

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月3日現在

機関番号：82718

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12734

研究課題名（和文）孤独ストレスによる脳トランスクリプトーム失調とその食品三次機能成分による予防

研究課題名（英文）Effect on brain transcriptome by the isolation stress via housing condition, and prevention by functional food

研究代表者

嶋田 耕育（SHIMADA, KOUSUKE）

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・食品機能性評価グループ・研究員（任期有）

研究者番号：50634185

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）：本研究では孤独条件に起因する負荷（以下、孤独ストレス）が脳機能行動また、脳及び各末梢臓器での遺伝子発現への影響を明らかにし、さらには孤独ストレスを予防する食品機能性成分の探索を目的とした。我々は短期間の孤立飼育マウスを用いて、対照群である群飼育と比較し孤立飼育マウスが脳内遺伝子発現変化を伴って脳機能行動に影響することを見出した。得られた孤立飼育による表現型を孤立ストレスによる指標とし、脳機能に対して効果が期待される食品機能性成分の投与を実施した。結果、食品機能性成分の投与によって孤立飼育による脳機能行動変化が緩和されることを認め孤独ストレスに対して予防効果をもつ食品機能性成分を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で我々は増えつつある若年期での鬱や統合失調症を誘起する要因の1つと考えられている孤独ストレスに対してその病態に至る過程の一端を明らかにし、さらには食品機能性成分による予防の可能性についても検討した。短期間の孤立飼育マウスを用いて、孤独ストレスが脳内遺伝子発現変化を伴い脳機能行動にも影響することを見出した。さらには脳機能に対して効果が期待される食品機能性成分の投与によって孤立飼育がもたらす行動変容を阻害する可能性を示し、食品機能性成分による孤独ストレスへの予防効果を示唆した。さらなる検証を重ねることで孤独ストレス予防効果を有する食品機能性成分の探索が可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed at revealing the influence of brain behavior function, gene expression of brain and peripheral tissues on stress load which are evoked by isolation condition. Additionally, we tried to investigate searching of functional food ingredients which prevents isolation stress. Using short-term single housing mice, we revealed that the isolation stress influenced brain function with a gene expression change in brain region as compared with group housing mice. Subsequently, we tried administration of functional food ingredients that effective effects are expected for a brain function. As a result, we found functional food ingredients which mitigate a brain function behavior which changed by the isolation single housing condition. Thus we suggested a possibility that functional food ingredients mitigate brain function which changed by stress load.

研究分野：食品科学

キーワード：孤立飼育 脳機能 トランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精神的ストレスは鬱や統合失調症などの精神疾患の危険因子である。特に孤独は他個体からの感覚入力などの取り巻く環境を大きく変化させ、記憶力や免疫力の低下を引き起こすと考えられている。一方、食品と精神的ストレスは摂食行動を介して密接に関係している。例えば、過食は一次機能を担う栄養成分の摂取による代償的な作用を持つ。二次機能を担う匂いや味成分もストレスを軽減する。実際我々は、柑橘香を持つリナロールがストレスを軽減し、視床下部のトランスクリプトームを変化させることを明らかにしている。三次機能成分については、病態下の神経を保護する観点からの研究が多く、アミロイドの神経毒性に対するトランスレサトロールの抑制効果などが報告されている。しかしながら病態への移行を予防する観点からの研究は少ない。

これまでに我々は、若年期の健常マウスへの低用量の食品ポリフェノール類の投与が、大脳皮質の遺伝子発現や脳機能行動に影響することを見出している(図1)。以上のことから我々は、病態には至らない弱いストレス条件下で、三次機能成分が脳機能を改善しうるのではないかと発想した。

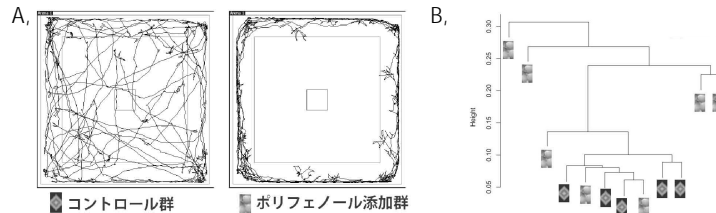


図1 ポリフェノール摂取が行動(A)と大脳半球トランスクリプトーム(B)に与える影響。

以上のことから我々は、病態には至らない弱いストレス条件下で、三次機能成分が脳機能を改善しうるのではないかと発想した。

2. 研究の目的

若年-青年の精神疾患として鬱や統合失調症が増えつつある。このような病態に至る要因の一つに、孤独ストレスへの暴露と低耐性が挙げられる。鬱や統合失調症に対する薬物治療はなされているが、その予防に関する研究や孤独ストレス軽減についての知見は少ない。その理由として、孤独ストレスが脳内の恒常性を失調させる過程が十分に理解されていないことがある。過去の研究では、齧歯類に孤独ストレスを離乳期前からあるいは長期に与えるモデルが多く、成熟後の軽度な孤独ストレスによる脳のオミカルな変化を解析した例は無い。本研究では短期間の孤立飼育による孤独ストレスを負荷し、軽度の孤独ストレスによる脳機能行動への影響及び脳機能部位のトランスクリプトームを比較解析し、相互の協調や入・出力関係を明らかにすることで食による孤独ストレス軽減のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

孤独ストレスに起因する行動学的表現型の解析

生後6週齢のC57BL6/N雄性マウスを用い、孤立飼育群(n=1で飼育)と群飼育群(n=5で飼育)の2群を設定し2週間飼育を継続した。餌及び水は両群で自由摂取とし、体重及び摂餌量測定は隔日で行った。試験開始2週後に行動学的試験に基づく行動試験を実施(1日1試験を実施)し、その表現型から孤立飼育の脳機能への影響を検討した(図2に試験スケジュールを記載)。

遺伝子発現解析

前述した飼育条件による2週間の飼育後、肝臓重量及び精巣上部脂肪重量を測定し、脳各部位(大脳皮質、線条体、扁桃体、視床下部、視床上部、海馬)及び代謝臓器である肝臓を採材し、Trizol Reagent(invitrogen)中でホモジナイズし、トータルRNAを抽出した。肝臓トータルRNAに関してはSimplyRNA tissue kit on Maxwell RNA extraction system (Promega)によって精製した。得られたトータルRNAはバイオアナライザ(Agilent)でqualityを確認し、RIN値が8.5以上であることを確認したのちSmarter Stranded Total RNA Sample Prep Kit

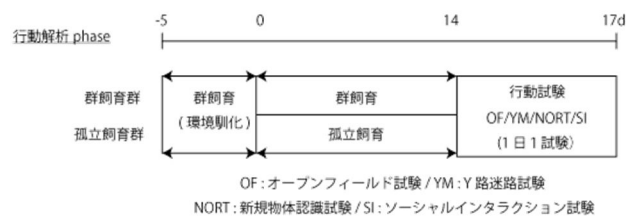


図2 : 実験スケジュール

HI Mammalian (Clontech Laboratory, Inc.)を用いてライブラリーを作成した。作成したライブラリーはHiSeq2000によってシーケンスを実施した。得られたFastqデータからTophat2プログラムを用いてマウス(GRCm 38)mm10にマッピングしカウントデータを得た。変動遺伝子解析はRのパッケージであるDeseq2を用いて実施し、得られた変動遺伝子についてIPA(Ingenuity Pathway Analysis)を用いたパスウェイ解析も実施した。

盲腸内菌叢解析

孤独ストレスが腸内菌叢に与える影響を解析するため、2週間の飼育後、盲腸内容物を採取

し、菌体 DNA を抽出した後、341F 及び 805R プライマーを用いて bacterial 16S rRNA genes の V3-V4 領域を増幅した。増幅した領域について Miseq を用いたシーケンスを実施した。operational taxonomic unit(OTU)の決定及び Taxonomy の割り当ては QIIME(Quantitative Insights Into Microbial Ecology)を用いて実施した。

4. 研究成果

1) 実験動物を用いた行動試験の導入

本研究では弱いストレス下での行動解析を検討するため、トラウマティックな影響の少ない行動試験の導入を進めた。導入した行動試験項目は情動行動の評価としてオープンフィールド試験、探索行動の評価として Y 迷路試験、短期記憶行動の評価として新規物体認識試験、社会的行動の評価としてソーシャルインタラクション試験といった試験をそれぞれ導入し、幅広い脳機能を評価することが可能となった(図3)。今回導入した行動試験項目を本実験での脳機能行動を推し量る行動試験項目として適用した。

2) 飼育条件の違いによる体重及び摂餌量への影響

異なる飼育条件で飼育を開始し、隔日で体重及び摂餌量を測定した結果、体重推移及び摂餌量において両群間で有意な差を認めた。飼育条件を変更する前の馴化段階において両群間で体重変化率、摂餌量に差がないことは確認している。また飼育期間終了後において肝臓及び精巣上部脂肪の臓器重量を計測した結果、肝臓重量に有意な差があることを認めた。しかしながら肝臓重量の変化は体重変化分を補填する増加率ではないことから短期間の飼育条件の違いは肝臓、精巣上部脂肪以外の臓器重量にも影響する可能性が示唆された。またストレスの程度を推定するため血中コルチコステロン濃度を測定した結果、両群間で有意な差を認めた。詳細については学術論文として可能な限り早急に公表するべく準備を進めている。

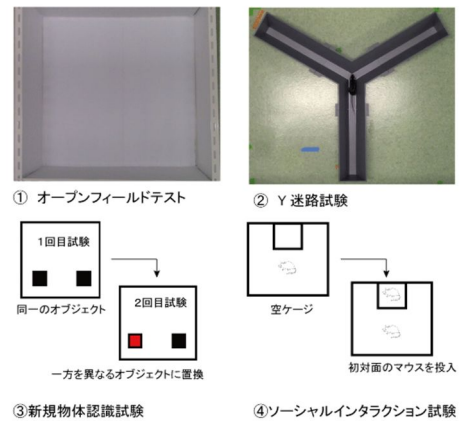


図3 : 導入した行動試験

3) 孤独ストレスに起因する行動学的表現型

図2に示すスケジュールに従い行動試験を実施した結果、すべての行動試験項目について両群間で有意な差を認めた。例として行動試験項目の1つであるオープンフィールド試験において群飼育群と比較し、孤立飼育群で辺縁領域での行動量が有意に増加する表現型を得た(図4)。このように孤立飼育条件は一般的な群飼育条件と比較し、脳機能行動にも影響を与えることを確認した。その他の行動試験解析の詳細については未発表データも多いため本報告書内では割愛している。詳細については学術論文として可能な限り早急に公表するべく準備を進めている。

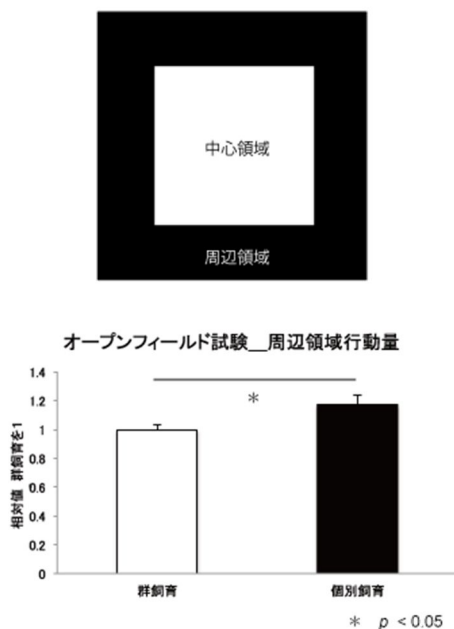


図4 : 短期間の飼育条件の違いによる行動様式への影響

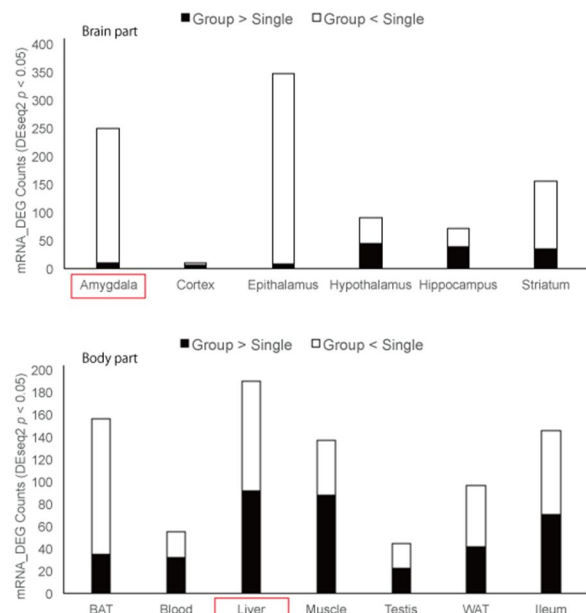


図5 : 短期間の飼育条件の違いによる各臓器での変動遺伝子数

4) 飼育条件の違いが脳各部位及び代謝臓器の遺伝子発現に与える影響

試験終了後のサンプルを用いて次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現解析を実施した。本研究においては脳部位を扁桃体及び視床下部に限定して遺伝子発現解析を実施した。扁桃体領域は予備検討段階における短期間の孤立飼育によって群飼育と比較し多くの変動遺伝子を認

め、孤独のストレスに対して鋭敏に応答する部位と想定された(図5)。また視床下部は代謝機能調節や摂食機能等をつかさどる脳の中核部位である。本研究において孤立飼育は体重増加や摂餌量にも影響することを見出したことから視床下部領域での遺伝子発現解析も実施した。また代謝臓器の代表格として肝臓での遺伝子発現解析も検討した。変動遺伝子は DESeq2 プログラムを用いて算出した結果、各臓器においていくつかの特徴的な変動遺伝子を得ることができた。得られた変動遺伝子を起点とし、影響しうるパスウェイ上流のリン酸化状態を免疫組織学染色において確認した結果、脳部位内でのリン酸化陽性細胞数が両群間で有意に変化することを見出した。これらデータに関しても未発表データであることから本報告書内では割愛している。詳細については学術論文として可能な限り早急に公表するべく準備を進めている。

5) 孤独ストレスに起因する腸内菌叢への影響

異なる飼育条件において飼育を継続し試験終了後の盲腸内容物を用いて菌叢解析を実施した。属レベルでの系統構成比率は2つの菌で両群間での有意な差を認め(菌名の詳細は未発表データであることから本報告書内では割愛している)。また Bray-Curtis 指数を用いた類似度距離及び質的距離による PCoA 解析では両群の盲腸内菌叢はそれぞれ別のクラスターを形成する傾向が見られた(図6)。従って短期間の異なる飼育条件の違いは盲腸内の菌叢構成比率を変化させることを見出し、現在、腸内菌叢と各臓器での遺伝子発現の相関関係を検討することで菌叢変化と相関関係にある遺伝子群を探索し、その機能について鋭意検討を進めている

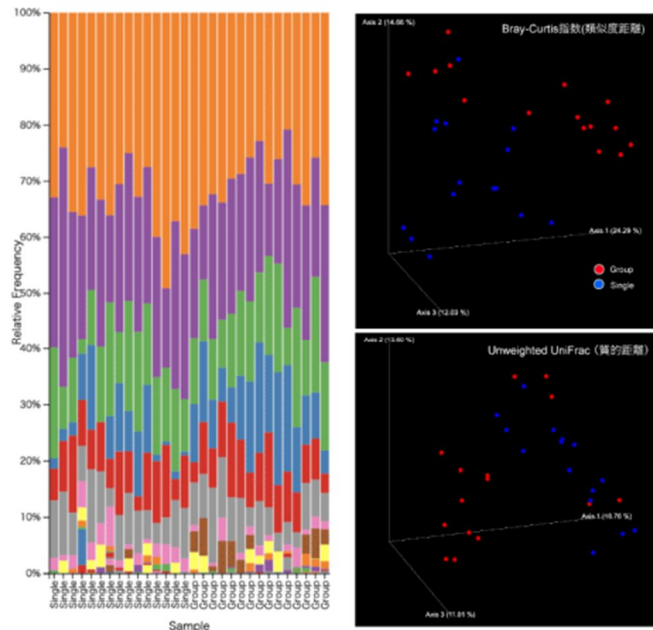


図6 : 盲腸内菌叢解析

6) 孤独ストレスに対して緩和効果を有する機能性素材の探索

今回得られた短期間での孤独ストレスによる行動様式の変化を孤独ストレス負荷の初期段階におけるマーカーの1つと捉え、緩和・予防効果を有する機能性素材の検討を試みた。本研究では機能性素材の候補として脳機能に対する効果が期待されている素材 A (preliminary な実験であるため素材名は割愛)を用いた。図2に示すスケジュールに従って2週間両群に対して素材 A を添加した飼料を給餌し、行動試験を実施した。行動試験の結果より、孤独ストレスによって変化した行動様式の一部が素材 A の添加によって緩和されることを見出した(図7)。孤独ストレスによって変化した行動様式の全てに対して緩和効果を認めるものではないことから今回検討した素材 A による緩和効果は一部の脳機能に限定的であることが示唆された。今後予定しているトランスクリプトーム解析によって、素材 A の添加による遺伝子発現の変化をオミカルに精査することで緩和された行動変化を司る責任遺伝子の同定も期待される。

以上のことから本研究を通して鬱や統合失調症の引き金要因とも考えられている孤独によるストレスの比較的初期でのイベントを行動試験解析やトランスクリプトーム解析によって断片的ではあるが捕まえることができた。今回得られた多くのデータは初期の孤独ストレス負荷によって誘起される表現型でありあくまでも病的なストレス負荷によるものではないと想定される。従って食品機能性成分による孤独ストレス緩和、予防効果についても検討できることが期待される。今後は孤独ストレスに対して緩和・予防効果を有する機能性素材の探索を進めるとともにそのメカニズム解明も進める予定である。

5. 主な発表論文等

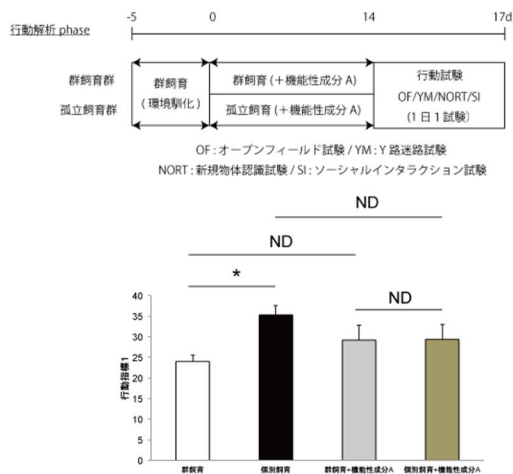


図7 : 孤独ストレスに緩和効果を有する機能性素材の探索

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) Shinozaki F, Abe T, Kamei A, Watanabe Y, Yasuoka A, Shimada K, Kondo K, Arai S, Kumagai K, Kondo T, Abe K. Coordinated regulation of hepatic and adipose tissue transcriptomes by the oral administration of an amino acid mixture simulating the larval saliva of *Vespa* species. *Genes Nutr* (査読あり), 2016, Jul, 11; 11:21. doi: 10.1186/s12263-016-0534-2. eCollection 2016.
- 2) Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F, Yasuoka A, Shimada K, Kondo K, Ishijima T, Toyoda T, Arai S, Kondo T, Abe K. Quantitative deviating effects of maple syrup extract supplementation on the hepatic gene expression of mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* (査読あり), 2017, Feb; 61(2). doi: 10.1002/mnfr.201600477. Epub 2016 Nov 3.
- 3) Yodai Kobayashi, Hirosuke Sugahara, Kousuke Shimada, Eri Mitsuyama, Tetsuya Kuhara, Akihito Yasuoka, Takashi Kondo, Keiko Abe and Jin-zhong Xiao. Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Sci Rep* (査読あり), 2017, Oct, 18; 7(1):13510. doi:10.1038/s41598-017-13368-2.

〔学会発表〕(計16件)

- 1) 亀井飛鳥、渡部由貴、篠崎文夏、安岡顕人、近藤香、嶋田耕育、阿部啓子、近藤隆、「高脂肪食摂取に対する応答性のマウス系統差 網羅的遺伝子発現解析より」、第70回日本栄養・食糧学会大会、兵庫、5月、2016.
- 2) 嶋田耕育、安岡顕人、亀井飛鳥、篠崎文夏、渡部由貴、近藤香、近藤隆、阿部啓子、「マウスの群飼育と孤立飼育が脳と各臓器のトランスクリプトームに与える影響」、第39回日本分子生物学会年会、神奈川、12月、2016.
- 3) 篠崎文夏、山下治之、亀井飛鳥、渡部由貴、安岡顕人、嶋田耕育、近藤香、荒井綜一、近藤隆、阿部啓子、「自然薯ムカゴ抽出物の生理的機能性について」、日本農芸化学会2017年度大会、京都、3月、2017.
- 4) 嶋田耕育、安岡顕人、亀井飛鳥、篠崎文夏、近藤香、阿部啓子、近藤隆、「孤立飼育がマウスの脳と各臓器のトランスクリプトームに与える影響」、NGS現場の会、仙台、5月、2017.
- 5) Yasuoka A., Kamei A., Shinozaki A., Kondo K., Shimada K., Kondo T., Abe K, 「Transgenerational effect of ethanol induced metabolic stress and its alleviation by dietary polyphenol」、Latsis Symposium 2017, Zurich, 8月、2017.
- 6) 嶋田耕育、「機能性食品による脳機能評価を目指して」、食品開発展2017、東京、10月、2017.
- 7) 嶋田耕育、「脳機能恒常性維持に向けた機能性成分の探索 食品に含まれる機能性素材による脳機能の評価系-」、神奈川県ものづくり技術交流会2017、神奈川、11月、2017.
- 8) Hazuki Maehata, Yodai Kobayashi, Kousuke Shimada, Eri Mitsuyama, Tetsuya Kuhara, Akihito, Akihito Yasuoka, Takashi Kondo, Keiko Abe and Jin-zhong Xiao, 「*Bifidobacterium breve* strain A1 has potential to improve cognitive dysfunction in the Alzheimer's disease model mice」、IPC (international probiotics conference) 2018, Hungary Budapest, 6月、2018.
- 9) 篠崎文夏、亀井飛鳥、嶋田耕育、安岡顕人、荒井綜一、阿部啓子、「高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与が回腸遺伝子発現に及ぼす効果」、日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、3月、2018.
- 10) 野原正勝、安岡顕人、嶋田耕育、亀井飛鳥、篠崎文夏、豊田集、飯尾将太、阿部啓子、「血球トランスクリプトーム解析の高精度化にむけた血液処理方法の検討」、日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、3月、2018.
- 11) 亀井飛鳥、篠崎文夏、安岡顕人、嶋田耕育、荒井綜一、阿部啓子、「体内鉄良の変化にตอบสนองする血液遺伝子の発現変化の解析」、日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、3月、2018.
- 12) 嶋田耕育、安岡顕人、亀井飛鳥、篠崎文夏、野原正勝、豊田集、飯尾将太、阿部啓子、「孤立飼育がマウスの脳及びその他臓器のトランスクリプトームに与える影響」、日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、3月、2018.
- 13) 安岡顕人、亀井飛鳥、篠崎文夏、嶋田耕育、野原正勝、飯尾将太、近藤香、岡田晋治、近藤隆、阿部啓子、「エタノール誘導代謝ストレスの次世代への影響と食品ポリフェノールによるその緩和」、日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、3月、2018.
- 14) 嶋田耕育、食品の機能性評価、「抗メタボリックシンドロームから脳機能活性化へ 基盤研究を中心にして」、食品開発展2018、東京、10月、2018.
- 15) 家山智子、長谷知揮、山下玲、嶋田耕育、濱口毅、篠原もえ子、山田正仁、阿部啓子、小林彰子、「ロスマリン酸摂取によるアルツハイマー病発症遅延に關与する血漿 マイクロRNAの探索とその機能の解析」、日本農芸化学会2019年度大会、東京、3月、2019.
- 16) 篠崎文夏、山下治之、亀井飛鳥、嶋田耕育、野原正勝、荒井綜一、阿部啓子、「肝臓遺伝子発現による自然薯ムカゴ粉末および抽出物摂取効果の検証」、日本農芸化学会2019年度大

会、東京、3月、2019.

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〕

ホームページ等

https://www.kanagawa-iri.jp/r_and_d/project_res/labo_intro/abe_project/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 耕育 (SHIMADA KOUSUEK)

地方独立行政法人 神奈川県立産業技術総合研究所 食品機能性評価グループ 研究員

研究者番号：50634185

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

安岡 顕人 (YASUOKA AKIHITO)

東京大学大学院 農学生命科学研究科応用生命化学専攻日清食品寄付講座「味覚サイエンス」特任准教授

研究者番号：10453028

亀井 飛鳥 (KAMEI ASUKA)

地方独立行政法人 神奈川県立産業技術総合研究所 食品機能性評価グループ 主任研究員

研究者番号：40514112

篠崎 文夏 (SHINOZAKI FUMIKA)

地方独立行政法人 神奈川県立産業技術総合研究所 食品機能性評価グループ 研究員

研究者番号：00359647

岡田 晋治 (OKADA SHINJI)

東京大学大学院 農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品産業コンソーシアム寄付講座 食品機能学 特任准教授

研究者番号：50376563

近藤 隆 (KONDOH TAKASHI)

理化学研究所 統合生命医化学研究センター 免疫器官形成研究チーム 上級研究員

研究者番号：40333299

(4) 研究協力者

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。