

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08306

研究課題名(和文) 母体低栄養が脳皮質構築に与える影響とその機能異常の解析

研究課題名(英文) Effects of calorie restriction in utero on cerebral cortical histogenesis and postnatal behavior

研究代表者

三橋 隆行 (Mitsubishi, Takayuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80338110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、母体低栄養と生後脳皮質機能異常について投射神経細胞数と神経幹細胞の分裂動態解析を糸口に明らかにし、生後精神疾患発症との関連性について研究を展開することを目標とした。2016～2018年に実施した先行研究において、異常が観察されなかった各種実験の観察時期を再度検討して解析したところ、脳皮質発生より早期の神経幹細胞において分化誘導の確率の異常を認めた。さらに思春期に相当する仔マウスにおいて行動解析を実施した結果、不安を反映していると考えられる行動異常を複数の行動バッテリーにおいて検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的特色は、神経幹細胞の細胞周期調節機構と脳皮質形成過程を胎児生体内において解析する点である。これら解析方法は煩雑で時間がかかる点が欠点であるが、培養細胞などと比較しより正常に近い状態で解析が行える点で重要な知見が得られる可能性が高い。また現在、日本人の出生体重が減少傾向にあり、若年女性のエネルギー摂取量の減少と高いやせ率が社会的問題となっている。同年代で妊娠した女性においても胎児が受け取るエネルギー量が減少している可能性が高く、本研究で得られた成果は妊娠期の食事制限が生後の子どもの神経発達に悪影響を及ぼす可能性を初めて示したものであり、大きな社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this analyses, we evaluated effects of calorie restriction in utero on cerebral cortical histogenesis together with postnatal behaviors in offspring. In previous report, we have found no change in the probability of leaving cell cycle (Q fraction) of neural stem cells and behaviors in the offspring of calorie-restricted group compared to those of controls. Thus, in this analysis, we analyzed 1) the cell cycle kinetics of neural stem cells in earlier phase of neurogenesis, and 2) behaviors of postnatal adolescent mice that were exposed to calorie restriction. We found that the Q fraction was abnormally increased on embryonic day (E) 12 in the calorie-restricted group compared to that of controls. Additionally, we detected increased level of anxiety in the calorie-restricted group compared to that of controls. The abnormal behavior was observed during the age of adolescence and not in the young adult.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経発生 神経幹細胞 精神疾患 思春期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高次脳機能の中枢である大脳皮質は、胎児側脳室周囲にある神経幹細胞より神経細胞やグリア細胞が産生されることで形成される。大脳皮質の機能不全は発達障害や精神疾患の原因となりうるが、ヒトに実施可能な臨床検査 (MRI・脳波等) では異常を検出できない症例がほとんどである。さらに近年の報告から、単一遺伝子の機能異常のみでこれら疾患の発症理由を説明することが困難である点が明らかとなっている。つまり、複数の遺伝子異常の組み合わせや、胎内環境 (栄養・感染等) の異常が病態発現に与える影響を解析する重要性が高まっていると考える。以上に加えて我々の複数の先行研究の結果から、遺伝子異常や有害な環境因子・薬物の胎内曝露が神経幹細胞の細胞分裂動態に異常を生じ、その結果大脳皮質構築異常を生じることがマウスを用いた動物モデルで判明している (Mitsuhashi T, et al., PNAS 2001, Goto T, et al., Dev Neurosci 2004, Akamatsu W, et al., PNAS 2005, Mitsuhashi T, et al., PNAS 2010, Fujimura K, et al., J Neurosci 2016)。

現在、日本人の出生体重が減少傾向にあり、同時に 20・30 代女性のエネルギー摂取量の減少とその結果としての高いやせ率が社会的な問題となっている。以上より、同年代で妊娠した女性においても、胎児が胎内において受け取るエネルギー量が減少している可能性が強く示唆される。

2. 研究の目的

そこで本研究では、胎内低栄養状態が神経幹細胞の細胞分裂動態および大脳皮質構築に与える影響と、生後の行動に及ぼす影響についてマウスを用いて解析した。特に、皮質構築異常が認められた場合、生後仔マウスにおいて発達障害様の行動異常が検出できるかについて重点をおいて解析した。

3. 研究の方法

マウス大脳皮質の神経細胞産生過程に相当する胎生 11 日から 17 日の期間、妊娠マウスの食餌を制限することで胎内低栄養状態を再現した。低栄養に曝露された胎児大脳壁内にある神経幹細胞の細胞周期長・分化誘導の確率 (Q 値) を測定し、神経細胞産生数に与える影響を検討した。また、生後マウスの大脳皮質内において、神経細胞の数・分布を免疫組織染色・電子顕微鏡により検討した。さらに、マウスの思春期に相当する生後 4 週齢および成体 (生後 8 週齢) において行動解析を行った。具体的にはオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、明暗箱試験、Y 字迷路試験、音刺激に対する驚愕反射測定、3 コンパートメント社会行動試験、居住者 - 侵入者試験、チューブドミナンス試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 胎内低栄養状態に曝露された生後 21 日目のマウスにおいて、大脳皮質が対照群と比較し菲薄化していることが判明した (図 1)。

(2) 胎内低栄養状態に曝露された胎生 12 日目の大脳壁内神経幹細胞より RNA を抽出して miRNA 発現量を解析した結果、線虫において栄養状態に応じて発現が変化することが知られている miRNA (Kasuga H, et al., Nature 2013) の哺乳類ホモログが胎内低栄養により減少する点を明らかにした。

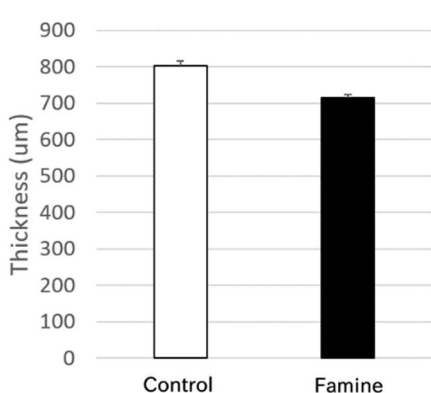


図 1 胎内低栄養曝露マウス一次体性感覚野における大脳皮質厚

(3) 胎生 12 日目の神経幹細胞において、低栄養曝露群の Q 値が対照群と比較し増加している点を明らかにした。さらに胎生 16 日目の大脳壁内で、中間型神経幹細胞の分子マーカーを発現する細胞が増加していた。この分子マーカーの発現調節には、前述の特定 miRNA が関与していることが報告されており (Nowakowski TJ, et al., PNAS 2013)、関連性が示唆された。

(4) 行動解析を実施した結果、低栄養曝露群では生後 4 週齢においてオープンフィールド試験での中心滞在時間の減少 (図 2 (A))、高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在比率の減少 (図 2 (B))、明暗箱試験における明箱滞在時間の減少 (図 2 (C))、音刺激に対する驚愕反射の亢進が観察された。また社会的な新奇性・優位性において対照群と比較して異常を認めた。一方、ワーキングメモリーには異常を認めなかった。これらの結果より、

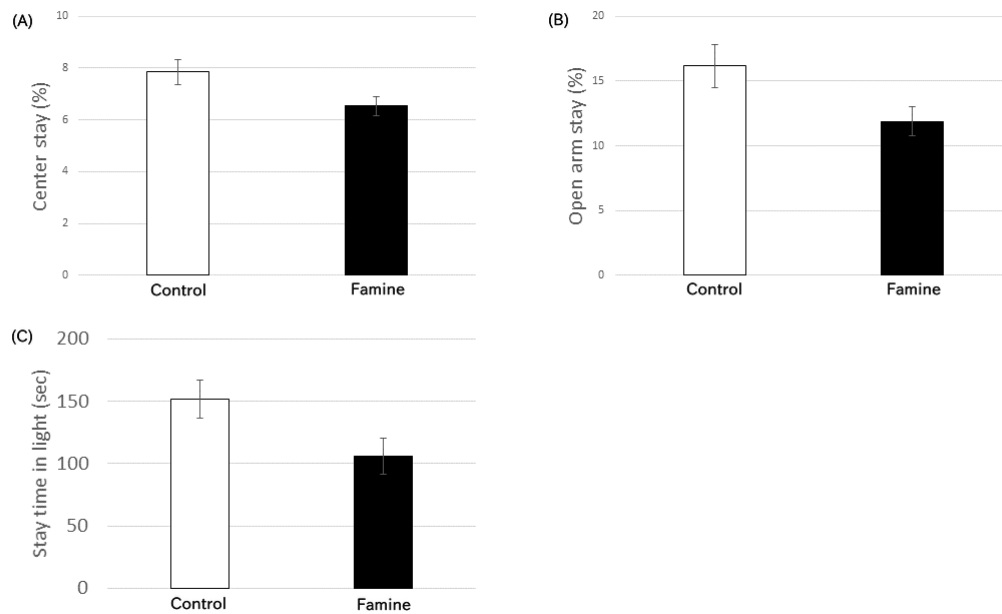


図 2 胎内低栄養曝露マウス (4 週齢) の行動解析 (A)オープンフィールド試験での中心滞在比率、(B)高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在比率、(C)明暗箱試験における明箱滞在時間

胎内低栄養曝露マウスでは生後 4 週齢で不安が亢進し、社会性に異常が生じていると考えられた。

生後 8 週齢では、生後 4 週齢で観察された中心滞在比率の減少は認めなかった。しかし音刺激に対する驚愕反射の亢進は引き続き観察された。また社会性と社会優位性に関しても、生後 4 週齢より程度は弱いものの、有意に異常が認められた。以上より、胎内低栄養曝露マウスでは、成体となっても社会性に異常があると考えられた。

胎内低栄養に曝露された胎児では神経細胞産生過程の前期において分化誘導が異常に促進されることで、後半に産生される神経細胞数が減少し大脳皮質が菲薄化する点を明らかにした。これらの結果は、当研究室で確立した神経幹細胞の分裂増殖・分化誘導に関する数学モデルによって説明可能である。すなわち、神経細胞産生過程早期に Q 値が異常増加すると最終的に産生される神経細胞総数が減少する (Caviness VS, et al., *Trend Neurosci* 1995, Takahashi T, et al., *Dev Neurosci* 1997)。

以上より、胎内低栄養への曝露により神経幹細胞の細胞分裂動態に異常を生じ、その結果大脳皮質構築異常を生じる点、さらにそれに起因すると考えられる行動異常が認められる点を明らかにした。これらの結果は、ヒトにおいて妊娠期の食事制限が生後の子どもの神経発達に悪影響を及ぼす可能性を示唆する。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibata S, Iseda T, Mitsuhashi T, Oka A, Shindo T, Moritoki N, Nagai T, Otsubo S, Inoue T, Sasaki E, Akazawa C, Takahashi T, Schalek R, Lichtman JW and Okano H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Large-Area Fluorescence and Electron Microscopic Correlative Imaging With Multibeam Scanning Electron Microscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Neural Circuits	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2019.00029	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 該当する

〔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	高橋 孝雄 (Takahashi Takao) (80171495)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	
研究分担者	久保 健一郎 (Kubo Kenichiro) (20348791)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	
研究分担者	芝田 晋介 (Shibata Shinsuke) (70407089)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------