tohyama K, Akagi T, Furuse T, Sadakata T, Tanaka M, Shinoda Y, Hashikawa T, Itoharu S, Sano Y, Ghandour MS, Wakana S, Furuichi T. Mammalian-Specific Central Myelin Protein Opalin Is Redundant for Normal Myelination: Structural and Behavioral Assessments. *PLoS One*. 【査読あり】 11(11), e0166732. (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0166732.

Liu Y, Maekawa T, Yoshida K, Furuse T, Kaneda H, Wakana S, Ishii S. ATF7 ablation prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 【査読あり】 478(2), 696-702 (2016). DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.009.

Irie M, Yoshikawa M, Ono R, Iwafune H, Furuse T, Yamada I, Wakana S, Yamashita Y, Abe T, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Cognitive Function Related to the Sirh11/Zcchc16 Gene Acquired from an LTR Retrotransposon in Eutherians. *PLoS Genetics*. 【査読あり】 11(9), e1005521. (2015). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005521>.

Naruse M, Ono R, Irie M, Nakamura K, Furuse T, Hino T, Oda K, Kashimura M, Yamada I, Wakana S, Yokoyama M, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Sirh7/Ldoc1 knockout mice exhibit placental P4 overproduction and delayed parturition. *Development*. 【査読あり】 141(24), 4763-4771. (2014). DOI: 10.1242/dev.114520.

胎児期栄養は発達障害の環境要因となりうるのか-胎児期低栄養暴露マウスの網羅的行動表現型解析から得られた知見- 古瀬民生 日本衛生学会誌【査読なし】 *in Press*

マウス胎生期低栄養モデルを用いた DOHaD 仮説の検証 古瀬民生, 若菜 茂晴: 精神科【査読なし】 24(3), 335-339 (2014). <http://www.kahyo.com/item/SE201403-243>.

〔学会発表〕(計 13 件)

古瀬民生, 幸田尚, 三宅邦夫, 三浦 郁生, 串田知子, 山田郁子, 柏村実生, 金田秀貴, 小林喜美男, 石野史敏, 若菜茂晴「メチオニン関連遺伝子欠損マウスを母体とした仔の行動表現型解析」, 第 5 回日本 DOHaD 研究会 学術集会、国立成育医療研究センター、東京都世田谷区、2016 年 7 月 23-24 日

古瀬民生, 三宅邦夫, 幸田尚, 串田知子, 山田郁子, 柏村実生, 三浦 郁生, 金田秀貴, 小林 喜美男, 石野史敏, 若菜茂晴「One carbon metabolism 関連遺伝子欠損マウスを親に持つ野生型マウスの行動表現型解析」, 第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2016 年 7 月 20-22 日

古瀬民生, 三宅邦夫, 幸田尚, 三浦郁生, 串田知子, 山田郁子, 柏村実生, 金田秀貴, 小林喜美男, 石野史敏, 久保田健夫, 若菜茂晴「マウスモデルを用いた DOHaD 仮説の実証 5: 遺伝子欠損マウスを用いた母体低栄養モデルマウスの開発」, 第 63 回日本実験動物学会、ミューザ川崎、神奈川県川崎市、2016 年 5 月 18-20 日

古瀬民生「胎児期栄養は発達障害の環境要因となりうるのか - 胎児期低栄養暴露マウスの網羅的行動表現型解析から得られた知見」, 旭川市民文化会館、日本衛生学会シンポジウム、旭川市、2016 年 5 月 12 日

Furuse T, Kohda T, Miyake K, Hirasawa T, Kushida T, Yamada I, Kashimura M, Kaneda H, Kobayashi K, Ishino F, Kubota T, Wakana S. "Maternal malnutrition alters gene expression, genomic methylation and

behavioral phenotypes of progeny” 29th International Mammalian Genome Conference, Yokohama Port Opening Memorial Hall, Yokohama, Japan, November 8-11, 2015.

古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、平澤孝枝、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴「新規母体低栄養モデルマウス作出の試み」第4回日本DOHaD研究会 学術集会 2015年8月1日-8月2日 昭和大学旗の台キャンパス、東京都

古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、平澤孝枝、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴「DOHaDモデルマウスの開発と遺伝子発現・ゲノムメチル化解析」第38回日本神経科学大会、2015年7月28日-7月31日、神戸国際会議場・展示場、神戸市

古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、平澤孝枝、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴「新規母体低栄養モデルマウスの開発」第29回モロシヌス研究会 2015年7月3日、7月4日、かんばの宿有馬、神戸市

古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、平澤孝枝、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴「マウスモデルを用いたDOHaD仮説の実証4：新規母体低栄養モデルマウスの開発」第62回日本実験動物学会年会 2015年5月18日-5月20日、京都テルサ、京都市

古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、平澤孝枝、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴「マウスモデルを用いたDOHaD仮説の評価2：母体低栄養が産仔の脳組織遺伝子発現・ゲノムメチル化パターンに与える影響」2014年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム 2014年12月11日-12月13日、東京医科歯科大学・ホテル東京ガーデンパレス、東京都

古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、平澤孝枝、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴「マウスモデルを用いたDOHaD検証系の確立：仔の行動表現型、遺伝子発現、ゲノムメチル化に関する網羅的解析」第3回日本DOHaD研究会学術集会、2014年7月25-7月26日 国立療育医療研究センター、東京都

古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、平澤孝枝、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴「母体低栄養により誘導される行動異常関連遺伝子の探索」第28回モロシヌス研究会 2014年6月27日-6月28日、国立遺伝学研究所、静岡県三島市

古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴「マウスモデルを用いたDOHaD仮説の実証3：母体低栄養が仔の遺伝子発現、ゲノムメチル化に与え

る影響」第61回日本実験動物学会年会 2014年5月15日-5月17日 札幌コンベンションセンター、札幌市

〔その他〕
ホームページ等
<http://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古瀬 民生 (TAMIO FURUSE)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・開発研究員
研究者番号：60392106