

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：20104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500981

研究課題名(和文) 脳の発生および発達を制御する脂質栄養の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the lipid nourishment controlling the development of the brain

研究代表者

山本 達朗 (YAMAMOTO, TATSURO)

名寄市立大学・保健福祉学部・講師

研究者番号：90379389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期や乳児期の脳の発育において、母胎の栄養状態は重要である。しかし、栄養素の1つである脂質栄養の胎児期および乳児期の脳の発生・発達における詳細な機能は明らかになっていない。本研究では、胎児および乳幼児の脳の発達における脂質栄養の役割やその機能を解明するために、n-3系多価不飽和脂肪酸欠乏食を摂取した母胎生まれた仔の脳内の細胞組成や離乳期の行動様式を解析した。その結果、アストロサイトの細胞数減少や情動性における変化を観察した。

研究成果の概要(英文)：In the fetus and infant period, those nutrition depends on the nutritional state of maternal diet. Because brains develop well at these periods, it is affected by the nourishment state of the maternal diet. It is thought that the lipid, which is the component of the cell, affects the development of the brain, but the detailed function in the development of the brain at the fetus and infant period of the lipid nourishment is unclear. In this study, to elucidate a role of the lipid nourishment in the development of the brain of a fetus and infant brain, we performed morphological and behavioral analyses of the pups form the maternal that fed the n-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet. As a result, we observed astrocyte decrease in the cerebral neocortex and emotional instability in the n-3 polyunsaturated fatty acid deficient pups.

研究分野：神経解剖学

キーワード：脂質栄養 脳 神経細胞 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

妊娠期の母胎の適切な栄養摂取は、胎児の体の成長だけではなく、脳の発生や発達において重要である。例えば、第二次世界大戦末期のオランダのアムステルダムにおいては、ドイツ軍による町の封鎖によって深刻な飢餓が発生し、この時期に胎児であった子供が思春期に達した時の統合失調症の発症率が2倍に増加したことが報告されている。また、1960年前後に起きた中国の大飢饉でも、統合失調症において同様の報告がなされている。これらは、胎児期の栄養不足、すなわち母胎の栄養不良は、単なる胎児の成長だけではなく脳神経系の発生や発達、さらには統合失調症を含む精神疾患の発症に関わっていることを示している。

母胎は、胎盤を介して胎児に栄養素を供給している。栄養素のうち、糖と脂質は胎児のエネルギー源として重要な栄養素であり、母胎が適切な量および質を維持しながら、胎盤を介して胎児にそれらを輸送することは、胎児の健全な発育と密接に関係している。特に脂質は、必須脂肪酸の供給という重要な役割があり、胎児から成人、老人に至るまで健康的な生活を送るために必要不可欠な栄養素の一つである。脂質を構成する脂肪酸の摂取量は、食生活の変動による影響を受けやすいことが知られており、実際に日本人の脂肪酸摂取量は、過去に比べると魚類や大豆を摂取する量が減少していることから、欧米型つまりドコサヘキサエン酸などが属するn-3系多価不飽和脂肪酸(n-3 PUFAs)の摂取量が欠乏傾向にある。n-3 PUFAsは脳に豊富に存在し、神経細胞膜の構成などに関わっているが、n-3 PUFAsを欠乏した妊娠ラットの胎児脳に関する研究では、大脳皮質や海馬の層構造が乱れることが報告され(Coti Bertrand P et al. J Nutr. 2006, 136(6):1570-5)、母胎妊娠時のn-3 PUFAsが胎児の脳発生において重要であることが示唆された。また、分子生物学的研究においても、統合失調症と関連する遺伝子として脂肪酸結合タンパク質7(FABP7)が同定された(Watanabe et al. PLoS Biol. 2007, 5:e297)。FABP7は、不飽和脂肪酸の細胞への取り込みに関与するタンパク質であり、その遺伝子欠損はマウスにおいて恐怖・情動行動に異常をもたらすことが示された(Owada et al., Eur J Neurosci, 2006, 24:175-187)。これらの報告は、脂質栄養が、胎児や乳児の脳発生・発達に深く関わるだけではなく、成体期の精神状態または精神疾患の発症にも関与することを示している。しかし、研究開始時には、母胎から供給される脂質栄養が胎児または出生児の脳構造に与える影響と、同飼育環境で育てられた成体期動物の行動パターンについて、その関係性を報告したものは、申請者の知る限り国内・国外ともに存在していなかった。

2. 研究の目的

胎児期や乳児期の脳の発育において、母胎の栄養状態は重要である。しかし、栄養素の1つである脂質栄養の胎児期および乳児期の脳の発生・発達における詳細な機能は明らかになっていない。本研究は、妊娠期および授乳期に母胎が摂取する脂質栄養、特にn-3系多価不飽和脂肪酸に注目し、「胎児期および出生後の脳の神経細胞やグリア細胞の発生・発達における脂質栄養の機能や、母胎の脂質栄養摂取状態と出生児の成体期行動パターンとの関係性について明らかにすること」を目的とする。本研究は、脳の発生や発達の側面から、胎児や乳児の健やかな成長に必要な母胎の栄養摂取に関する方向性を示すことになり、栄養学的側面から見る神経科学研究領域の基盤を構築することができる。

3. 研究の方法

(1) n-3 PUFAs 欠乏胎児および乳児の作成

n-3 PUFAs 欠乏飼料の作成については、Coti Bertrand P らの研究(J Nutr. 2006, 136(6):1570-5)を参考とし粉餌を適宜調整する。粉餌に用いる脂質は、水素添加硬化ココナツ油とヒマワリ油とし、日本の食事摂取基準に4:1と定められているn-6/n-3比を272:1に調整することによりn-3 PUFAsが欠乏状態の飼料を作成する。雌マウスの交配週齢を10週齢と定め、作成した粉餌飼料を交配週齢の2週前または妊娠直後、出産直後より給餌し、体内脂肪酸組成がn-3 PUFAs欠乏となる妊娠期マウスまたは授乳期マウスを作成する。母胎の体内脂肪酸組成は、定期的な尾静脈血液採取により得られる赤血球細胞膜脂肪酸組成を解析する。交配に関しては、交配する週齢に達した雌と同等の週齢の雄を交配し、プラグ確認日を胎生0.5日目として妊娠期の飼育を行う。その後、適切な日齢において胎児や出生児の脳組織の採取を行う。胎児及び出生児の脳内脂肪酸組成についても解析し、比較を行う。このn-3 PUFAs欠乏マウスの作成は、各研究計画年度に必要な個体数を考慮しながら適宜行うものとする。

(2) 形態学的手法による脳発生・発達期の細胞局在の経時的解

脳は多くの細胞により作られているが、細胞の構成はいくつかの分類に分けることができる。例えば、神経細胞とグリア細胞や、興奮性の投射ニューロンと抑制性の介在ニューロンなどである。また、細胞によっては、発生する時期なども決まっており、神経細胞は主に胎生期、グリア細胞は生後に発生する細胞も存在する。本研究では、免疫組織化学法やin situ hybridization法を用いて、経時的に採取した脳サンプルの各部位に局在する細胞を同定し、n-3 PUFAs欠乏脳と正常脳の比較を行う。この研究によって、n-3 PUFAs欠乏脳に存在する神経細胞とグリア細胞

胞の比率や、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの比率などを詳細に解析する。必要に応じて、細胞の誕生日標識マーカーBrdUを投与し、各種抗体との二重免疫組織化学法を行うことによって、それぞれの細胞の発生運命に対するn-3 PUFAs欠乏の影響について検討する。最終的にはn-3 PUFAs欠乏脳の各種細胞の局在マップを作成し、n-3 PUFAs欠乏の脳の形態形成における影響について明らかにする。この研究に関しては、研究全般を山本達朗と山本綾子研究員の両名により遂行する。各種抗体などについては、現在研究室で用いられている抗体を用いるため、細胞局在マップ作成までの行程においては、問題なく進むと考えられるが、進まない場合は、他のメーカーの抗体を適宜選択し、明瞭な発現パターンが得られるまで十分に検討を行う。

(3) n-3 PUFAs 欠乏動物の行動学的解析

n-3 PUFAs 欠乏動物に関する行動学的研究は盛んに行われているが、成体期の研究が主であり(Catalan et al. Behav Neurosci. 2002, 116: 1022-31)、本研究のように妊娠前から授乳終了までの長期にわたってn-3 PUFAs欠乏に暴露された動物の行動学的研究は行われていない。本研究では、授乳終了直後と2ヶ月齢マウス(授乳終了後は一般固形飼料により飼育)に対して、オープンフィールドテスト(情動性に関するテスト)、尾懸垂試験(うつ症状に関するテスト)そして高架式十字路テスト(恐怖感に関するテスト)を行う。ビデオにより記録された行動について、行動解析ソフトを用いて解析を行い、n-3 PUFAsの離乳期および成体期の行動パターンに及ぼす影響について明らかにする。最終的には、n-3 PUFAs欠乏の状態(母胎の欠乏食摂取気管の違い)と行動パターン、さらには同飼育環境のマウスより得られた脳の形態学的所見との関係性を明らかにする。本研究で予定している行動解析が予定取り進まなかった場合は、社会性や新規物体などに対する行動パターンなど、他の行動解析に取り組み、n-3 PUFAs欠乏と行動の関わりについて、幅広く解析を試みる。

(4) 統計解析

体重、摂食量および脂肪酸組成の統計解析は、Student's t-testを用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。統計解析にはSAS JMPソフトウェア(SAS Institute Japan 株式会社)を用いた。

4. 研究成果

(1) n-3 PUFAs 欠乏食摂取により母胎および出生仔の成長は影響されない。

摂食する飼料の違いによって母胎の成長に差が生じないことは、これまでの研究からも明らかである。本研究においても、摂食開始より妊娠までの2週間と妊娠確認から出産までの約3週間の体重変化を両群間で比較し

た結果、両群の母胎の体重に有意な差は認められなかった。

飼料組成の違いによる摂食量への影響を確認するために、妊娠前および妊娠後の両期間における母胎の摂食量を比較した。その結果、妊娠前および妊娠後の期間における摂食量において両群間に有意な差は認められなかった。

飼料組成の違いが、母胎を介して栄養供給を受ける出生仔の成長に与える影響を確認するために、脳組織採取日齢(生後0日目、7日目、14日目、21日目)における出生仔の体重を比較した。各試験飼料摂取母胎より生まれた仔の体重は、新生仔から生後14日目まで、同様の成長を示し、各測定日における体重について両群間に有意な差は認められなかった(図1)。

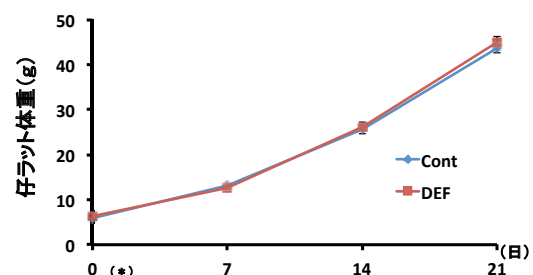


図1: 脂肪酸組成の違いは仔ラットの成長に影響しない。

(2) n-3 PUFAs 欠乏食摂取母胎より生まれた仔は落ち着きのない行動を示す

n-3 PUFAs 欠乏食を摂取した母胎より生まれた仔に対して、情動性を観察するためにオープンフィールドテストを行った。オープンフィールドテストは、外周に滞在する時間が長いほど、恐怖心を感じていることを示す。今回の実験では、n-3 PUFAs欠乏食群の仔は、Cont食群の仔に比べて外周滞在時間が長い傾向があった。このことは、n-3 PUFAs欠乏食群の仔が、Cont食群の仔に比べて、恐怖心を強く持っていることを示すものである。(図3, 図4)

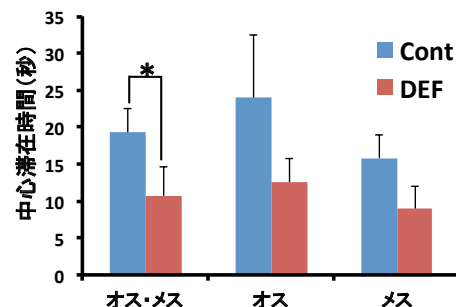


図3: オープンフィールドテストの中心滞在時間。Cont食群よりDEF食群の方が中心滞在時間は短い。

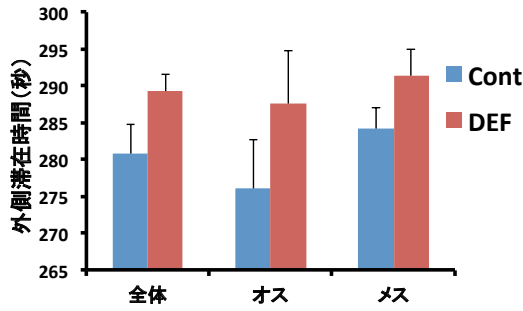


図 4: オープンフィールドテストの外側滞在時間。Cont 食群より DEF 食群の方が中心滞在時間は長い。

(3) n-3 PUFAs 欠乏食の継続摂食は生後 21 日齢脳の DHA 含有率を有意に低下させる。

n-3 PUFAs 欠乏食摂食による生後 21 日齢の脳内脂肪酸比率の変動を観察するために、脳組織の脂肪酸組成を解析した。結果として、n-3 PUFAs 欠乏食摂食母胎より出生し、その母胎を介した授乳によって成長した仔は、Cont 食摂食母胎より出生した仔に比べて生後 21 日目の脳内の DHA 比率が 50% 程度低下しており、有意な差を認めた。また生後 21 日目において、ステアリン酸、アラキドン酸にも有意差がみられた(図 2)。

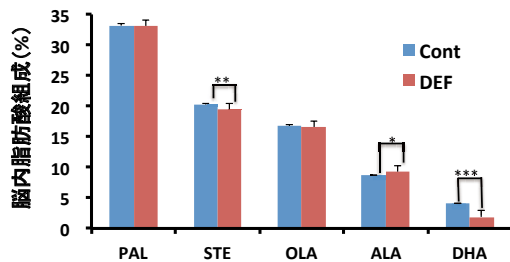


図 5: 母体の摂取する脂質栄養の違いは、仔の脳内脂肪酸組成に影響する。

(4) n-3 PUFAs 欠乏は生後 21 日目におけるアストロサイトの局在および成熟に影響を与える。

脳の生後発達時のグリア細胞の発生および成熟における n-3 PUFAs の役割を明らかにするために、生後 21 日目の脳組織に対してアストロサイト特異的抗体 (抗 GFAP 抗体、抗 BLBP 抗体) を用いた免疫染色を行った。両抗体の染色像は、Cont 食群では、多くのアストロサイトが脳皮質深層部に密集している様子が観察されたが、DEF 食群では、脳皮質深層部の分布が少なかった。また、脳皮質中に散在しているアストロサイトの数も DEF 食群において減少していた。(図 6)

これらの成果をまとめた論文については現在投稿準備中である。

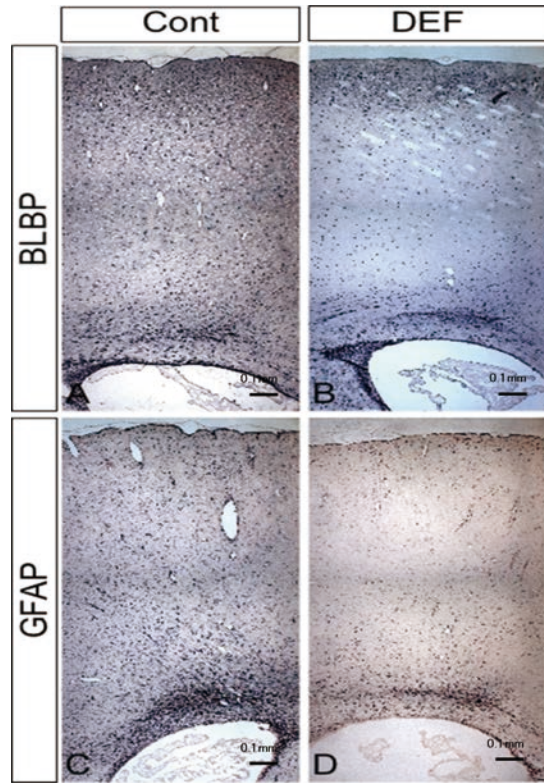


図 6: Cont 食群、DEF 食群の脳皮質におけるアストロサイトの分布像

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1) 山本達朗、The lack of n-3 polyunsaturated fatty acids affects the differentiation of the glial cell and the emotion of the weaning period, 第 35 回日本神経科学大会 (Neuro 2012)、2012 年 9 月 18 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

2) 山本達朗、慢性的な母胎 n-3 系多価不飽和脂肪酸の欠乏は仔の神経細胞とグリア細胞の発生に影響を与える、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 26 日、名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本達朗 (YAMAMOTO, Tatsuro)

名寄市立大学・保健福祉学部・講師

研究者番号：90379389

(2) 研究分担者

西村直道 (NISHIMURA, Naomichi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10341079

山本綾子 (YAMAMOTO, Ayako)

名寄市立大学・保健福祉学部・研究員

研究者番号：80414134

(3) 連携研究者

()

研究者番号：