

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292071

研究課題名(和文) 発達期低タンパク質栄養摂取による統合失調症関連行動異常誘発の分子基盤

研究課題名(英文) Early protein restriction impacts gene/protein expression and function in mature brain

研究代表者

古屋 茂樹 (FURUYA, Shigeki)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：00222274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、発達期の低タンパク質栄養が成熟期の脳機能変化を導く分子基盤の解明を目的とした。疫学研究からは発達期の栄養飢餓により成熟期に統合失調症等の精神疾患罹患リスクの増加が指摘されているが、関与する分子機序は明らかになっていない。本研究ではマウスをモデルに、妊娠期から授乳期の母体にタンパク質制限食を給餌することで生育させた次世代個体の成熟期における脳内分子機能変化について解析を行った。その結果、低タンパク質栄養状態に曝されることで、血液脳関門を構成する脳血管細胞の形質膜輸送体発現が変化し、前頭前野においては大規模な遺伝子発現変化を惹起し、それらの変化は顕著な性的二型性を呈す事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the molecular basis by which low protein nutrition during the developmental stage leads to alterations in brain function at adult stages. Epidemiological studies have indicated that severe protein-energy malnutrition during gestational and neonatal stages increases risk of acquiring various diseases including psychiatric diseases at mature stages, but the molecular mechanisms underlying changes in brain functions have barely been elucidated. In this study, we analyzed changes in molecular expression and function in the brain at adult stages of F1 generation individuals grown by feeding a protein-restricted diet to mothers during pregnancy to lactation. We found that exposure to the low protein nutritional state elicited altered expression of plasma membrane transporters in brain vascular cells constituting the blood brain barrier, and a large scale gene expression change in the prefrontal cortex, which exhibited remarkable sexual dimorphism.

研究分野：分子栄養学

キーワード：タンパク質栄養 発達期栄養 脳機能 精神疾患 遺伝子発現 血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

胎児期から新生児期にかけての母体を通じた栄養が正常から逸脱する状態（低栄養、過剰栄養）は、成熟期や次世代にまで慢性疾患発症に関わる機能変化を導くことが知られている。疫学研究を根拠に発達期の各種環境要因が成熟期の多様な疾患発症に影響するとの Barker により提唱された DOHaD (developmental origin of health and disease) 仮説は、疫学および実験的研究の両面から幅広く支持されている。これまでの実験的研究から、発達期の低タンパク質栄養状態が出生時低体重の原因となり、さらに成熟期の生活習慣病（高血圧、肥満、メタボリック症候群、II 型糖尿病）のリスク要因となることが報告されている。一方でやはり疫学研究より、妊娠期の飢餓経験による出生時低体重児が成熟期に統合失調症、注意欠陥多動性障害、うつ病などの精神疾患の罹患リスクを高めることが知られている。ラット・マウスの動物モデルを用いた研究から、妊娠・哺乳期母体に低タンパク質食を給餌すると、次世代個体が成獣期において自発行動の低下、不安行動、報酬行動、鬱様行動の増加、さらには統合失調症の行動表現型である感覚情報フィルター機能の低下など、精神疾患に関連する多くの行動異常を発症することが示されている。これらの低タンパク質食摂取実験では、出生児低体重となることが示されている。これらの実験動物モデルにおける症状より、発達期タンパク質不足の脳機能への深刻な影響が推定されるが、これまでに分子レベルでの解析は限定的であり、遺伝子およびタンパク質発現への影響と、それらを制御する上流の分子機序は不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、発達期の低タンパク質栄養摂取が成熟期の脳機能変化を導く分子基盤の解明を目指した。特に先行研究では全く解析されていない血液脳関門と大脳皮質前頭前野に着目した。その理由として、血液には末梢臓器での代謝変化が反映されるが、血液から脳内への（親水性）物質輸送は基本的に血液脳関門に発現する輸送体を介して行われること、さらに上記の飢餓で発症リスクが増加する精神疾患の多くで、ヒトの場合前頭前野の機能異常が報告されているからである。研究代表者は、母体を通じて妊娠直後から離乳までのタンパク質制限食（カゼイン含量が 10%、対照群は 20%）給餌を受けた次世代個体が、離乳後に正常食を給餌しても成熟期に雌性特異的に血中および脳内遊離アミノ酸の濃度が対照群に比べて増減することを見出し、血液脳関門での輸送体発現変化を予想した。また、神経機能に係る遺伝子発現についても制限群雌雄で異なる性的二型性を予備的に見いだしていた。そこで本研究課題においては、①血液脳関門輸送体発現、②神経機能関連分子とその発現・機能制御因子の

変化を基軸に性的二型性にも留意しつつ行動異常をもたらす分子基盤の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) タンパク質制限食給餌条件

制限群に給餌した飼料は AIN-93G 組成に従い、タンパク質であるカゼインを 20% から 10% に半減し、ショ糖を増やすことで等カロリーとしたものを自作した。対照群には通常の AIN-93G を給餌した。両群共に交配開始日からこれらの餌を給餌し、妊娠期から出生した F1 世代個体が生後 4 週齢に達して離乳するまで同じ餌で維持した。給餌に制限は設けず、自由摂取させた。摂食量については育児中の母体へのストレスを避けるため、妊娠期間中のみ測定した。F1 世代個体は 4 週齢での離乳の際に雌雄を分離し、その後は市販齧歯類用固形食を給餌した。生後 1 日、4 週齢、10 週齢で体重を測定した。脳重量についても生後 1 日と 10 週齢で測定を行った。他の解析については 10~11 週齢にて深麻酔下で採血と組織サンプルを採取し、実験・分析に供した。

(2) 血液脳関門のプロテオミクス解析

生後 10~11 週齢の F1 世代タンパク質制限群および対照群個体から、麻酔下で脳全体を取り出し、遠心により血液脳関門を構成する脳血管細胞を得た。マウス 1 個体から調製可能な脳血管細胞は量的に少ないため、6 個体をプールし、それを各群雌雄別に 4 組 (n=4) を既報に従い定量的標的プロテオミクス解析に供した (Hoshi et al, *J. Pharm Sci*, 2013)。雌雄それぞれについて対照群と制限群の間で発現量を比較した。

(3) マイクロアレイ解析

発達期の低タンパク質栄養状態が成熟期の脳内遺伝子発現に与える影響を網羅的遺伝子発現解析手法であるマイクロアレイを用いて検討した。F1 世代タンパク質制限群および対照群の雌性個体より大脳皮質前頭前野を切り出し、total RNA を抽出した。純度と品質（分解等）の確認後にそれらを鋳型に cDNA を合成し、さらに Cyanine3-ラベル化 cRNA を合成し精製後に、Agilent 社の SurePrint G3 Mouse GE (8×60K) マイクロアレイスライドと 65°C、10 rpm で 17 時間ハイブリダイゼーションさせた。洗浄後に SureScan マイクロアレイスキャナを用い、各プローブの蛍光強度を測定した。得られたデータは Agilent 社 Feature Extraction ソフトウェアにより数値化し、統計処理ソフト R を用いて quantile 法により正規化を行ない、対照群と制限群の間で有意な (p < 0.05) 発現差のある遺伝子を抽出した。

(4) 遺伝子発現および生化学解析

マイクロアレイ解析により抽出された発

現変動遺伝子を定量的リアルタイム PCR 法 (QRT-PCR) により、変化の再現性を確認した。F1 世代の脳血管細胞プロテオミクス解析により量的変化が同定された輸送体についても mRNA レベルの発現変動を QRT-PCR 法により行った。基本的にマイクロアレイおよびプロテオミクス解析に用いた個体とは異なる個体 (生物学的レプリケート) 脳から調製した大脳皮質および他領域の RNA を用いて行った。一部の遺伝子についてはウエスタンブロット法によるタンパク質レベルでの発現解析も行った。マイクロアレイ解析により抽出された発現変動遺伝子に機能的に関連する分子について QRT-PCR 法による mRNA 発現解析を行った。さらに血清中の遊離アミノ酸およびホルモン類の変化についてそれぞれ HPLC と ELISA で定量を行った。

(5) 母体栄養状態についての解析

タンパク質制限食を給餌している雌性マウスの栄養状態評価を目的に離乳後に血液と肝臓を採取し、遊離アミノ酸および低栄養状態の指標となる遺伝子の発現レベルを検討した。

4. 研究成果

(1) 脳血管細胞輸送体発現解析

タンパク質制限群および対照群雌雄 F1 世代個体脳から脳血管細胞を調製し、定量的標的プロテオミクス解析に供した。その結果、当初血中および脳内アミノ酸濃度から予想していたアミノ酸輸送体は雌雄の制限群において対照群と比べていずれも発現量に有意な変化は認められなかった。一方で雌性制限群において特異的かつ有意な量的変化 ($p < 0.05$) を呈す輸送体 2 種を同定した。これらは、1) エネルギー代謝調節作用を持つ甲状腺ホルモンを基質とする輸送体 A、2) 核酸アナログ抗がん剤や数の細胞内代謝物とを基質とする ATP-結合カセットを持つ薬物輸送体 B、であった。その他にモノカルボン酸輸送体 C、薬物輸送体 D、密着結合を構成する分子 E の計 4 分子種が変化傾向を示していた ($p < 0.1$)。雄性個体では対照群と制限群の間において、これら 4 種の輸送体を含む同定された全ての輸送体に量的変化は認められなかった。以上の結果は、発達期タンパク質制限が雌性特異的に成熟期の脳血管細胞の輸送体発現変化を惹起することを示す。ヒト統合失調症患者ではで血中の甲状腺ホルモン濃度が変化している例が報告されており、甲状腺機能の変化 (亢進、減弱) は精神疾患様症状を誘発することも知られている。そのため、本解析結果を基に、発達期タンパク質制限群における脳内甲状腺ホルモン機能変化に焦点を当てた解析を行った (下記 (2) 項参照)。

(2) 脳内甲状腺ホルモン情報伝達系解析

上記項目 (1) より、甲状腺ホルモンを基

質とする輸送体 A の発現が雌性制限群 F1 世代個体大脳において有意に増加していたことに着目した。輸送体 A の KO マウスでは、核内受容体である甲状腺ホルモン受容体の標的遺伝子発現が大幅に低下することから、脳内甲状腺ホルモンシグナル伝達不全を呈す。そのため、発達期タンパク質制限による雌性特異的な輸送体 A の発現増加から、脳内での同シグナルの亢進を予想した。甲状腺ホルモン受容体の標的である 4 遺伝子について制限群と対照群の大脳前頭前野で発現レベルを QRT-PCR 法により比較した。その結果、予想外なことに 4 遺伝子についていずれも雌性制限群での発現が対照群に比べ有意かつ顕著に低下していることを見いだした。これらの変化は雄性制限群には観察されなかった。さらに、それらの甲状腺ホルモン標的遺伝子中で、神経伝達物質受容体の下流において細胞内情報伝達を制御する分子 F については、精神疾患を含む複数のヒト脳神経疾患において遺伝子変異や量的変化が報告されているため、タンパク質の発現解析も行った。ウエスタンブロット解析からは、mRNA 同様にタンパク質レベルでも発現量の有意な低下を確認した。以上より、雌性制限群特異的な脳内甲状腺ホルモン情報伝達の減弱を今回新たに見いだした。以上の (1)、(2) の成果については現在原著論文を作成中である。

(3) 網羅的遺伝子発現解析

本項目では、発達期タンパク質制限の脳内遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイにより全ゲノムスケールで、大脳皮質前頭前野を解析対象に行った。その結果、雌性制限群 F1 世代個体脳では対照群と比べ約 4000 遺伝子に及ぶ有意な発現変化が起こっていることを見いだした。これらの遺伝子は多様な GO カテゴリーに属しているが、神経機能に直接関わる受容体、情報伝達分子や神経栄養因子等の約 100 遺伝子も含まれていた。既に神経栄養因子類は、マイクロアレイ解析に着手する前に、定量的 RT-PCR 法にて雌性制限群での発現変化を見いだしていた。再現性が確認できたことから、今回のマイクロアレイ解析の妥当性が示されていると考えている。さらに注目すべき遺伝子変化として、神経活動の指標となる最初期遺伝子についても、複数の遺伝子の発現変化を見いだした。

これらのマイクロアレイ解析結果を、雌雄 F1 世代の制限群と対照群について異なる生物学的レプリケートサンプル RNA を用いて定量的 RT-PCR を行うことで、再現性の確認を行った。その結果、遺伝子発現変化について、①雌雄共通の変化、②雌性特異的な変化、③雄性特異的な変化、に大別することができた。本研究課題では、雌性制限群 F1 世代におけるアミノ酸代謝恒常性の変化、感覚情報ファイル機能変化、上記脳血管細胞での輸送発現変化から、②に属する遺伝子についてさらに解析を進め、糖代謝系を制御する情報

伝達系分子をコードする複数の遺伝子の有意な発現増加を確認した。この経路の変化は、様々な精神疾患で報告されているため、タンパク質レベルでの解析も行った。同経路の鍵分子であるキナーゼXの活性化状態についてリン酸化を指標に調べたところ、意外なことに遺伝子発現とは逆に同経路の活性低下を示すリン酸化レベルの変化を確認した。このキナーゼXは、ヒト統合失調症患者死後脳での発現変化が報告されている。その基質タンパク質についてもリン酸化レベルが減少していた。QRT-PCR解析による同経路構成分子の遺伝子発現増加は、活性レベル低下を解消するための適応的応答と考えられた。本解析から、雌性制限群F1世代大脳皮質において糖代謝制御に係る情報伝達経路の活性低下を明らかにしたが、その変化に寄与する上流の責任分子については不明のままである。そのため、マイクロアレイ結果および文献情報から上記表現型に関与し得る上流因子候補を選択し、現在解析を行っている。

(4) 生化学的解析

本研究申請時に、予備的な検討結果として雌性制限群F1個体において、血中エストロゲン濃度の低下を見だしていた。しかしこの解析は雌性個体の性周期を揃えていなかったため、正確な変化を反映していない可能性があった。そこで発情間期に採血したサンプルで再測定を行った。その結果からは制限群と対照群のエストロゲン濃度に有意な差は認められなかった。また、卵巣での分子発現と形態について解析を行ったが、エストロゲン産生に関わる酵素類のmRNA発現レベルや卵巣の内部形態に顕著な変化は認められなかった。一方で血中アミノ酸については雌性制限群での増加を見だしていたが、別サンプルでも複数のアミノ酸について濃度の増加を確認した。

(5) 母体および新生児解析

妊娠雌マウスの栄養状態と血液生理生化学検査および肝臓での遺伝子発現変化についての解析を行った。まず栄養状態の指標となる血中アルブミン濃度、総タンパク質濃度、アルブミンアミノ酸の変化を検討したが、いずれにおいても制限群と対照群に有意な違いは認められず、タンパク質制限食の摂取は母体の栄養状態を悪化させていないと判断された。タンパク質制限食はショ糖を増やしてAIN-93Gと等カロリーにしているが、血糖値と耐糖能についても違いが認められなかった。一方で肝臓の遺伝子発現については栄養状態で発現が制御される一部の遺伝子について制限群でのmRNAの量的変化をQRT-PCRにより見いだした。この結果はタンパク質制限食の摂取が母体の末梢臓器には栄養状態の変化を介して何らかの影響を及ぼしていることを示唆しているが、その詳細は現在も解析を行っている。

続いて母体を通じてタンパク質制限食によって生育したF1世代における子宮内発達不全の有無を検討した。出生後1日目の体重は制限群において雌雄ともに対照群に比べ有意な低値を示した。同時に脳重量も有意に制限群において対照群より低値であり、これらはいずれも制限群F1世代個体の子宮内発達不全を反映した結果と考えられた。4週齢における体重も制限群で有意に低値であり、タンパク質制限食給餌の影響と判断された。制限群F1世代は雌雄共に10~11週齢において体重および脳重量に対照群との有意差は観察されないため、離乳後の通常食摂取より以後の成長が加速されたものと推定される。以上の結果より、今回妊娠期から授乳期にかけて雌マウスに与えている摂餌条件では、F1世代に子宮内発達不全をもたらすことが明らかとなり、脳重量も低値であることから発達期中枢神経系における分子発現と機能、さらに形態レベルでの変化が惹起されている可能性が示された。

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 11件)

- ① 古屋 茂樹: 発達期タンパク質栄養不全による脳高次機能障害の分子基盤, 第99回日本栄養・食糧学会 関東支部会 シンポジウム「栄養とメンタルヘルス~栄養と心の健康のかかわり~」, 2017年3月4日, 明治大学駿河台キャンパス, 千代田区
- ② 日比 亜佑実, 今井 明香, 中畑 亜加音, 市瀬 嵩志, 田代 康介, 古屋 茂樹, 日本アミノ酸学会 10周年記念大会, 2016年9月13日, 東京大学伊藤国際学術研究センター, 文京区
- ③ 最上 侑佑盛, 中畑 亜加音, 佐藤 和貴, 立川 正憲, 古屋 茂樹, 日本アミノ酸学会 10周年記念大会, 2016年9月13日, 東京大学伊藤国際学術研究センター, 文京区
- ④ 最上 侑佑盛, 中畑 亜加音, 今井 明香, 市瀬 嵩志, 田代 康介, 古屋 茂樹, 第53回化学関連支部合同九州大会, 2016年7月2日, 北九州国際会議場, 北九州市
- ⑤ 日比 亜佑実, 今井 明香, 中畑 亜加音, 毛利 紳哉, 市瀬 嵩志, 田代 康介, 古屋 茂樹, 第53回化学関連支部合同九州大会, 2016年7月2日, 北九州国際会議場, 北九州市
- ⑥ 古屋 茂樹: 発達期低タンパク質栄養による高次機能障害とその分子基盤, シンポジウム SY20「ライフステージに応じたタンパク質/アミノ酸栄養が支える脳機能」, 第70回日本栄養・食糧学会大会, 2016年5

- 月 15 日, 武庫川女子大学, 西宮市
- ⑦ 今井 明香, 日比 亜佑実, 最上 侑佑盛, 中畑 亜加音, 市瀬 嵩志, 安尾 しのぶ, 田代 康介, 古屋 茂樹, 第 70 回日本栄養・食糧学会大会, 2016 年 5 月 14 日, 武庫川女子大学, 西宮市
- ⑧ 今井 明香, 中畑 亜加音, 市瀬 嵩志, 田代 康介, 古屋 茂樹, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 29 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌市
- ⑨ 今井 明香, 中畑 亜加音, 市瀬 嵩志, 田代 康介, 古屋 茂樹, 日本アミノ酸学会第 9 回学術大会, 2015 年 10 月 24 日, 滋賀県立大学, 彦根市
- ⑩ 市瀬 嵩志, 中畑 亜加音, 小河 匡, 清水 泰博, 河原林 裕, 古屋 茂樹, 第 51 回化学関連支部合同九州大会, 2014 年 6 月 28 日, 北九州国際会議場, 北九州市
- ⑪ 市瀬 嵩志, 中畑 亜加音, 小河 匡, 清水 泰博, 安尾 しのぶ, 河原林 裕, 古屋 茂樹, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 5 月 31 日, 酪農学園大学, 江別市

[図書] (計 0 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

<http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/~kinou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 茂樹 (FURUYA, Shigeki)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 00222274

(2) 研究分担者

立川 正憲 (TACHIKAWA, Masanori)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 00401810

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()