

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10177

研究課題名（和文）新生児期ストレスによる脳発達への影響を理解するための新戦略

研究課題名（英文）Influence of Early Life Stress on the Brain Development

研究代表者

鈴木 辰吾（Suzuki, Shingo）

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：50451430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：シナプス発達を誘導するBDNFは、24-ヒドロキシコレステロール（24HC）合成酵素CYP46を誘導し、24HCの生合成を促進する。本研究では、BDNFの発現低下がみられる母子分離ストレス負荷モデル動物を用いて、CYP46が実際に脳で低下する可能性を検討した。実験の結果、海馬におけるCYP46の発現がストレス負荷により有意に減少することが示された。これは、発達期におけるストレスがBDNFの発現低下を誘導し、その影響によりCYP46の発現が減少したものと考えられる。24HCは血中に放出されるため、これらの結果は発達過程の脳が受容したストレスを血中24HCの減少として観察できる可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、分子機序を明らかにした上で、新生児期のシナプス形成を血中の24HCの量として測定できる探索しようとするものであり、新規性の高い独自の研究である。本研究の成果によりシナプス形成に關与する疾患を測定可能にすることに道が開け、新生児期の脳の発達に關わる疾患や状態の発見、さらに必要に応じた早期介入や治療効果の検証、薬剤の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have suggested that BDNF, which induces synaptic development, induces CYP46 which promotes the biosynthesis of 24-hydroxycholesterol. In the present study, we investigated the possibility that 24-hydroxycholesterol could be a biomarker for synaptic development. Specifically, we evaluated the potential of 24-hydroxycholesterol to serve as a biomarker of synaptic development using repeated maternal separation (MS), a model of preterm birth stress. The results showed that the expression of CYP46 in the hippocampus was reduced by MS. These results suggest that early life stress may have reduced CYP46 expression levels via a reduction in BDNF. Therefore, stress during development may act on the brain to induce a decrease in 24-hydroxycholesterol, suggesting that 24-hydroxycholesterol could be used as a marker for synapse formation.

研究分野：新生児医学

キーワード：BDNF 24HC 新生児 マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

育児放棄などの新生児期におけるストレスは、例え脳全体の発達に影響しない程度であったとしても、シナプスの形成を阻害し、脳の機能的発達を妨げうる。そしてこの過程は、気分障害や不安障害、さらにはうつ病や統合失調症の発症にも関与する可能性が示唆されており、現在研究が盛んに行われている。しかしながら、「シナプス形成」の程度を脳全体の発達（構造や大きさ）と明確に区別して、臨床において検査することは困難であり、生後早期におけるストレスがシナプス形成に与える影響を客観的に調べることは今のところ難しい。発達過程における脳のシナプス形成を低侵襲な手法で、客観的な数値として測定できれば、新生児期におけるストレスとシナプス形成との関連がより明確に理解され、ストレスにより負荷を受けたシナプスの早期診断や療法の開発、そして必要に応じた薬剤の開発にも道が開かれると考えられる。

これまでに申請者は、シナプス形成因子である脳由来神経栄養因子（BDNF）の作用機構を、特に脂質に注目して研究してきた。なお、BDNF は生後のシナプス形成期に発現が上昇する。申請者らのこれまでの研究によって、細胞膜上にある特定の脂質集合体が BDNF の担うシナプス発達を促すためのシグナル伝達自体に必須であること（鈴木ら, J Cell Biol, 2004）、BDNF によるシナプス発達の過程にコレステロール合成系の遺伝子発現と細胞内コレステロール量が増加するプロセスが必須であること（鈴木ら, J Neurosci, 2007）、BDNF が不飽和化を誘導する酵素発言を誘導し、パルミチン酸合成を促進すること（鈴木ら, JCell Neurobiol, 2011)を見出している。

このような研究を実施する過程において、申請者らは脂質メタボローム解析を用いた研究において、生後早期における BDNF ノックアウトマウスの脳を調べたところコレステロール由来の代謝物である 24-ヒドロキシコレステロール（24HC）が特異的に減少していることを見出し、さらに培養神経細胞を用いた実験によって、24HC の合成酵素が特異的に誘導されることを発見した。24HC は血中に放出されることが示唆されていることから、生後においてシナプスが発達する時期に BDNF の発現が上昇し、その結果、実際にシナプスが形成される過程において、24HC が生産されると予想される。そのため、24HC の血中の量を調べることにより、間接的にシナプスの発達過程をモニタリングできる可能性が考えられた。このような結果より、本研究では、BDNF がシナプス形成過程に発現上昇し、その影響により発現変動する因子を調べることによって、24HC と同様にシナプス発達を示せるマーカーを網羅的に探索できるのではないかと考えた。

そして、それらの探索を行うとともに、得られた候補と 24HC が実際の脳において、ストレス依存的に発現変動することの確認を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、シナプス発達期の神経細胞において、BDNF 依存的に発現上昇する遺伝子を網羅的に解明し、その中から、マーカーとなり得る分子の探索を第一に実施した。対象とする遺伝子は、分泌される低分子化合物の代謝に関与する遺伝子、また近年では、脳脊髄液中に放出される蛋白質にも注目が集まっているため、分泌性蛋白質の遺伝子に注目した。これらの探索の後、発培養神経細胞を用いた研究により、その遺伝子が変動するメカニズムの解明を実施した。加えて、すでに BDNF によって変動するマーカー候補分子である 24HC も加え、実際の脳において、ストレスを受容した際に発現変動するのかを調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 大脳皮質由来の培養神経細胞を用いた BDNF 依存的な遺伝子の網羅的解析

胎生 20 日齢の妊娠ラットより大脳皮質由来神経細胞を調整し、5%HS および 5%FBS 含有の DMEM で培養を開始した。翌日、培地を Neurobasal 培地に交換し、適時培地交換を行い、培養 6 日目に BDNF を添加した。培養 8 日目に神経細胞を回収し、RNeasy キットを用いることにより Total RNA を取得した。なお、本培養では、グリア細胞の混入を避けるため、増殖性の細胞を死滅させる処理を実施している。

Total RNA の取得に続いて、polyA ビーズを用いて mRNA のみを精製した後、イルミナ社の次世代シーケンサー用のサンプルの調整を行った。具体的には、RNA の断片化を実施した後、逆転写反応によって ssDNA を取得し、さらにそれをもとに dsDNA を合成した。続いて、産物末端の平滑処理、A 付加などを行った後、アダプターを付加した。その後アダプターを解列させ、これを鋳型として、インデックス付きのプライマーにより増幅を行った。このようにして得られた次世代シーケンサー用サンプルのクオリティを PCR 産物の電気泳動や産物を鋳型とした qPCR などによって確認し、その後、シーケンスを実施した。

シーケンスによって得られた FASTQ 形式のファイルより、良質なリードのみを選別し、その後 Bowtie または HISAT2 等を用いてリファレンスゲノムへの貼り付けを行い、SAM ファイルを取得した。続いて SAMMATE もしくは SAM ファイルを BAM ファイルに変換した後、Stringtie を用いて

遺伝子ごとの発現量の集計を行った。尚、リファレンスには Ensembl または USCS 由来のラットのゲノム配列とアノテーションデータを使用した。

これらの結果、BDNF 依存的に発現変動する候補遺伝子を網羅的に見出した。

#### (2) BDNF 依存的に発現変化する遺伝子の薬理的な解析

次世代シーケンサーを用いた実験により得られた遺伝子が BDNF によって発現変動することを確かめるために、改めて大脳皮質由来培養神経細胞より RNA を調整し、これをもとにリアルタイム PCR を実施し、注目する遺伝子の発現変動が再現できるかどうかを確認した。

#### (3) 母子分離ストレス負荷モデルにおけるマーカー候補分子の発現変動の解析

Sprague-Dawley ラットを用いて、生後 2 日目から 6 日目の間、一日当たり計六時間の母子分離を実施した（三時間の母子分離後を二回）。生後 7 日目に三時間の母子分離を与えた後、麻酔下で生食による還流を行い、脳の冠状断面（1mm）を作成した。それぞれの切片から BDNF の機能と関連の深い海馬と mPFC (medial prefrontal cortex) に相当する領域を取得した。その後、total RNA を精製し、と同様にリアルタイム PCR によって注目する遺伝子の発現変動の有無を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大脳皮質由来の培養神経細胞を用いた BDNF 依存的な遺伝子の網羅的解析

BDNF によって 3 倍以上発現上昇が得られる遺伝子を 120 個見出すことに成功した。逆に発現低下する遺伝子も多数見出すことに成功した。最も発現上昇した遺伝子は EGR2 であり、約 46 倍発現上昇することが明らかとなった。この遺伝子は BDNF に反応する転写因子として広く知られていることから、実験結果が妥当であることを確認できた。BDNF によって発現誘導されることが知られていない遺伝子が多く含まれ、分泌蛋白質や酵素も複数存在することが確認できた。BDNF に誘導される分泌蛋白質としては、大脳皮質の抑制性の神経細胞に発現している CRHBP を同定することに成功した。また、レチノイン酸代謝酵素なども見出され、これらが 24HC に加えて BDNF 依存的に発現変動する分泌性のマーカー、またはマーカー分子の量を変動させる要因となりうるが見出された。

加えて、BDNF によって発現誘導される機能が未知である遺伝子も複数見出すことに成功した。

#### (2) BDNF 依存的に発現変化する遺伝子の薬理的な解析

上記の実験において見出された遺伝子の BDNF 依存的な発現変動をリアルタイム PCR によって改めて確認した。実験の結果、CRHBP やレチノイン酸代謝酵素が、次世代シーケンサーを用いた研究結果と同様、BDNF によって発現誘導されることが確認できた。そこで、24HC および CRHBP について、BDNF がどのようなシグナル伝達系を介してこれらの発現を誘導するかを調べた。その結果、予想外にも 24HC の合成酵素はシグナル伝達系の阻害剤によっては、発現上昇することが確認できた。一方、CRHBP は MEK の阻害剤やヒストンメチル化酵素の阻害剤によって BDNF による発現誘導が阻害されることが明らかとなった。

また、BDNF 依存的に発現誘導される機能が理解されていない因子についても同様の解析を実施した。この中で、機能未知遺伝子 X は BDNF 添加後に遺伝子発現がゆっくりと上昇し、この上昇が MEK 阻害剤で部分的に抑制されることが明らかになった。さらに機能未知遺伝子 Y は、BDNF 添加後 2 時間以内に急上昇し、その後、発現低下することを見出した。前者は BDNF によって促される神経細胞の長期変化に、後者は BDNF によって誘導される短期的な変化に寄与するものと予想された。

#### (3) 母子分離ストレス負荷モデルにおけるマーカー候補分子の発現変動の解析

母子分離ストレスを生後 2 日目より 6 日まで付加すると、大脳皮質をはじめとする広い領域において BDNF の発現が低下する。そこで、この時期の大脳皮質と海馬において、本研究で注目する 24HC の合成酵素やレチノイン酸代謝酵素が変動するかを確認した。その結果、海馬における 24HC 合成酵素は、ストレス負荷により有意に減少することが確認された。しかしながら、大脳皮質においては、有意な変動が認められなかった。この結果は、母子分離ストレスによって 24HC の合成酵素の発現が少なくとも脳の一部では低下することを示している。母子分離ストレスの影響の強度が脳の部位や時期によって異なりうることを考えると、今回の結果は非常に有意義であると考えられた。脳へのストレスがより強い場合や長期にわたる場合などの条件を今後検討し、24HC 合成酵素の低下が強く、脳全体的にみられる条件を確認する必要があると考えられた。一方、母子分離ストレスを受けたラットの脳において、予想外にもレチノイン酸代謝酵素は減少するのではなく、上昇することを確認した。これは、レチノイン酸代謝酵素の発現が BDNF だけではなく、他のストレス要因によっても変化するためであると考えられた。今後の研究によって、母子分離ストレスとレチノイン酸代謝酵素の発現変化の関係をより詳しく調べる必要があると考えられた。

以上のように予想外な結果も存在したが、少なくとも母子分離ストレス負荷モデルにおいて、

低分子を代謝する二つの酵素の発現が変動することを本研究によって確認することができた。特に 24HC 合成酵素が、実際にストレスを受容した発達過程の脳において減少することを確認できた意義は大きい。今後は、血中における 24HC を高感度に測定するための系を構築し、24HC が実際に BDNF 依存的なシナプス発達の指標となりえることを確認する研究を実施する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jamal M, Ito A, Tanaka N, Miki T, Takakura A, Suzuki S, Ameno K, Kinoshita H.	4. 巻 65
2. 論文標題 The Role of Apolipoprotein E and Ethanol Exposure in Age-Related Changes in Choline Acetyltransferase and Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in the Mouse Hippocampus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 84-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12031-018-1074-6	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 -
1. 著者名 Ono J, Fushimi S, Suzuki S, Ameno K, Kinoshita H, Shirakami G, Kabayama K	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of the volatile anesthetic agent isoflurane 1 on lateral diffusion of cell membrane proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1127-1134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Adachi N, Suzuki S, Matsuoka H, Fushimi S, Ono J, Ohta KI, Hirai Y, Miki T, Koshimizu H.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Corticotropin-releasing hormone-binding protein is up-regulated by brain-derived neurotrophic factor and is secreted in an activity-dependent manner in rat cerebral cortical neurons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14310	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 -
1. 著者名 Abe H, Ishioka M, Fujita Y, Umeno A, Yasunaga M, Sato A, Ohnishi S, Suzuki S, Ishida N, Shichiri M, Yoshida Y, Nakajima Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Yuzu (Citrus junos Tanaka) Peel Attenuates Dextran Sulfate Sodium-induced Murine Experimental Colitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oleo Sci.	6. 最初と最後の頁 335-344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess17184	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 -

1. 著者名 Ohta KI, Suzuki S, Warita K, Kaji T, Kusaka T, Miki T.	4. 巻 141
2. 論文標題 Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the hippocampus during early brain development.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 179-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.13977	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし
------

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	安達 直樹 (Adachi Naoki)  (00450601)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第三部・客員研究員  (82611)	
研究分担者	三木 崇範 (Miki Takanori)  (30274294)	香川大学・医学部・教授  (16201)	
研究分担者	太田 健一 (Ohta Kenichi)  (50403720)	香川大学・医学部・助教  (16201)	