

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09997

研究課題名(和文)母体低栄養がエピジェネティックに大脳皮質構築に与える影響に関する研究

研究課題名(英文)Effects of calorie restriction in utero on cerebral cortical histogenesis

研究代表者

三橋 隆行(MITSUHASHI, TAKAYUKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80338110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、母体低栄養と生後大脳皮質機能異常について投射神経細胞数と神経幹細胞の分裂動態解析を糸口に明らかにし、生後精神疾患発症との関連性について研究を展開することを目標とした。胎生1日目より母体栄養摂取量を制限すると胎生11日時点で胎児が確認できなかったことから、大脳皮質内の投射神経細胞が産生される胎生11日より母体の栄養摂取量を制限し実験を継続した。低栄養曝露群においては、胎生14日目の神経幹細胞の細胞周期長の変動を認めるも分化誘導の確率には変動を認めなかった。低栄養状態に曝露された生後8週以降の雄マウスの行動特性を解析し、一部の行動解析に異常の傾向は認められたが有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的特色は、神経幹細胞の細胞周期調節機構と大脳皮質形成過程を胎児生体内において解析する点である。これら解析方法は煩雑で時間がかかる点が欠点であるが、培養細胞などと比較しより正常に近い状態で解析が行える点で重要な知見が得られる可能性が高い。また胎内低栄養が投射神経細胞数の産生に与える影響を解析することは、生後精神疾患の病態解明に極めて重要な意義を持つと考える。さらに、胎内低栄養と精神疾患との関連性に基づき、妊娠の際に適切な栄養摂取の重要性を啓発することは喫緊の社会医学的課題と考えられ、本研究テーマの継続により極めて重要な医学的知見を社会に還元可能と考える。

研究成果の概要(英文)：We are focusing our research on the epigenetic mechanism underlying cerebral cortical histogenesis. In this analyses, we evaluated the effects of calorie restriction in utero on cerebral cortical histogenesis. We analyzed cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells on embryonic day (E) 14, where mothers were exposed to low calories started from E11. We found that the length of cell cycle was elongated in calorie-restricted group compared to that of controls. However, the probability of leaving cell cycle was not affected in calorie-restricted group. In addition, when we analyzed behaviors of postnatal 8 week-old male mice that were exposed to calorie restriction, we could not detect significant differences compared to that of the control mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経発生 神経幹細胞 細胞周期 精神疾患

## 1. 研究開始当初の背景

高次脳機能の中核である大脳皮質は、胎児側脳室周囲にある神経幹細胞より神経細胞やグリア細胞を産生することで形作られる。大脳皮質の機能不全は発達障害や精神疾患の原因となりうるが、ヒトに実施可能な検査 (MRI・脳波等) では異常を検出できない症例が圧倒的に多い。さらに近年の報告から、単一遺伝子の機能異常のみでこれら疾患の発症理由を説明することは困難である点が明らかとなっている。つまり、複数の遺伝子異常の組み合わせや、胎内環境 (栄養・感染等) の異常が病態発現に与える影響を解析する重要性が高まっている。特に日本においては、過去 30 年にわたり母体・出生児の体重がともに減少していることが判明しており、先進国の中でも特異な傾向を示している (保健医療科学 2014)。この傾向を生じている原因が生物学的要因なのか環境要因なのかについては諸説あり結論が出ていないが、昨今の社会文化的影響 (やせ型体型を好む) が関与していると考えられる研究者が多い。

低出生体重が生後のヒト小児・成人に与える影響については、メタボリック症候群や腎臓ネフロン数の減少に伴う高血圧の発症リスクを増加させる点が明らかになり、developmental origins of health and disease 仮説として知られている (Science 2004)。しかし中枢神経系、特に大脳皮質機能に与える影響については、二つのヒト集団研究、すなわち i) 第二次世界大戦中にドイツ軍に占領されたオランダで発生した飢饉下で出生した児の統合失調症発症率が高く、かつ高齢時の認知力低下が促進される現象や (Arch Gen Psychiatry 1996, PNAS 2010)、ii) 1960 年前後に中国で発生した飢饉において出生した児の統合失調症発症率が高率であった (JAMA 2005) といった報告により、胎内低栄養曝露と生後精神疾患との関連性が示唆されているが、その背景メカニズムの詳細は不明である。

一方動物実験においては、生後ラットへの母乳投与量を制限することで神経細胞数の概算数や各神経細胞の形態を検討した結果によると、低栄養状態に曝されたラットでは脳が小さくなり、かつ出生後のトリチウム標識チミジンの取り込み細胞数が減少すると報告されている。しかし、生後ではなく胎内の低栄養状態が生後大脳皮質機能にどのような影響を与えるかについてはこれまで十分に解析されていない。その原因として神経細胞産生過程の詳細が定量解析されていないためと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、母体低栄養と生後大脳皮質機能異常について、皮質内投射神経細胞数と神経幹細胞の分裂動態の解析を糸口に明らかにし、生後精神疾患発症との関連性について研究を展開することを目標とした。具体的には、i) 胎児神経幹細胞の細胞周期長の解析、ii) 胎児神経幹細胞の分化誘導の確率の解析、iii) 生後マウスの大脳皮質内の投射神経細胞数と大脳皮質構築に与える影響の解析、iv) 生後マウスの行動解析を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 胎内低栄養状態を作成するにあたっての投与カロリー量の検討

妊娠マウス (CD-1) に必要な栄養素のバランスを保ったうえで、胎生 1 日目より必要カロリーの 70%、50% 投与群を設定し、胎児数、出生数、新生児の体重・頭殿長を計測し、以後の実験に供した。

### (2) 胎内低栄養状態が神経幹細胞の分裂・分化誘導に及ぼす影響についての解析

BrdU を用いた Cumulative Labeling 法による細胞周期各相の測定

妊娠 12-14 日目の母マウスに、午前 9 時から S 期特異的マーカーである BrdU を 3 時間おきに

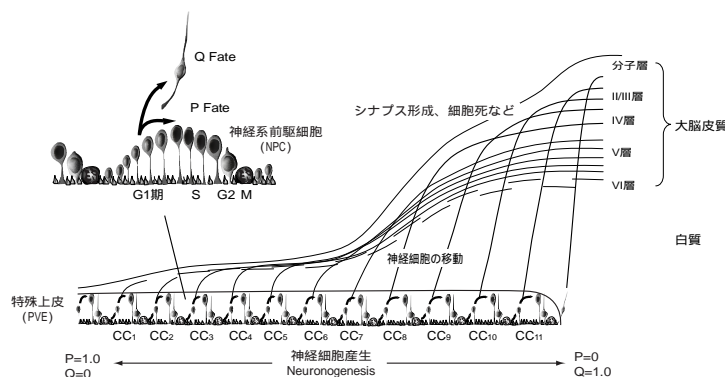


図1 大脳皮質の発生過程

大脳皮質を形成する神経幹細胞はマウスにおいて計 11 回分裂し、分裂回数前半の細胞は皮質深層に、後半の細胞は皮質表層に移動する。分化誘導の確率 Q 値は発生過程が進むにつれて 0 から 1 に増加する。

腹腔内投与した。胎児前脳を摘出、4%フォルマリンで固定後パラフィン包埋した。厚さ4 μmの冠状断切片を作成し、BrdU抗体を用いた免疫組織化学的染色後、神経幹細胞のうちBrdU陽性細胞の割合 (Labeling Index, LI) をBrdU曝露2、4、8、12、15、18時間後に計測した。LIの上昇率から神経幹細胞の細胞周期各相の長さを胎児前脳において計算した。

#### 2時間コホート法によるQ値 (娘細胞が分化を開始する確率) の測定

妊娠12-14日目に神経幹細胞を以下の方法で標識した: S期特異的マーカーであるIdUおよびBrdUを2時間の時間差をもって腹注し、その後、BrdUを連続投与する群と、BrdUの追加投与を行わない群に分けた。2時間の間にS期を終了した幹細胞群がIdUのみで標識され、この細胞群を2時間コホートとした。BrdU連続投与群と単回投与群との間の2時間コホート細胞数の比からQ値を算出した。具体的には、胎仔頭部をフォルマリン固定後、パラフィン包埋し、4 μmの連続切片を作製後、IdUおよびBrdUに対する二重免疫組織染色 (anti-IdU/BrdU [Becton Dickinson], anti-BrdU [AbD Serotec]) を行った。IdU陽性細胞の数、分布パターンを共焦点レーザー顕微鏡で測定し、各胎生日のQ値を計算した。

#### 出生後21日における2時間コホートの脳皮質内分布

胎生14日に、IdUおよびBrdUを2時間の時間差をもって腹注し、BrdUをさらに13時間投与した。出生21日目の仔マウス脳を4%PF固定後、IdUおよびBrdUに対する二重免疫組織染色を行った。以上よりIdUと初回BrdU投与の間の2時間に分化を開始した細胞群 (2時間コホート) を、IdUのみで標識された細胞として脳皮質内に同定した。

#### (3) 胎内低栄養状態で出生したマウスの行動解析

統合失調症モデルマウスを解析する際コンセンサスが得られている実験方法として、陽性症状についてはプレパルス・インヒビション、陰性症状には社会性行動解析、認知障害についてはワーキングメモリの解析として i) 3チャンバー実験、ii) 24時間行動監視方法が挙げられる。これらの行動解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 胎内低栄養状態を作成するにあたっての投与カロリー量の検討

胎生1日目より母体栄養摂取量を通常摂取量の60%に制限すると、胎生11日時点で胎児が確認できない点が明らかになったことから、脳皮質内の投射神経細胞が産生される胎生11日より母体栄養摂取量を60%に制限した結果、通常通り出産することを確認した。

#### (2) 胎内低栄養状態が神経幹細胞の分裂・分化誘導に及ぼす影響についての解析

低栄養曝露群においては、胎生14日目の神経幹細胞の細胞周期長の変動を認めるも分化誘導の確率には変動がない点が明らかになった。さらに、低栄養状態が長時間になるほど分裂期の神経幹細胞においてオートファジーマーカーであるLC3の発現量が増加する点を明らかにした。

#### (3) 胎内低栄養状態で出生したマウスの行動解析

低栄養状態に胎内曝露後出産させ、生後8週以降の雄マウスの行動特性を解析し、一部の行動解析に異常の傾向は認められたが、有意差を認めなかった。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文] (計1件)

Shibata S, Iseda T, Mitsuhashi T, Oka A, Otsubo S, Shindo T, Nagai T, Inoue T, Sasaki E, Takahashi T, Schalek R, Lichtman JW, Okano H.  
Large area fluorescence and electron microscopic correlative analysis with multi-beam scanning electron microscopy.  
Frontiers in Neural Circuit, in press. (査読有)

#### [学会発表] (計1件)

Iseda T, Shibata S, Mitsuhashi T, Otsubo S, Shindo T, Takahashi T, Okano H.  
LA-CLEM: novel procedure for Large Area Correlative Light and Electron Microscopy analysis with multi-beam scanning electron microscopy.  
第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 合同年会、2018年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：高橋 孝雄

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Takao

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 80171495

研究分担者氏名：久保 健一郎

ローマ字氏名：KUBO, Kenichiro

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20348791

研究分担者氏名：芝田 晋介

ローマ字氏名：SHIBATA, Shinsuke

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 70407089

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。