

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10172

研究課題名(和文) マルチオミックス解析アプローチによるDOHaD説に基づく新生児脳の解析

研究課題名(英文) Multi-omics approach unraveling neonatal mouse brain for DOHaD

研究代表者

RAKWAL RANDEEP (RAKWAL, RANDEEP)

筑波大学・体育系・教授

研究者番号：70590850

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)：胎生・新生児期の栄養環境が成人期疾患発症リスクに起因するDOHaD説が提唱されるようになり、近年ではうつ病などの精神疾患との関連が指摘されている。DOHaD説に基づく精神疾患素因形成機序を解明を目的とし、低栄養暴露マウス新生児期脳と胎児脳の解析データ(基盤C：胎児組織に着目した成人疾患発症の分子基盤の解明、2011～2013)を比較検討した結果、ハプトグロビンの発現増加が確認できた。ハプトグロビンは炎症性疾患のマーカーでもあり、他にも急性期反応タンパク質やミエリン再生因子が多数検出された。よって胎児・新生児期の低栄養環境は脳の炎症を引き起こし神経疾患のリスクを高める可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により精神疾患発症に関与する候補遺伝子群およびタンパク質が低栄養暴露の胎児・新生児の脳から同定された。得られた候補因子の発現調節解明の研究へ伸展させることで、発症原因が不明なものが多い精神疾患の根本治療につながる薬剤開発や有用な予防法の開発に貢献できると思われる。また本研究は臨界期に注目していることから、近年問題視されつつある子供のうつ病、注意欠陥多動性障害、自閉症などに関する発症機序や初期マーカーの発見につながる可能性も期待できることから社会的意義の高い研究と思われる。

研究成果の概要(英文)：The DOHaD theory that the nutritional environment in the fetal and neonatal period is behind the risk of developing adult diseases has been advocated. Recently, it has been pointed out that it is also associated with mental disorders such as depression. Data of the neonatal brain and fetal brain of undernourished mice was performed in order to elucidate the predisposition mechanism of psychiatric disorders based on the DOHaD theory (Project C: Elucidation of the molecular basis of adult disease development focusing on fetal tissues as a result of a comparative examination in 2011-2013), and an increase in haptoglobin gene expression was confirmed. Haptoglobin is also a marker for inflammatory diseases, and many other factors involved in the acute phase reaction proteins and myelin regeneration were detected. It was suggested that the malnutrition environment may increase the risk of neurological diseases by causing inflammation in the fetal/neonatal brain.

研究分野：オミックス解析

キーワード：DOHaD オミックス解析 精神疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

David JP Barker が 1980 年代後半に提示したのは“生活習慣病の起源は、胎児期に子宮内の低栄養に曝されたことにある”という成人病胎児期発症説であるが、欧州を中心に行われた多大な疫学研究により、この Barker 説は成人期に発症する多くの疾患の原因が受精時、胎生期、新生児期の発達期環境にあるという DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 説の概念に発展した。疫学研究から出生時低体重 (2.5kg<) と成人期の高血圧、心血管疾患、2 型糖尿病の発症リスクとの関連が明らかになっている。日本は OECD 加盟国のなかでも出生時低体重児の出生率が特にこの 20 年で激しく増加している。この原因には若い女性の“やせ”願望と“小さく生んで大きく育てる”ことが妊婦育児の上で良いとする社会的風潮が挙げられる。しかしこの考え方は、子供の将来における様々な疾患に罹患するハイリスク群となる可能性が危惧されるものでもある。DOHaD 説はこれまで多くの実験動物で検証されており、これら動物モデルは機序解明に有用である。我々はマウス低栄養環境曝胎児の肝組織から生活習慣病に關与する遺伝子の同定 (Congenit. Anom. Kyoto 51:110-125, 2011)、同様に胎児脳組織から精神疾患に關与する遺伝子およびタンパク質の解析を進め (科研費基盤 C: 胎児組織に着目した成人疾患発症の分子基盤の解明、2011~2013 年度)、胎児期低栄養曝露で胎児脳内の RNA 結合タンパク質が減少しスプライシング異常や mRNA 不安定化が生じる可能性を見出した。一方で出生時の低体重が生後に増加に転じる“catch up growth”が肥満、糖代謝異常、うつ病などの疾患発症リスクを高めるとの報告も多いことから、我々は胎児期だけでなく新生児期での調査も必要だと考えた。

### 2. 研究の目的

成人以降の肥満や生活習慣病と出生時低体重の関連が世界各国で相次いで研究報告され、近年ではうつ病、注意欠陥多動性障害、自閉症などの神経疾患との関連も多く指摘されている[1]。本研究では DOHaD 説に基づく精神疾患素因の形成機序を明らかにすることを目的とし、マウス新生児期の低栄養曝露による精神疾患発症に關連するリスク因子をマルチオミックス解析法で同定し、既に行った胎児期脳のデータとの比較を行うことで、より信頼性の高いリスク因子を同定することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新生児期低栄養曝露および LPS 投与

C57BL/6J 妊娠マウスは固型 CE-2 を自由摂取させ自然分娩 (分娩日 = 生後 0 日、postnatal day: PD) させた。生後 0 日に同腹児調整 (♂3 匹、♀3 匹) し、マウス母動物に 50% 給餌制限 (FR) の哺育期曝露を 1 週間行なった。給餌制限 50% に対して対照群は固型 CE-2 を自由摂取させた。各群 6 腹以上設け、生後 0 日、以降週 1 回の体重測定を行った。以後は自由摂取による給餌を行い生後 10 週に出生児から脳を採取して液体窒素にて凍結保存した。Lipopolysaccharide (LPS) を投与サンプルの場合は生後 10 週で 3 回の腹腔内投与 (1 回あたり 250ug/mL, 4 mL/kg) を行い、脳を採取して液体窒素にて凍結保存した。

#### (2) 脳組織のサンプリング

オミックス解析のための脳のサンプリングは生後 10 週齢にて行なった。部位は海馬および前頭前野の 2 か所とし、摘出後直ちに -80°C にて保存した。凍結した脳は液体窒素中でのグラインドで粉碎しパウダー状にした。パウダー状にしたサンプルはそれぞれの解析をするまで -80°C で保存した。

#### (3) マイクロアレイ解析

-80°C で保存したサンプルからの RNA 抽出は QIAGEN RNasy mini kit で抽出し、クオリティーチェックとして吸光度測定とアガロースゲル電気泳動を行った。マイクロアレイ解析はアジレント社の Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイキット (4x44K) チップを用いた。ラベリングは Cy3 で行い、1 色法による方法でシグナル強度を測定して自由摂取群、50% 給餌制限 (FR) 群、自由摂取群+LPS、50% 給餌制限 (FR) 群+LPS の 4 条件での遺伝子発現の比較検討を Agilent GeneSpring 13 GX Pathway search など使用して行った。

#### (4) TMT ベースの定量的プロテオーム解析

パウダー状にし、-80°C 保存していたサンプルからタンパク質抽出し、filter-aided sample preparation (FASP) によるトリプシン消化処理をした。消化サンプルを TMT 試薬で標識し、HLB OASIS カラムを使用して脱塩した後に、POROS 20 R2 逆相レジンを使用して 5-100% ACN Buffer (pH10) で 12 分画を溶出した。溶出分画は凍結乾燥し、-80°C に保存した。Q-Exactive MS 分析は UHPLC Dionex UltiMate®3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) 機器を使用した逆相クロマトグラフィーで分離し、データベース (MaxQuant ソフトウェア、Perseus および R プログラム) を使用したタンパク質同定ならびに相対定量数値化、統計解析を行った。

#### (5) 統合解析

Ingenuity Pathways Analysis、GeneSpring GeneMANIA などのソフトウェアを用いて、部位特異的な生物学的解析、上流解析を行い原因或いは関与遺伝子の探索などを行う。プロテオーム解析から得られた実験データを基に生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析を行った。メタボロミクス解析から得られたデータは Mass Profiler Professional の Pathway Architect モジュールなどを使用し複合オミックス解析によるプロファイリングを行い、代謝物、蛋白質、遺伝子の新しいコネクションやネットワーク検索を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 50%給餌制限(FR)による身体発育

生後1週間のFRにより、体重増加は抑制されたが、その後の自由摂取により catch-up growth が認められ、生後21日は対照群よりも体重増加の傾向が確認できた(図1)。FR群では背地走性には顕著な差はみられなかったものの切歯萌出、開眼完成日が若干遅延していたことから、身体発育を軽度遅延させると考えられた。

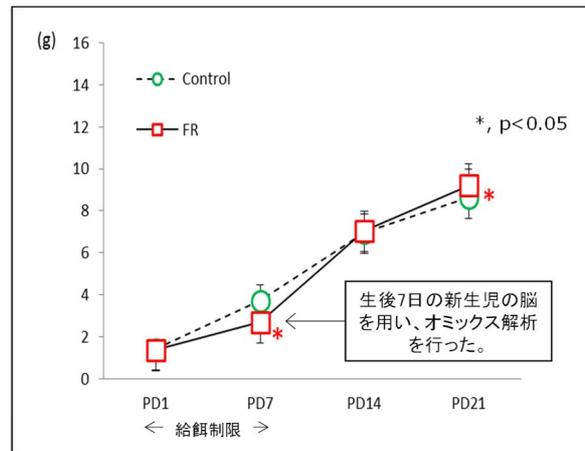


図1. 低栄養(50%給餌制限)暴露群の児体重の推移

##### (2) トランスクリプトーム解析

###### DNA マイクロアレイによる遺伝子発現 (FR 新生児期)

FR 群新生児期の前頭前野 (FC) および海馬 (HI) の遺伝子発現解析を行ったところ、低栄養暴露により発現が変化した遺伝子は 1.5 倍以上増加した遺伝子プローブ数は 1638 個 (FC:439, FC+LPS:343, HI:247, HI+LPS:609)、発現量が 0.75 倍以下に減少したのは 211 個 (FC:8, FC+LPS:53, HI:27, HI+LPS:123) であった。

FR により新生児期で発現が増加した遺伝子には急性期タンパク質が多く確認できた。FC ではアディプシン (Cfd)、ハプトグロビン (Hp)、HI では血清アミロイド A (Saa3, Saa1)、リポカリン 2 (Lcn2)、トランスフェリン (Ltf) などがあつた。他に興味深い因子として FC でセロトニン受容体 4 (Htr4)、HI でドーパミン受容体 D4 (Drd4) などの精神疾患に関与しているものもあつた。

###### FR 新生児期の発現変動遺伝子のパスウェイ解析

パスウェイ解析の結果、FC は Hippo signaling pathway、Pathways in cancer、Neurotrophin signaling pathway、Complement and coagulation cascades、ABC transporters となり、HI では Calcium signaling pathway、Dopaminergic synapse、Osteoclast differentiation、Neuroactive ligand-receptor interaction、Pancreatic secretion、Toll-like receptor signaling pathway、Renin secretion、Salivary secretion が関係経路の上位に抽出された。

###### 胎児期と新生児期の発現変動遺伝子の比較

胎児期と新生児期のマイクロアレイ解析データを比較した結果、ハプトグロビン (Hp) が胎児期の全脳、新生児期の FC と HI のいずれにおいても発現が増加していた。また胎児期と新生児期 HI でリポカリン 2 (Lcn2) とトランスフェリン (Ltf) の発現が増加していることが確認できた。

##### (3) プロテオーム解析

###### TMT ベースの定量的プロテオーム解析によるタンパク質発現 (新生児期)

プロテオーム解析の結果、新生児期 FC ではインスリン様成長因子結合タンパク質 (Igfals)、ミエリン (Myelin)、テトラスパニン (Tetraspanin)、リボゾームタンパク質 (Ribosomal protein) 関連タンパク質の発現増加が多く見られた。新生児期 HI ではフェチュイン (Ahsg)、ヘモペキシン (Hpx) の他に嗅覚マーカータンパク質 (Omp) などの発現増加が確認できた。

###### FR 新生児期の発現変動タンパク質のパスウェイ解析

パスウェイ解析の結果、FC は Ribosome、Alcoholism、Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)、HI では Dopaminergic synapse、Circadian entrainment、Renin secretion、Parkinson's disease、Salivary secretion、GABAergic synapse などが関係経路の上位に抽出された。

###### 胎児期と新生児期との発現変動タンパク質の比較

胎児期と新生児期のプロテオミクス解析データを比較したが、発現変動するタンパク質に共通するものは確認できなかった。

##### (4) 統合解析

###### 胎児期と新生児期の発現変動因子の比較

表 1 に低栄養暴露の胎児・新生児期脳での発現変動因子についてまとめた。先に述べたように

ハプトグロビン (Hp)は胎児期の全脳と新生児期 HI、FC において遺伝子発現増加が確認され、さらに新生児期 HI においてはハプトグロビン(Hp)タンパク質の発現増加も確認できた。その他には Gfap、Tppp3、Ndufab1、Mog、Plp1、Gng7、Gng13 が胎児・新生児期での共通因子として検出された。Gfap と Tppp3 は脱髄関連遺伝子で神経疾患・眼疾患リスクを高める。特に Gfap はアストロサイトの突起構造の主要成分であり、アストロサイトに起因する炎症反応のマーカーとしても利用されている。Ndufab1 はミトコンドリアでの脂肪酸合成、鉄再利用などに関与している。Mog と Plp1 はミエリン関連因子でミエリン鞘の形成維持と軸索再生阻害に関与している。Gng7 と Gng13 はグアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質) として知られている。

新生児期脳の遺伝子とタンパク質で共通するものは、ハプトグロビン以外には Omp、Scgn、Myo1d、Iqgap2、Gstm7 が検出された。Omp は嗅覚マーカータンパク質で嗅覚感覚ニューロン分化に関与している。Scgn はストレスホルモンのコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) の放出の他に、最近の報告ではビタミン D が Scgn (セクレタゴギン) を含むカルシウム結合タンパク質の増加を伴うメカニズムによってミエリン鞘再形成に影響を与える可能性が示唆されている [2]。Myo1d は脱髄後のミエリン再生過程で重要な役割を果たすとの報告がある [3]。Iqgap2 は細胞の形態および運動性の調節作用があり聴覚脳幹反応に関与、Gstm7 は 1 型糖尿病に関与している可能性がある。

表1.低栄養暴露 胎児・新生児脳における発現変動因子

Gene name	Microarray analysis		Proteomics analysis		
	Fetal period	Neonatal period			
	Whole brain	Hippocampus	Frontal cortex	Hippocampus	Frontal cortex
Hp					
Gfap					
Tppp3					
Ndufab1					
Mog					
Plp1					
Gng7					
Gng13					
Omp					
Scgn					
Myo1d					
Iqgap2					
Gstm7					

#### 低栄養暴露胎児・新生児脳における精神疾患発症過程の考察

低栄養暴露の胎児期・新生児期脳のオミックス解析の結果から“急性期タンパク質”と“ミエリン関連タンパク質”が重要な因子であると思われた。今回のマイクロアレイ解析の結果ではヘモグロビン結合、鉄再利用を含めた止血・凝固に関与する遺伝子群、さらに炎症に伴うサイトカイン遺伝子群も多く検出された。また軸索損傷の後に放出される神経損傷バイオマーカーとして有名な軸索細胞骨格成分であるニューロフィラメント NF-L (low) と NF-M (medium) も検出された (図 2)。

これらのオミックス解析の結果から低栄養環境により胎児・新生児期脳で脳内出血等の損傷が生じていることが示唆された。ビタミン K 欠乏性出血症など低栄養が新生児出血症の原因の一つであることは知られている。出血等の損傷によりミクログリア活性化、炎症性サイトカイン放出の過程を経て急性期タンパク質が誘導されたと考えられる (図 2)。家畜や人間の健康状態を評価するための診断ツールとしての急性期タンパク質利用の研究発表 [4] もあることから、低栄養暴露の結果で急性期タンパク質が誘発されたと考えられるが、今回のプロテオミクス解析において軸索損傷・神経損傷バイオマーカーのニューロフィラメント NF-L (low)、NF-M (medium) が検出されていることから低栄養により軸索損傷が生じたことは明らかだと思われた。特に再ミエリン化関連タンパク質 (MBP, MOBP, MAG, PLP1, MOG, MYOLD, SCGN など) の発現増加が多く誘導されていることから、恐らく脱髄 (ミエリン鞘損傷) が誘発された可能性が高いと考えた。最近の研究では髄鞘 (ミエリン) 関連タンパク質のミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク (MOG) は軸索再生阻害因子でもあることが報告されている [5,6]。軸索再生阻害因子の発現異常が髄鞘と軸索の相互作用のバランスを崩し、軸索の発達や再生を不完全にってしまうことは明らかであり [7]、最近では脱髄および髄鞘形成不全の統合失調症への関連も示唆されている [8,9]。

本研究により胎児期だけでなく新生児期の栄養管理が重要であり、新生児期のみでの低栄養暴露も神経疾患・精神疾患発症リスクを高めることが示唆された。本研究はマウスで示されたものであるが、人間でも同様に疾患発症リスクが高くなることは十分起こりうると思われた。

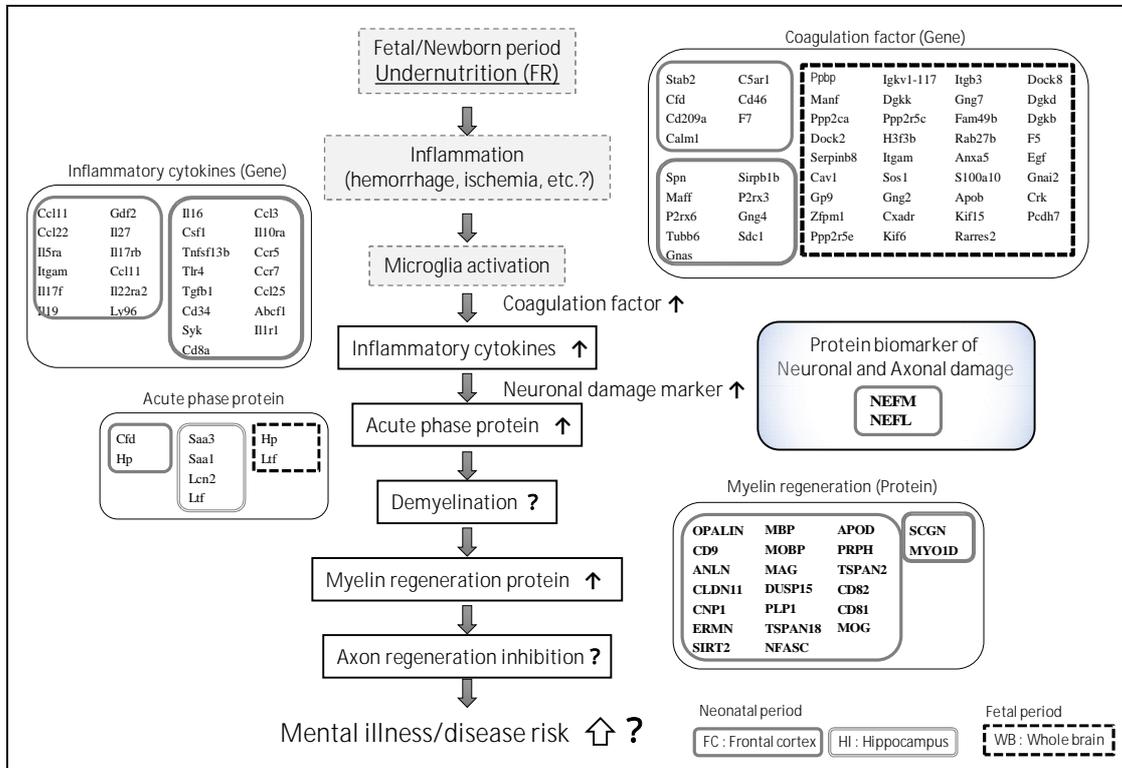


図2. 低栄養暴露胎児・新生児期脳における精神疾患発症の過程 (仮説)

#### 参考文献

- [1] Kim DR, Bale TL, Epperson CN. *Curr Psychiatry Rep.* (2015) Feb;17(2):5. Prenatal programming of mental illness: current understanding of relationship and mechanisms.
- [2] Oveland E, Nystad A, Berven F, Myhr KM, Torkildsen Ø, Wergeland S. *Neurochem Int.* (2018) Jan;112:267-277. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Induces Brain Proteomic Changes in Cuprizone Mice During Remyelination Involving Calcium Proteins
- [3] Yamazaki R, Baba H, Yamaguchi Y. *Neurochem Res.* (2018) Jan;43(1):195-204. Unconventional Myosin ID Is Involved in Remyelination After Cuprizone-Induced Demyelination
- [4] E. Gruys, M.J.M. Toussaint, T.A. Niewold, S.J. Koopmans. *J Zhejiang Univ Sci B.* (2005) Nov; 6(11): 1045–1056. Acute phase reaction and acute phase proteins
- [5] Filbin MT. *Nat Rev Neurosci.* (2003) Sep;4(9):703-13. Myelin-associated Inhibitors of Axonal Regeneration in the Adult Mammalian CNS
- [6] Fujita Y, Endo S, Takai T, Yamashita T. *EMBO J.* 2011 Apr 6;30(7):1389-401. (2011) Myelin Suppresses Axon Regeneration by PIR-B/SHP-mediated Inhibition of Trk Activity
- [7] Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. *Front Mol Neurosci.* (2015) Jul 27;8:35. Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects.
- [8] Fields, R.D. *Trends in neurosciences,* (2008) 31(7), 361-70. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders.
- [9] Nave, K.A. *Nature reviews. Neuroscience,* (2010) 11(4), 275-83. Myelination and the trophic support of long axons.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	柴藤 淳子  (SHIBATO JUNKO)  (10611121)	星薬科大学・先端生命科学研究所・寄附講座等客員助教   (32676)	
研究分担者	桑形 麻樹子  (KUWAGATA MAKIKO)  (70398684)	昭和大学・医学部・その他   (32622)	
研究分担者	塩田 清二  (SHIODA SEIJI)  (80102375)	星薬科大学・先端生命科学研究所・教授   (32676)	