

令和元年6月24日現在

機関番号：34104

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19225

研究課題名(和文)腸内細菌攪乱マウスの母乳解析に基づく仔の脳発達を促進する物質の網羅的探索

研究課題名(英文)Exploration for the substance to promote brain development of offspring on the basis of analyses on the quality of mother milk of a mouse model with perturbed gut microbiota

研究代表者

栃谷 史郎 (TOCHITANI, SHIRO)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・准教授

研究者番号：90418591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス母体腸内細菌を非吸収性抗生剤投与により攪乱する「母体腸内細菌攪乱モデル」を作成し、その仔に低活動や過度に壁沿いを好む空間嗜好性等の行動の変容を観察した。本研究では母体腸内細菌攪乱モデルにおいて母乳の質に変化が生じる可能性を様々な観点から検討した。母体腸内細菌攪乱モデルにおいて、オリゴ糖の濃度など母乳の質の変化が観察された。オリゴ糖をマウス仔に与えると行動に変化が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は母体腸内細菌攪乱モデルと対照群との母乳の質の比較を基に仔の脳発達に大きな影響を与える可能性がある物質の探索を行った。その候補物質としてオリゴ糖を得、さらにオリゴ糖の投与により仔の行動に変化が生じることを見出した。これらの結果は母親が周産期に曝露される環境により母乳の質が変化する可能性などを示しており、子の脳発達に影響を与えるような母乳の質を担保するにはどのような母体環境が適切かを解明する研究につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have established a mouse model in which maternal gut microbiota is perturbed by administering a cocktail of antibiotics to pregnant dams (perturbed maternal gut microbiota model: PMGM model). The offspring of this PMGM model exhibit apparent behavioral alterations (Tochitani, 2016). To elucidate the mechanisms underlying these behavioral alterations, we compared the quality of mother milk of PMGM model with that of mother milk of control mice by various methods. The results showed that there is a difference in the concentration of a few oligo saccharides. Based on this finding, we next examined whether oligosaccharide administration rescues the behavioral alterations of the offspring. The results showed that the alterations of the offspring of the mouse model is partially ameliorated. These results suggest that the intervention by oligosaccharide can help to facilitate the brain development of offspring.

研究分野：神経科学

キーワード：神経発達 母乳 母体腸内細菌攪乱モデル メタボローム オリゴ糖 介入試験

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

## 1. 研究開始当初の背景

新生児中枢神経系の発達と母乳を介して与えられる栄養素の関係は未だ十分に明らかではない。児の脳の健全な発達のために新生児期に摂取すべき栄養に関する指針を得るには母体栄養と中枢神経系の生後発達の関係を丹念に明らかにしていく必要がある。

研究代表者は、母体腸内細菌叢が重要な周産期母体環境の一つであると考え、周産期母体腸内細菌叢の攪乱が、胎児、新生児の中枢神経系の発生にどのような影響を与えるかを明らかにする実験を行った。妊娠 9 日目～16 日目に非吸収性抗生剤を妊娠マウスに飲水投与し腸内細菌を攪乱した後、仔マウスを出産させ、離乳まで養育させた。その後、生後 4 週の子マウスに対して行動実験を行った。その結果、仔マウスが不安傾向や低活動などを呈することが明らかになった。さらに、正常な母親マウスの仔と腸内細菌の攪乱を受けた母親の仔を生後 1 日目に交換する cross-fostering 実験の結果は正常マウスから生まれ、腸内細菌の攪乱を受けた母親に養育された仔マウスが低活動や不安傾向を呈することを示し、妊娠期の母体腸内細菌の攪乱が出生後の仔マウスの脳の発達に影響を与え、その結果、仔の行動異常が生じることを示唆した(母体腸内細菌攪乱モデル: Tochitani *et al.*, 2016)。母体腸内細菌が関与する出生後の仔の精神神経発達過程を考えた時、周産期腸内細菌の攪乱が仔の行動異常に至るメカニズムとして、少なくとも次のことが考えられる。

1. 腸内細菌は代謝を介して、宿主の栄養摂取に寄与する。母体の腸内細菌が攪乱されると母乳の量、質が変化し、仔が十分な栄養を受けられなく、仔の脳発達が阻害される。
2. 仔はほぼ無菌の状態で出生し、産道を通る際から母親を初めとする周囲環境から仔の腸管に細菌が定着し、腸内細菌叢が形成される。母体の腸内細菌が攪乱されると仔の腸内細菌の定着に変化が生じ、その結果、仔の脳発達が阻害される。

さらに、母乳には腸内細菌の育成を促すオリゴ糖等が含まれ、母乳の質が仔の腸内細菌の定着に影響するなど、これらのメカニズムは相互に関連しうる。

## 2. 研究の目的

本研究においては母体腸内細菌攪乱マウスと対照群の母親マウスの母乳成分の比較解析を通じ、母体腸内細菌叢が母乳産生にどのような寄与をするかについて明らかにするとともに、腸内細菌攪乱母マウスの母乳で濃度が低下する化合物を、行動異常を呈す腸内細菌攪乱マウスの仔へ投与し行動が改善するか評価することにより、母乳に含まれる仔の脳発達を促進する物質の探索を行う。

## 3. 研究の方法

次の大きく 2 つの実験を行った。

### 1. 母乳成分比較実験

対照群、抗生剤投与群それぞれの母親から母乳を採取し、抗生剤投与により腸内細菌の攪乱を受けた母親の母乳で対照群の母乳に比べて有意に減少する物質の探索を行った。脂肪酸、オリゴ糖などの化合物に関し、網羅的に定量比較を行い、定量性としては絶対的なものではないことを念頭に置き、同条件における両群の母乳間の相対的な定量のつもりで結果を評価した。

### 2. 腸内細菌攪乱を受けた母マウスの仔への介入実験

実験1で見出された物質の腸内細菌攪乱を受けた母親の仔への投与により、腸内細菌攪乱マウスの仔の行動異常や脳の器質的变化、また腸内細菌の定着の変化が改善するかを検討した。

#### 4. 研究成果

研究代表者が確立した「母体腸内細菌攪乱モデル」においては仔が行動の変容を呈す。このモデルの母親マウスと対照群の母親マウスの母乳を採取した。仔が生後9日目に達する時点での母乳におけるタンパク量とトリグリセリド量を測定したところ、明白な差異は認められなかった。ついで、研究分担者に依頼し、糖質分析によく用いられる High Performance Anion Exchange chromatography-Pulsed Amperometric Detection

(HPAEC-PAD) 法により母乳中のオリゴ糖解析を行った。その結果、一部のオリゴ糖の母乳含有量が腸内細菌攪乱群で低下していることを見いだした。ただし、母乳中のラクトース濃度は変化していなかった。また、同じく生後9日目の母乳を用いてGC-MSを用いた母乳含有化合物の網羅的解析を行った。50種類強の化合物が検出されたが、一部の化合物を除き、両群間の明白な差異は認められなかった。明白な差異が認められた化合物も子が依存する栄養素とは考えにくいものであり、対照群と母体腸内細菌攪乱群の母乳の間で明白な質的な違いを示す含有物はオリゴ糖に限られた。

オリゴ糖の入手が可能であったため、オリゴ糖を母体腸内細菌攪乱モデルの仔へ生後5-14日目にかけて経口投与する介入試験を実施した。もともとの母体腸内細菌攪乱モデルの仔の腸内細菌叢については多様性の低下という特徴があることが分かっているが、腸内細菌叢の網羅的解析の結果、部分的ながら仔の腸内細菌叢の多様性が上昇する結果を得た。Lactobacillus 属を初めとして、いくつかの細菌属の占有率に変化が観察された。また、母体腸内細菌叢攪乱モデルの仔の行動には低活動や過度に壁沿いを好む空間嗜好性などの特徴があるが、仔への行動実験の結果、一部の行動に限っては顕著に正常な方向へ変化する結果を得た。

オリゴ糖そのものをマウス仔は直接利用できない。仔へのオリゴ糖投与による仔の腸内細菌叢への介入が仔の行動を変化させたことは、母体腸内細菌攪乱モデルの仔の行動の変容の原因が腸内細菌叢の変容に起因すること、また母体腸内細菌攪乱に起因する母乳オリゴ糖の濃度変化が母体腸内細菌攪乱モデルの仔の腸内細菌叢変容のメカニズムの1つである可能性を示唆する。また、オリゴ糖は乳腺でラクトースが修飾を受け、合成される。本研究の結果は乳腺におけるラクトース修飾に周産期に母体が曝露される環境要因が関連することを示唆する点で興味深く、子の脳発達に影響を与えるような母乳の質を担保するにはどのような母体環境が適切かを解明する研究につながる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nelissen TP, Bamford RA, Tochitani S, Akkus K, Kudzinskas A, Yokoi K, Okamoto H, Yamamoto Y, Burbach JPH, Matsuzaki H, Oguro-Ando A. CD38 is required for dendritic organization in visual cortex and hippocampus. *Neuroscience* 372, 114-125, 2018 年 .

栃谷 史郎 母と子をつなぐタウリンと腸内細菌—子の脳発達における役割. *アミノ酸研究* 11(1), 5-12, 2017 年 .

Tochitani S. Functions of maternally-derived taurine in fetal and neonatal brain development.

〔学会発表〕(計 16 件)

栃谷 史郎 母親の腸内細菌と子どもの脳の発達. 鈴鹿医療科学大学 薬学部 第 14 回健康講座 2019 年 3 月 9 日.

栃谷 史郎 神経発達障害のモデル動物の現状と展望 - 母子関係を基盤とする脳発達の観点から. 日本行動科学学会第 35 回ウインターカンファレンス 2019 年 2 月 28 日.

栃谷 史郎 周産期母体腸内細菌と児の脳発達 母体腸内細菌攪乱モデルマウス の作成と解析 . SUMS-NITS 医工連携研究会 2019 年 2 月 1 日.

栃谷 史郎 Physiological and behavioral alterations associated with perturbation of gut microbiota of mouse dams during perinatal periods . The 15th International Society for Tryptophan Research (ISTRY) Conference 2018 年 9 月 19 日.

栃谷 史郎 マウス母体腸内細菌叢攪乱モデルを用いた脳発達促進を目的とするオリゴ糖カクテルによる介入法の検討. 第 7 回日本 DOHaD 学会 2018 年 8 月 18 日.

栃谷 史郎、塚原 隆充、長田 昌士、小泉 聡司、片山 高嶺 母体腸内細菌攪乱モデルの仔において母乳オリゴ糖は腸内細菌定着と腸内細菌依存的神経発達に影響を与える. 第 41 回日本神経科学大会 2018 年 7 月 28 日.

栃谷 史郎 Establishment of intervention method using a cocktail of milk oligosaccharide to promote brain development of offspring in a mouse model inheriting perturbed maternal gut microbiota. 2018 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting 2018 年 6 月 29 日.

栃谷 史郎、塚原 隆充、長田 昌士、小泉 聡司、片山 高嶺 マウス母体腸内細菌叢攪乱モデルの母乳オリゴ糖解析とオリゴ糖カクテルを用いた仔腸内細菌叢への介入法の検討. 第 22 回日本腸内細菌学会 2018 年 5 月 31 日.

栃谷 史郎 GABA<sub>A</sub> receptor activation by maternally-derived taurine underlies the temporal regulation of cellular properties of the neural progenitors in the mouse developing cortex. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience 2018 年 5 月 24 日.

栃谷 史郎、塚原 隆充、長田 昌士、小泉 聡司、片山 高嶺 母体腸内細菌攪乱モデルを用いた新生児期オリゴ糖カクテル投与の仔脳発達への影響の評価. 第 72 回日本栄養・食糧学会 2018 年 5 月 13 日.

栃谷 史郎 周産期腸内細菌攪乱に伴う母体生理、行動の変容. 第 38 回トリプトファン研究会 2017 年 12 月 3 日.

栃谷 史郎 母と子を結ぶタウリンと腸内細菌-児の脳発達における機能. 平成 29 年度鈴鹿医療科学大学薬学部セミナー(日本薬学会東海支部講演会) 2017 年 10 月 13 日.

栃谷 史郎、川瀬 貴博、塚原 隆充 周産期母体腸内細菌攪乱モデルにおける血漿中アミノ酸濃度の変化. 日本アミノ酸学会第 11 回学術集会 2017 年 10 月 1 日.

栃谷 史郎 The functions of maternal gut microbiota linking mother with offspring during perinatal periods. 第 60 回日本神経化学学会大会 シンポジウム「脳腸相関からみた神経化学」 2017 年 9 月 8 日.

栃谷 史郎 母と子をつなぐ腸内細菌とその機能. 第 6 回日本 DOHaD 学会 シンポジウム「精神・神経疾患分野 DOHaD 研究の最新の知見」 2017 年 8 月 28 日.

栃谷 史郎 母と子をつなぐタウリンと腸内細菌-子の脳発達における役割. 第 7 回日本アミノ酸学会 夏のシンポジウム 2017 年 8 月 18 日.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/tochitani/>

[https://www.suzuka-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/01/hr\\_tochitani.pdf](https://www.suzuka-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/01/hr_tochitani.pdf)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：片山 高嶺

ローマ字氏名：KATAYAMA, TAKANE

所属研究機関名：京都大学

部局名：生命科学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：70346104

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。