

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19684

研究課題名(和文) 周産期の鉄欠乏による神経幹細胞の発生異常と生後の行動特性との関連の解析

研究課題名(英文) Analysis of the relationship between perinatal iron deficiency in neural stem cell development and postnatal behavioral characteristics

研究代表者

西倉 紀子(NISHIKURA, NORIKO)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：00649246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：雄ラットを離乳後の生後21-39日(人間の9か月-2歳に相当)に鉄量を10%量に制限する鉄欠乏(ID)群と普通食の対照(CN)群の2群を研究対象とした。行動実験では、8および12週齢にて、ID群では総移動距離の週齢に伴う減少率が低く、ID群は成獣になってからも多動が残った。13週齢での脳内モノアミン定量では、dopamine(DA)代謝産物がPFC(前頭前皮質)およびNAcc(側坐核)において増加し、中脳腹側ではDAの低下が認められた。転写産物の解析では、NAccにおけるReelin遺伝子の発現がID群で減少し、免疫染色では、NAccのシナプス密度がID群で有意に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の実験で鉄制限を行った期間は、人間の9か月から2歳に相当し、現在の日本でも存在する離乳期の鉄欠乏性貧血のモデルラットと考えている。乳児期の鉄欠乏によりReelin遺伝子の発現量がエピジェネティックな変化により減少することで不可逆的な変化をもたらし、神経伝達物質やシナプス形成にも影響を与え、成人期にも行動特性が残る一因となることを明らかにしたのではないかと考えている。今後は乳児期の鉄欠乏を予防することで、不可逆的な変化と思われる成人期の行動特性を予防することにつながるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Fischer 344/Jcl postweaning male rats aged 21-39 d were fed low-iron diets (0.35 mg/kg iron; ID group) or standard AIN-93 G diets [3.5 mg/kg iron; control (CN) group]. Behavioral tests at 8 and 12 wk of age revealed a significant reduction of the age-related decline in the total distance traveled in ID rats compared with CN rats, indicating that ID affected hyperactivity, which persisted into adulthood (13 wk of age). At this age, reelin (Reln) mRNA expression decreased and synaptic density increased in the NAcc in the ID group. Regarding the mesolimbic pathway, homovanillic acid concentration increased in the NAcc, whereas the dopamine concentration decreased in the ventral midbrain. Our results suggest that ID during the postweaning period in male rats, despite complete iron repletion following ID, led to long-term hyperactivity via monoamine disturbance in the brain and an alteration in the synaptic plasticity accompanied by downregulation of Reln expression in the NAcc.

研究分野：小児神経学

キーワード：鉄欠乏 側坐核 rat Reelin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎児期・乳児期早期の成育環境(栄養、ストレスなど)は児の体質に変化を与え、生後の発達障害や精神疾患の発症リスクに大きく関わっていることが疫学研究により示されている (Marques AH 2014)。栄養素の中でも、鉄は髄鞘形成に必要な脂質の生合成に関与 (Ortiz E 2004) し、serotonin や dopamine などの神経伝達物質の合成酵素にも必須の物質であり、欠乏による認知機能への影響は大きいとされている。

鉄欠乏性貧血が 2 歳以上に発症した場合は、鉄剤投与により貧血も神経機能の障害も改善するが、2 歳未満に発症した場合は認知機能の改善は乏しく、治療終了 10 年後もその影響は残存するという報告がある (McCann JC 2007, Lozoff B 2006・2013, Lukowski AF 2010)。また、乳幼児期は身体発達が急速で身体の鉄の必要量が多いため、母乳栄養は鉄の吸収率が高いものの含有量が少なく、調製粉乳ではその逆であり哺乳のみでは鉄欠乏に陥りやすく、現代においても実際には気付かれずに離乳期を終える児が多数存在すると考えられる。

2. 研究の目的

鉄欠乏により不可逆的な変化をもたらす、鉄剤治療にはクリティカルピリオドが存在することが明らかとなっている。これらの知見を踏まえ、本研究では未だ明らかとなっていない鉄欠乏が不可逆的な中枢神経系に及ぼす影響を明らかにするために、次世代シークエンサーを用いた転写産物の解析を行い、乳児期早期のプログラミングへ与える影響を調査した。

3. 研究の方法

Fischer344/Jcl ラットを妊娠、出産させ、子雄ラットを離乳後である生後 21 から 39 日までの期間において、鉄量を 10% 量に制限し、それ以降は十分量を与える鉄欠乏 (ID) 群と普通食の対照 (CN) 群の 2 群を研究対象とし、以下の実験を行った。

(1) 生物学的検査

鉄欠乏の評価のために鉄制限終了日である日齢 39、8 週および 13 週に貧血と鉄の評価の採血を実施し、体重は毎週測定した。

(2) 行動実験

オープンフィールド試験・高架式十字迷路試験を 8、12 週齢に施行した。

(3) モノアミン定量実験

行動実験後の 9、13 週齢に脳内モノアミン定量を前頭前皮質 (PFC)、側坐核 (NAcc)、尾状被殻、中脳背側、中脳腹側、橋において HPLC 法を用いて施行した。

(4) 遺伝子発現解析 (RNA-seq 法を用いた解析)

13 週齢の PFC および NAcc の 2 領域において次世代シークエンサーを用いた転写産物 (mRNA) の解析を RNA-seq 法を用いて施行した。

(5) 組織形態解析

13 週齢の PFC および NAcc の 2 領域において抗 synaptophysin 抗体を用いてシナプスの免疫染色を施行した。

4. 研究成果

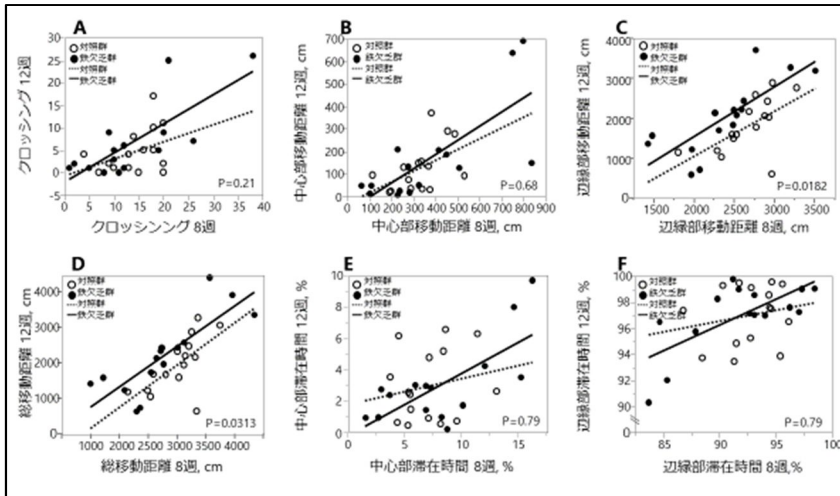
(1) 生物学的検査

	n	Age	Body weight(g)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Serum Fe (μg/dL)	UIBC (μg/dL)
CN	6	39d(5wk)	100.6±7.4	39.3±1.9	13.6±0.6	228.7±21.3	398.8±42.6
ID	6	39d(5wk)	83.2±4.6**	14.2±1.1***	5.1±0.3***	24.8±3***	959.8±6.6***
CN	6	60d(8wk)	212.2±11.8	42.3±2	14.9±0.8	173.8±7.5	384.8±21.9
ID	5	60d(8wk)	184±19.3*	40.1±3.2	14.2±0.6	168.6±23.6	372.6±33.4
CN	6	94d(13wk)	272±14.1	48.2±2.7	15.8±0.7	139.7±11.8	395.8±15
ID	6	94d(13wk)	256.4±8.8	47.7±2.1	16.0±0.4	146±10.2	382.5±22.8

Values are means ± SEM *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (unpaired Student's t-test).

鉄制限終了日である日齢 39 の血液検査で CN 群に対し ID 群では著明な貧血を呈し、Fe の評価についても CN 群に比し ID 群で Fe が低く UIBC はその逆の結果で高く鉄欠乏に至っていることを確認した。行動実験を実施した 8 週齢では貧血の状態は回復し有意差がなくなっていた。体重については鉄制限終了日である日齢 39 では ID 群で低体重となっていたが、徐々に回復し 13 週齢では有意な差はなくなっていた。

(2) 行動実験

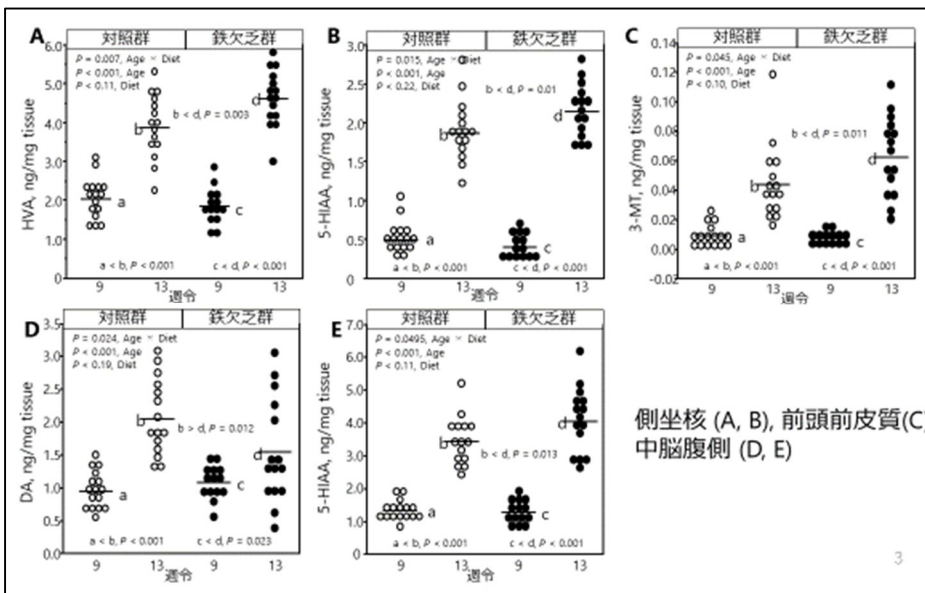


共分散分析により $P < 0.05$ を有意と判断し、それぞれの群 15 匹で検討した。

8 および 12 週齢のオープンフィールド試験において、ID 群では総移動距離 (図 D) および辺縁部移動距離 (図 C) の週齢に伴う減少率が CN 群より低く ($P < 0.05$)、ID 群は成獣になってからも多動が残った。

なお、高架式十字迷路試験ではいずれの項目も有意な差はみとめなかった。

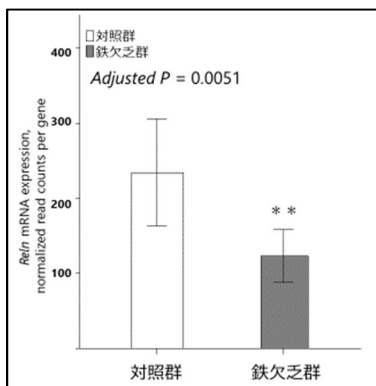
(3) モノアミン定量実験



Bonferroni 法による補正を行った分散分析により $P < 0.05$ を有意と判断し、それぞれの群は 14 - 15 匹で検討した。有意な差があったもののみを示す。

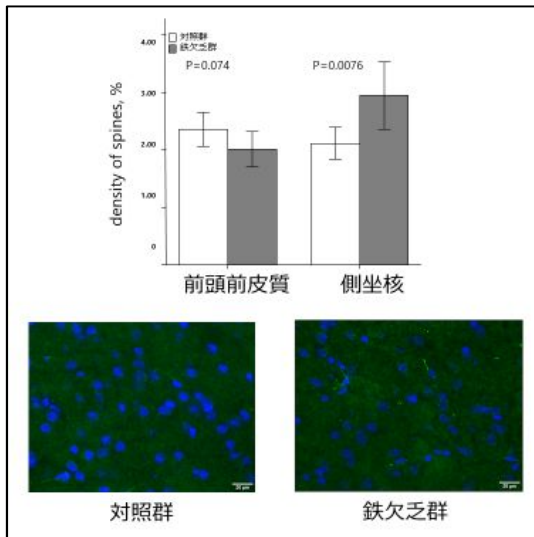
13 週齢での脳内モノアミン測定では、dopamine (DA) 代謝産物である 3-methoxytyramine (3-MT)、homovanillic acid (HVA) が PFC および NAcc のそれぞれにおいて増加しており、中脳腹側では DA の低下が認められた。一方、NAcc および中脳腹側では serotonin の主要代謝産物である 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) が増加していた。

(4) 遺伝子発現解析 (RNA-seq 法を用いた解析)



RNA-seq 法をもちいた解析 ($n=5$) では、NAcc における Reelin 遺伝子の発現が ID 群で唯一有意に減少していた (adjusted $P < 0.01$)。

(5) 組織形態解析



抗 synaptophysin 抗体を用いた免疫染色では、NAcc のシナプス密度が CN 群に比して ID 群で有意に増加していた ($P < 0.01$)。しかしながら、PFC のシナプス密度には両群間で有意差がなかった。写真は NAcc における実際の実験画像を示した。

(結果のまとめ)

離乳後の鉄欠乏雄ラットにおいて成獣となっても多動が残存し、脳内のモノアミンの変化を引き起こした。側坐核において Reelin 遺伝子の転写産物は低下しシナプス密度は増加していた。

今回の実験で鉄制限を行った期間は、人間の9か月から2歳に相当 (Workman AD 2013) し、現在の日本でも存在する離乳期の鉄欠乏性貧血のモデルラットと考えている。Reelin 遺伝子は胎生期の神経細胞移動や脳の層構造形成に必須の遺伝子であり、樹状突起の発達やシナプスの形成・可塑性に関連している (Lee GH 2016)。統合失調症や双極性障害、発達障害の一つである自閉スペクトラム症などの神経疾患では Reelin 遺伝子の発現の低下の報告がある (Folsom TD 2013)。

また、シナプス密度は統合失調症では低下、自閉スペクトラム症では増加が認められるとも報告されている (Penzes P 2011)。Reelin 遺伝子は dopamine の神経の発達にも関連していることが報告 (Ballmaier M 2002) され、発達障害の一つである注意欠如多動症では dopamine 神経の機能の低下および dopamine 受容体感受性亢進があるとされ、多動や衝動的な行動に深く関与しているとされる (Roessner V 2010, Miller EM 2012)。

乳児期の鉄欠乏により Reelin 遺伝子の発現量がエピジェネティックな変化により減少することで不可逆的な変化をもたらす、神経伝達物質やシナプス形成にも影響を与え、成人期にも行動特性が残る一因となることを明らかにしたのではないかと考えている。

(参考文献)

1. Marques AH, Bjørke-Monsen AL, Teixeira AL, Silverman MN. Maternal stress, nutrition and physical activity: Impact on immune function, CNS development and psychopathology. *Brain Res* 2015;1617:28-46.
2. Ortiz E, Pasquini JM, Thompson K, Felt B, Butkus G, Beard J, Connor JR. Effect of manipulation of iron storage, transport, or availability on myelin composition and brain iron content in three different animal models. *J Neurosci Res* 2004;77:681-9.
3. McCann JC, Ames BN. An overview of evidence for a causal relation between iron deficiency during development and deficits in cognitive or behavioral function. *Am J Clin Nutr* 2007;85:931-45.
4. Lozoff B, Beard J, Connor J, Barbara F, Georgieff M, Schallert T. Longlasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy. *Nutr Rev* 2006;64:S34-43.
5. Lozoff B, Smith JB, Kaciroti N, Clark KM, Guevara S, Jimenez E. Functional significance of early-life iron deficiency: outcomes at 25 years. *J Pediatr* 2013;163:1260-6.
6. Lukowski AF, Koss M, Burden MJ, Jonides J, Nelson CA, Kaciroti N, Jimenez E, Lozoff B. Iron deficiency in infancy and neurocognitive functioning at 19 years: evidence of long-term deficits in executive function and recognition memory. *Nutr Neurosci* 2010;13:54-70.
7. Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci* 2013;33:7368-83.
8. Lee GH, D'Arcangelo G. New insights into reelin-mediated signaling pathways. *Front*

Cell Neurosci 2016;10:122.

- 9 . Folsom TD, Fatemi SH. The involvement of reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacol* 2013;68:122-35.
- 1 0 . Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2011;14:285-93.
- 1 1 . Ballmaier M, Zoli M, Leo G, Agnati LF, Spano P. Preferential alterations in the mesolimbic dopamine pathway of heterozygous reeler mice: an emerging animal-based model of schizophrenia. *Eur J Neurosci* 2002;15:1197-205.
- 1 2 . Roessner V, Sagvolden T, Dasbanerjee T, Middleton FA, Faraone SV, Walaas SI, Becker A, Rothenberger A, Bock N. Methylphenidate Normalizes Elevated Dopamine Transporter Densities in an Animal Model of the Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Combined Type, but Not to the Same Extent in One of the Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Inattentive Type. *Neuroscience* 2010;167:1183-91.
- 1 3 . Miller EM, Pomerleau F, Huettl P, Russell VA, Gerhardt GA, Glaser PE. The spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rat models of ADHD exhibit sub-regional differences in dopamine release and uptake in the striatum and nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 2012;63:1327-34.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishikura N, Hino K, Kimura T, Uchimura Y, Hino S, Nakao M, Maruo Y, Udagawa J	4. 巻 150(2)
2. 論文標題 Postweaning Iron Deficiency in Male Rats Leads to Long-Term Hyperactivity and Decreased Reelin Gene Expression in the Nucleus Accumbens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 212-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jn/nxz237.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西倉紀子
2. 発表標題 Postweaning iron deficiency in rats alters the reelin expression in the nucleus accumbens
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考