

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591203

研究課題名(和文) 周生期ストレスと生活習慣病発症機序に関する研究 - 脳と脂肪組織のクロストーク解析 -

研究課題名(英文) Etiological mechanisms of perinatal stress on lifestyle-related diseases pathogenesis

研究代表者

三木 崇範 (Miki, Takanori)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30274294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：生後早期の母仔分離ストレスは、大脳・小脳・海馬の神経栄養因子とその受容体の発現量に影響を与えた。生後早期の母仔分離は、部位特異的に様々な神経栄養因子と受容体の発現量に影響を与え、神経回路網形成や神経発達の順序に少なからず影響を及ぼすことを明らかにした。これが行動異常の原因の一つとして考えられる。一方、脂肪組織のミトコンドリアのエネルギー代謝関連因子のレベルに異常を惹起した。白色脂肪の増殖と熱産生を抑えられた褐色脂肪の特性が見られた。これは、将来の肥満を示唆するものである。脳発達期のストレスは、脳と末梢脂肪組織の生物学的特性に変化を惹起し、将来の生活習慣病の基盤となる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to examine the effects of early postnatal maternal separation stress on the brain development, biological properties of adipose tissue, and the interactions between them. Wistar rats were separated from their mothers in early life. The level of various neurotrophic factor ligands/receptors in the cerebral cortex and cerebellum showed abnormal time-dependent fluctuations. Given that these factors play important roles in brain development, it can be speculated that the altered expression of these factors induced by maternal separation may interrupt normal brain development and ultimately lead to functional disruption. Furthermore, there was a significant change in the level of various mitochondrial energy-expenditure molecules. Given that these molecules influence the mitochondrial metabolism, our study indicates that early postnatal maternal deprivation can influence the fate of adipose tissue proliferation, presumably leading to obesity later in life.

研究分野：小児科

科研費の分科・細目：胎児新生児医学

キーワード：脳発達 肥満 母仔分離ストレス 神経栄養因子 生活習慣病 脂肪組織 エネルギー代謝 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

生後早期の脳発達時期とくに離乳前に、母仔分離(ストレス曝露)された動物(ラット)の海馬では、脳由来神経栄養因子(BDNF)が、異常な動態変化を呈することと、成獣期に体重増加を認める旨の報告をした(Kuma et al., 2004)。本研究では、先行研究を進展させるために、この結果の機序の解明を行うことを目的とした。つまり、「脳発達期のストレス曝露を将来の肥満の分子基盤を探る」に至った。本研究では、上記を目的として、脳(中枢)と脂肪組織(末梢)のクロストークを核とした遺伝子の解析を行い、ストレスが惹起する生活習慣病発症の分子基盤を、「中枢と末梢の相互作用(クロストーク)から解明」することを目的とした。

## 2. 研究の目的

胎児期の育成環境の重要性は、Barker 説で周知のごとく、胎生期に異常な栄養環境(低栄養)に曝露されると胎児は、その環境に適合するようにリセットされ、その結果として将来生活習慣病が、発症しやすくなると考えられ、fetal programming と呼ばれる。胎児期に発育遅延・異常な fetal programming を惹起する要因として、低栄養が注目されている。生存のための fetal programming は、インスリン抵抗性、レプチン抵抗性等の機能的再編が起こり、将来肥満、糖尿病、高血圧等が発症しやすいという Barker 仮説である。

我々は、周生期ストレス曝露モデルとして、新生仔動物と母獣を離乳前に分離する「母性剥奪症候群」の実験動物モデルの作製に成功し、このモデル動物における内分泌環境変化、神経栄養因子発現レベル、神経細胞数の変化を指標として解析した。母仔分離は、仔にとって多大なストレスである。悪い養育環境が、子供の脳やその後の身体発達・成長に及ぼす影響についての研究は限られている。養育環境が子供の脳と身体発達に与える影響を科学的に捉えようとする研究は始端の途にあるといえよう。我々は、生後早期に連続6日間、3時間/日新生仔ラットを母獣から分離した。この動物では神経栄養因子(BDNF)の変動と、60日齢での体重が増加することを確認している。このエビデンスの分子基盤を探ることが本研究の目的である。更に、本研究は、脳発達時期における、「ストレス曝露と成長後の体重増/肥満」の関係を、fetal programming の異常と捉え、「脳」と「脂肪細胞」の両面から解明するものである。

## 3. 研究の方法

### 1) 母仔分離実験動物モデル作製

申請者が先に確立した、母仔分離モデル動物の作製法に準じてモデル動物を作製する(Kuma et al., 2004)。母仔分離は、生後(PND)10-15 或いは、2-21 の2群を設ける。これらの動物から脳と脂肪組織(褐色脂肪・白色脂肪)を採取する。

## 2) 脳の神経栄養因子と受容体の発現解析

PND10-15, 3h/day 母仔分離したラットの脳皮質、小脳、海馬における NGF(nerve growth factor), BDNF(brain-derived neurotrophic factor), OMgp (oligodendrocyte myelinated associated glycoprotein), IGF-1 (insulin-like growth factor) とその受容体 TrkA, TrkB, p75NTR, NgR, IGF-1R の発現量を経時的に解析した。更に、PND 2-20, 6 h/day 分離群においては、中脳縫線核(RN)におけるセロトニンとその代謝産物を HPLC で測定した。併せて、海馬、扁桃核、内側前頭野における、セロトニン 1A、2A 受容体の発現量を解析した。これらの解析は、定法に従って、HPLC, real-time RT-PCR, Western blot にて解析した。

## 3) 脂肪組織(白色脂肪と褐色脂肪)のエネルギー代謝関連因子発現解析

PND10-15, 3h/day 母仔分離したラットの後腹膜・腎周囲の白色脂肪と、肩甲骨周囲の褐色脂肪にフォーカスを当てて解析した。白色脂肪、褐色脂肪ともに、エネルギー調節に關与する脱共役蛋白質-1(UCP-1)、UCP-1 の作用発現に關連する受容体 3 アドレナリン受容体(3-AR) また、細胞の運命(増殖/細胞死)に關わる蛋白質プロヒピチン(PHB)に着目して、発現量の動態変化から、脂肪組織への影響を考察した。脳と同様に変動遺伝子群の Real-time RT-PCR, Western blot 解析を行い、脂肪細胞のエネルギー代謝関連因子が新生仔期のストレス曝露により受ける影響を mRNA、タンパク質レベルで評価する。

## 4. 研究成果

### 1) 母仔分離ストレスが脳・小脳発達に与える影響

PND10-15, 3h/day 母仔分離したラットの脳皮質においては、BDNF/TrkB 系、IGF-1/IGF-1R 系の発現量は、PND16 と PND20 において、双系ともに対照群と比較して有意に増加していた。続いて PND30 においては有意差を認めなかった。更に、PND60 では、母仔分離群の発現量は低下していた。一方、小脳におけるこれらの因子の発現量は、脳皮質のそれとは全く異なった応答を示した。小脳では、PND16 においてのみ BDNF の発現量だけが増加していたが、それ以外の因子は有意な変化を示さなかった。更に、PND20、30、60 日齢いずれの日齢においても有意な差を呈しなかった。

本研究では、母仔分離ストレスによる脳への影響は、神経栄養因子とその受容体の発現量の動態変化から、脳皮質と小脳では異なる様式を呈することが明らかになった。BDNF と IGF-1 は共同して神経発達に影響を及ぼすことが報告されており、単独での神経系保護作用よりもより有効な神経系の応答と云えよう。脳皮質と小脳の発現の応答の違いは、現在不明であるが、神経新生 neurogenesis

の時期の違いに起因する可能性がある。つまり、大脳皮質の神経細胞は、例外なく胎生期に新生する。一方、小脳では、Purkinje細胞は、胎生期に神経新生が起きるが、顆粒細胞は出生直前（胎生期後半）から、生後数週間に亘る。これらの発生・発達時期の違いは、神経細胞の分子レベルでの発達・成熟にも表れ、これが神経栄養因子の発現応答に影響を及ぼしたと解釈できる。正常から逸脱した神経栄養因子の発現応答は、神経系回路網形成に少なからず影響を与えることが予想される。

続いて、小脳のBDNF/TrkBとミエリン関連タンパク質OMgpの発現は、PND16において発現量が有意に増加していた。しかし、その後PND30には対照群との有意差を認めなかった。BDNFとOMgpは、神経系の発達と成熟、特にミエリンの発達に深く関与することを鑑みると、本研究で得られた所見は、正常とは異なった時期（早期）のミエリンの増殖、髄鞘の早期形成を示唆する。先行研究で、正常よりも早期の髄鞘化が生じると後に行動異常が生じることが報告されている。これより、小脳で観察されたBDNF/TrkBとOMgpは、早期の髄鞘化を示唆する。詳細は、電子顕微鏡により髄鞘化の程度を組織定量しなければならぬが、髄鞘化と行動異常に関する重要な基礎的データであると考えられる。

## 2) 母仔分離ストレスとセロトニン神経系

幼若期は脳発達臨界期と言われる高次機能獲得に重要な期間を含んでいる。この時期の不遇な養育環境は神経回路網形成に障害を与え、それが成熟後の精神疾患や学習障害を惹起すると考えられる。本研究では、生後早期の母仔分離が脳発達に与える影響を神経回路網形成に関係の深いアミン神経系及び神経栄養因子の発現から検討した。

仔ラットの海馬、扁桃、前頭皮質を中心に分離期間中とその後のセロトニン(5-HT)神経系・神経栄養因子及びそれら受容体の解析を行った。また5-HTが関与する転写調節因子Egr-1とそれに発現制御されるグルココルチコイド受容体発現も併せて解析した。離乳前早期は、海馬、扁桃、前頭皮質において脳発達に重要な役割を持つセロトニンの代謝効率及び受容体発現の低下や脳由来神経栄養因子の発現低下が認められた。更にEgr-1とグルココルチコイド受容体発現の低下も同時に認められた。これら因子の変化は母子分離後の生後21日齢以降には見られず一過性のものであった。

成熟後と異なり脳発達臨界期における神経回路網形成は急速かつ厳密であることから、その時期でのこれら因子の変化は一過性であっても影響は大きく、既に我々が見出している情動異常（社会性低下・攻撃性増加・ストレスによる行動変化等）や学習障害を惹起する要因である可能性が示唆される。

## 3) 母仔分離ストレスと脂肪組織

我々の先行研究で、母仔分離された動物では成獣期に体重が増加することを報告している。脂肪細胞の遺伝子の約30%が、分泌型蛋白をコードしていることを考慮すると、これは、脂肪細胞が内分泌組織としての役割を有していることを示唆する。この報告に基づいて、本研究では、脂肪組織に焦点を当て、分子基盤を探った。

母仔分離(PND10-15, 3 h/day)の後、21日齢で離乳し、その後高脂肪食を給餌して飼育した。10週齢で、母仔分離群と対照群で体重に有意差を認めなかったが、脂肪組織中のミトコンドリアのエネルギー代謝関連因子を解析した。UCP-1/3-AR系の発現量に変化はなかった。一方、褐色脂肪においては、UCP-1/3-AR系のうち、3-AR発現量は有意に低下していたがUCP-1には有意差を認めなかった。PHBは増殖する細胞に著名な発現量が認められることを鑑みると、白色脂肪が増加するポテンシャルを有していることを意味する。一方、UCP-1は褐色脂肪細胞の細胞膜の3-AR受容体を介して機能を発現することを鑑みると、3-ARの低下は結果としてUCP-1の機能の低下につながる。褐色脂肪のUCP-1は、熱産生を通じてエネルギーを消費する。従って、母仔分離した動物では熱産生が抑えられ、結果としてエネルギー消費が減少し、脂肪が蓄積することになる。

以上の結果は、母仔分離は成長後の脂肪組織のミトコンドリアエネルギー代謝関連因子に影響を与え、最終的に脂肪が蓄積する方向に至ることが予想される。

## [総括]

生後早期の母仔分離は、脳の発達に部位特異的に影響をあたえ、神経回路網形成に大きく影響を及ぼすことを示唆し、これが行動異常の原因の一つとして考えられる。また、脂肪組織においては、白色脂肪の増殖と熱産生を抑えられた褐色脂肪の特性が見られた。これは、将来の肥満を示唆するものである。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Liu JQ, Kusaka T, Suzuki S, Ohta K, Warita K, Jamal M, Ueki M, Yakura T, Hosomi N, Takeuchi Y. Differential effects of neonatal maternal separation on the expression of neurotrophic factors in rat brain. II: Regional differences in the cerebellum versus the cerebral cortex. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 2013, 90:53-8. 査読有り

Miki T, Yokoyama T, Kusaka T, Suzuki S, Ohta K, Warita K, Wang ZY, Sumitani K, Bellinger FP, Tamai M, Liu JQ, Yakura T, Takeuchi Y. Early postnatal repeated

maternal deprivation causes a transient increase in OMgp and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination. J Neurol Sci, J Neurol Sci. 2014, 336:62-7. doi: 10.1016/j.jns.2013.10.007. 査読有り

Ohta KI, Miki T, Warita K, Suzuki S, Kusaka T, Yakura T, Liu JQ, Tamai M, Takeuchi Y. Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. Int J Dev Neurosci. 2014 33:15-21. doi:10.1016/j.ijdevneu.2013.10.007. 査読有り

Early postnatal maternal separation causes alterations in the expression of 3-adrenergic receptor in rat adipose tissue suggesting long-term influence on obesity. Miki T, Liu JQ, Ohta K, Suzuki S, Kusaka T, Warita K, Yokoyama T, Jamal M, Ueki M, Yakura T, Tamai M, Sumitani K, Hosomi N, Takeuchi Y. Biochem Biophys Res Commun. 2013, 442:68-71. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.005. 査読有り

Neonatal repetitive maternal separation causes long-lasting alterations in various neurotrophic factor expression in the cerebral cortex of rats. Lee KY, Miki T, Yokoyama T, Ueki M, Warita K, Suzuki S, Ohta K, Wang ZY, Jamal M, Yakura T, Liu JQ, Hosomi N, Takeuchi Y. (2012) Life Sci 90: 578-584, 2012. 査読有り

〔学会発表〕(計8件)

三木崇範、太田健一、鈴木辰吾、割田克彦、日下隆、横山俊史、劉俊騫、矢倉富子、玉井求宜、竹内義喜 生後早期の母子分離ストレスが、脂肪組織エネルギー代謝関連因子に及ぼす影響 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014.3.27-29 自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)

三木崇範、太田健一、鈴木辰吾、日下隆、劉俊騫、玉井求宜、矢倉富子、竹内義喜 幼若期の不遇な養育環境が引き起こす脳発達臨界期 AMPA 受容体動態の異常 第53回日本先天異常学会学術集会 2013.7.21-23 千里ライフサイエンスセンター(豊中市)

三木崇範、太田健一、鈴木辰吾、割田克彦、竹内義喜 脳発達の臨界期にてらした発達障害モデルの考察 - 胎児性アルコール症候群を例として - 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013.3.28-30 サポートホール高松・かがわ国際会議場(高松市)

三木崇範、太田健一、鈴木辰吾、割田克彦、

矢倉富子、劉俊騫、竹内義喜 生後早期の母子分離ストレスにより惹起される神経栄養因子/受容体発現レベルの変動(第2報) 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012.3.26-28 山梨大学甲府キャンパス(甲府市)

太田健一、三木崇範、鈴木辰吾、矢倉富子、劉俊騫、玉井求宜、竹内義喜 母子分離ストレスが脳発達期の海馬 GluR1 発現/リン酸化へ及ぼす影響 日本解剖学会第67回中国・四国支部学術集会 2012.10.20-21 山口大学医学部(宇部市)

太田健一、三木崇範、鈴木辰吾、矢倉富子、劉俊騫、竹内義喜 幼若期の不遇な養育環境が脳発達に与える影響 - 神経回路網形成に關与する因子の変化 - 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012.3.26-28 山梨大学甲府キャンパス(甲府市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三木崇範 (MIKI Takanori)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号: 302574294

### (2) 研究分担者

太田健一 (OHTA Kenichi)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号: 50403720

### (3) 研究分担者

鈴木辰吾 (SUZUKI Shongo)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号: 50451430

### (4) 研究分担者

横山俊史 (YOKOYAMA Toshifumi)  
神戸大学・農学研究科・助教  
研究者番号: 10380156

### (5) 研究分担者

日下隆 (KUSAKA Takashi)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50274288

### (6) 研究分担者

竹内義喜 (TAKEUCHI Yoshiki)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号: 20116619