

平成 22 年 9 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19700591

研究課題名（和文）脳神経系発生を中心とした脂質栄養改善に関する基礎的研究

研究課題名（英文）

研究代表者

山本 達朗（YAMAMOTO TATURO）

名寄市立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：90379389

研究成果の概要（和文）：n-3 系多価不飽和脂肪酸は、脳で重要な役割を果たしている。本研究では、n-3 系多価不飽和脂肪酸を欠乏した状態の母胎内の胎児から離乳時期まで個体の脳発達について、神経細胞新生や分化の観点から研究を行った。その結果、大脳皮質において、胎生期産生細胞の移動速度や、離乳期においていくつかの介在ニューロンの配置が対照群と異なることを見出した。これらの所見は、脳発達における脂質栄養の重要性を示している。

研究成果の概要（英文）：Fat is important to provide essential fatty acid. n-3 PUFAs are necessary for DHA biosynthesis in vivo. To understand the effect of maternal intake of n-3 PUFAs on brain development, we mated female rats fed an n-3 PUFAs deficient diet with males fed an n-3 PUFAs adequate diet, and made several morphological studies of the cerebral cortices of their offspring. Our data suggest that appropriate intake of n-3 PUFAs is important for brain development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：n-3 PUFAs、脂質栄養、大脳皮質、神経回路網、神経新生、グリア細胞新生

1. 研究開始当初の背景

脂質摂取には必須脂肪酸の供給という重要な役割があり、脂質は我々の健康的な生活にとって必要不可欠な栄養素の一つである。脂質を構成する脂肪酸の摂取量は、食生活の変動による影響を受けやすく、実

際に日本人の脂肪酸摂取量は、過去に比べると魚類や大豆を摂取する量が減少している。脂質は、脳神経系における機能を有している。n-3 系 PUFAs は、脳に豊富に存在し、細胞膜の構築などに重要な役割を果たしている。n-3 系 PUFAs 欠乏の脳に与え

る影響については、生後、特に成体期における研究が盛んに行われており、生後脳発達期における食餌性または代謝性の DHA の欠除は、成体期における認知障害などの精神疾患に関与していることが報告されている。しかし、これまで胎生期における n-3 系 PUFAs の重要性、つまり妊娠中の母親から供給される n-3 系 PUFAs の脳神経系発生における役割についてはあまり研究されていなかった。最近の研究において、妊娠中の母親から胎児に供給される母系食餌性 n-3 系 PUFAs の欠乏が、胎児の大脳皮質や海馬の層構造に大きな影響を与えることが形態学的観察より明らかとなったこのことは、脳神経系の発達にとって重要とされてきた遺伝的なプログラム以外にも脂肪酸という栄養学的な環境因子が脳神経系の正常な発達に重要であることを示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胎生期および新生仔期の脳発達における母系脂質栄養、特に n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3 系 PUFAs) の役割について形態学的手法や分子生物学的手法を用いて検討することである。これにより、母体から供給される脂質栄養の発達期脳内脂肪酸組成に与える変化が、脳構造形成に重要な神経細胞移動や神経回路網形成にどのような影響をもたらすのか、また n-3 系 PUFAs の脳神経系発達に影響する分子生物学的メカニズムについて解析することで、母系脂質栄養の発達期脳における役割および重要性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) n-3 系 PUFAs 欠乏ラットの作成 : n-3 系 PUFAs 欠乏飼料の作成に関しては、Coti Bertrand P et al. (2006)を参考とし、水素添加硬化ココナツ油とヒマワリ油を用いて n-6/n-3 比を調整し、n-3 系 PUFAs が欠乏状態の飼料を作成する。作成された飼料を 8 週齢の SD 系雌ラットに 2 週間給餌し、その後雄ラットと型通り交配を行う。プラグ確認日を胎生 0.5 日目とし、解析に適した日齢にて脳組織の採取等を行う。脳組織については用途に合わせてパラフィンまたは凍結切片用に包埋する。

(2) 脳構造の形態学的観察

①一般染色法を用いた細胞構築および髄鞘構築の観察 : パラフィン包埋サンプルについて連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、トルイジンブルー染色を用

いて脳構造全体の細胞構築を観察する。

②大脳皮質の層構造特異的神経回路網の解析 : 大脳新皮質は様々な種類の細胞により構成されている。大脳皮質第 VI 層ニューロンは視床、第 V 層ニューロンは脊髄、第 II/III 層のニューロンは反体側の大脳皮質の第 II/III 層に投射し、層特異的な神経回路を形成している。これらの標的部位に対して、逆行性トレーサーであるフルオロゴールドやカルボシアニン蛍光色素、ワサビ過酸化酵素 (HRP) などを注入することにより、n-3 系 PUFAs 欠乏脳の大脳皮質の層構造を逆行性に標識する。これによって、神経回路学的に標識する。

(3) 脳内脂肪酸組成の脳発生に伴う変化と関連遺伝子の発現解析 : 各日齢で採取された脳組織より、Folch 法を用いて脂質を抽出し、脂質を構成する脂肪酸組成について解析を行う。脳内に存在する主要な脂肪酸について、n-3 系 PUFAs 欠乏脳と対照脳との比較を行う。

(4) BrdU を用いたニューロン発生および新生機構の検討 : 膣栓確認後胎生 17.5 日目の n-3 系 PUFAs 欠乏動物および対照動物の母胎に BrdU を腹腔内投与し、48 時間後 (胎生 19.5 日目) に母胎より胎児を得て、パラフォルムアルデヒドにて固定後、切片を作成し BrdU 抗体を用いた免疫染色により、大脳皮質各層および海馬、小脳などを構成するニューロン群の birth date を明らかにする。また、成体期の n-3 系 PUFAs 欠乏動物と対照動物に対して BrdU を投与することにより、成体期でもニューロン新生が起こっている海馬や嗅球などのニューロン新生を観察し、成体期における n-3 系 PUFAs 欠乏がニューロン新生与える影響を検討する

4. 研究成果

(1) 本研究では、妊娠 2 週間前より n-3 PUFAs 欠乏食を摂取している。本研究の摂食期間を通じて、両食群間の体重には有意な差が現れなかった。このことは、摂取した食事のエネルギー量などが同等であり、n-3 PUFAs 欠乏食であっても胎児の個体発達には影響がないことを示している (図 1A)。また、胎生 19.5 日目の個体における、脳内脂肪酸組成について両群間で比較したところ、欠乏食群の脳における DHA の割合が、対照群に比べて有意に低く、それを補完するように DPA の割合が欠乏食群で高く、対照群で低い結果となった (図 1B)。これらの結果は、n-3 PUFAs 欠乏が、母胎には影響しないが、胎児脳に大きく影響していることを示唆している。

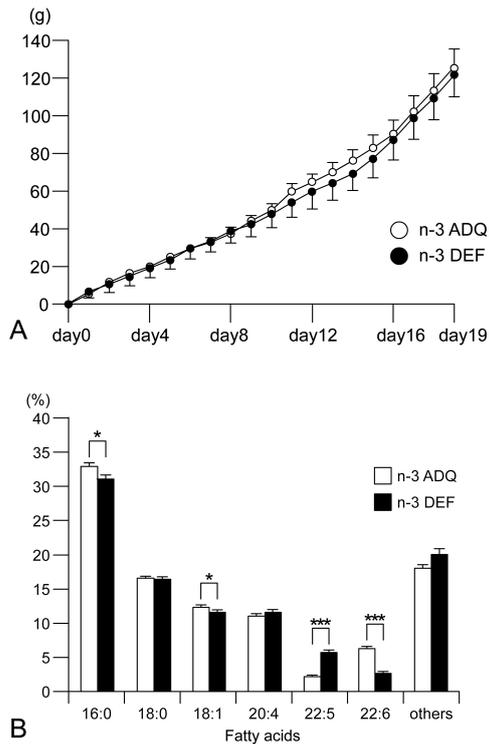


図 1: 妊娠時の母胎体重変化と胎生 19.5 日目の胎児脳内脂肪酸組成

(2) 胎生期の脳内では活発な細胞産生が起こっている。大脳皮質において産生された神経細胞やグリア細胞は、生まれた場所(脳室帯)から、自身の最終的に配置すべき場所へ移動する。本研究では、n-3 PUFAs 欠乏の胎児脳における、細胞移動の様子を BrdU を用いた Birth date labeling法により観察した。その結果、対照群において胎生 17.5 日目に生まれた細胞は、胎生 19.5 日目に大脳皮質の上位層に移動しているが、欠乏食群では下位層にとどまっていることが明らかとなった(図 2)。このことは、n-3 PUFAs 欠乏による脳内脂肪酸組成の変化が、新生された細胞の移動に影響を与えることを示している。

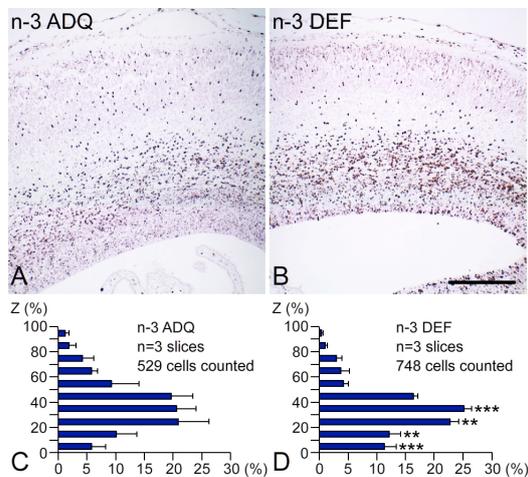


図 2: 欠乏食群では細胞移動速度が遅延する

(3) 胎生期の細胞移動の遅延が、生後の発達した脳の構造に及ぼしている影響を観察するために、生後 21 日目の大脳皮質の層構造を解析した。解析には、逆行性神経回路標識法を用い、生後 19 日の動物の腰髄に HRP を注入し、二日間の生存期間において脳内の大脳皮質第 V 層ニューロンの分布を検出した。その結果、大脳皮質第 V 層ニューロンの配置に関しては大きな違いが両群間に認められなかった。このことは、胎生期に認められた細胞移動遅延が投射ニューロンには影響していないことを示唆している。

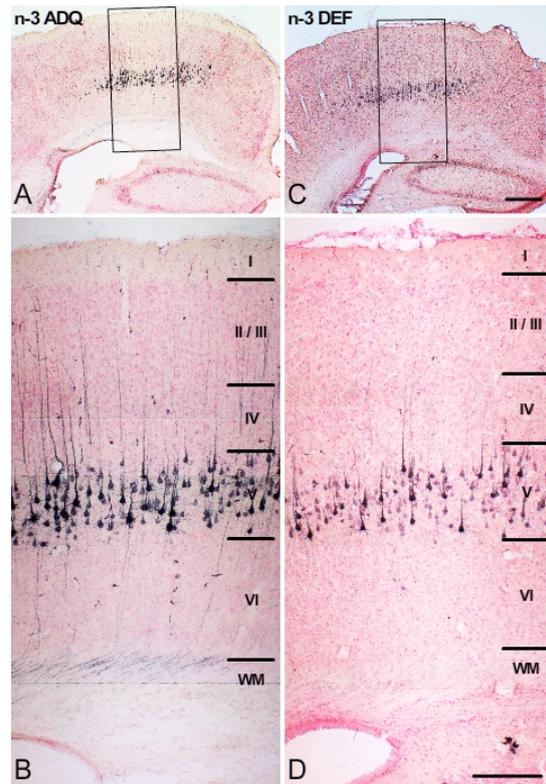


図 3: 離乳期の大脳皮質第 V 層ニューロンは正しく配置している

(4) 投射ニューロンである大脳皮質第 5 層ニューロンの配置は正しかったことから、他のニューロンの配置について検討するべく介在ニューロンのマーカーであるカルレチニンと G10 (抗リーリン抗体) を用いた免疫組織化学法を行った。その結果、カルレチニンと G10 の両方において、欠乏食群と対照群の間に介在ニューロンの配置の違いが認められた(図 4 と図 5)。このことは、脳内脂肪酸組成の変化が、介在ニューロンの最終的な配置に影響を与えていることを示している。また、投射ニューロンと介在ニューロンはその発生起源が異なり、移動経路が異なることから、脂肪酸の変動は介在ニューロンの接戦方向の移動様式に脳内の脂肪酸組成が重要な役割を果たしているのかもしれない。

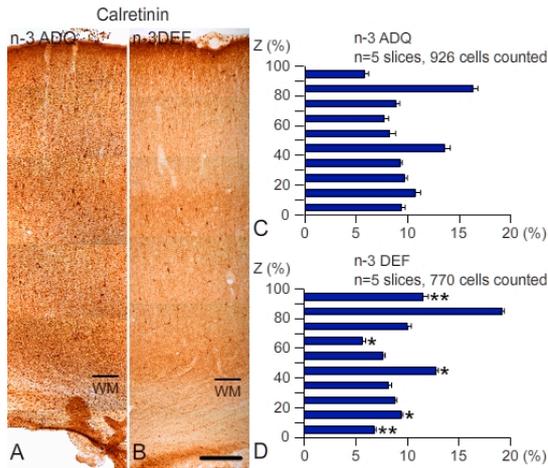


図 4：カルレチニン陽性細胞の脳皮質における分布

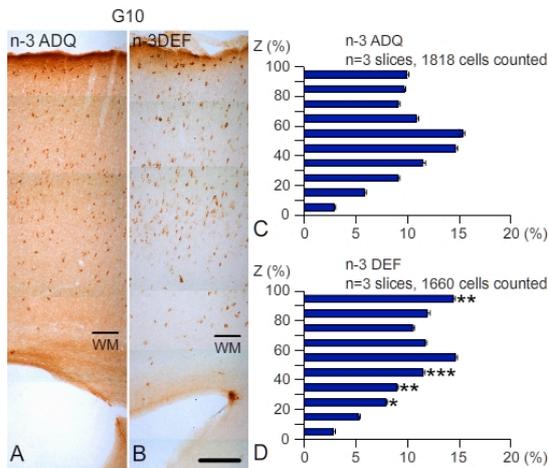


図 5：G10 (抗リーリン抗体) 陽性細胞の脳皮質における分布

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 1 件)

- ① Yamamoto T, Setsu T, Okuyama-Yamamoto A, Terashima T, Histological study in the brain of the *reelin/Dab1* compound mutant mouse. *Anatomical Science International*, 2009; 84(3): 200-209.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Yamamoto T, Nishimura N, Role of n-3 PUFAs in the brain development, 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2009) (Nagoya Congress Center, Aichi) (September 17, 2009)

[図書] (計 件)
[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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 達朗 (YAMAMOTO TATSURO)
名寄市立大学・保健福祉学部・助教
研究者番号：90379389

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：