

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592495

研究課題名(和文) IUGRモデル動物におけるエピジェネティクス機構による神経幹細胞の分化制御の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulatory mechanisms of neural stem cell state in mouse pups with intrauterine growth retardation.

研究代表者

桂木 真司 (Katsuragi, Shinji)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員

研究者番号：50521283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：低出生体重児では学童期の学習障害や行動障害の頻度が高いことが指摘されているが、胎児期の低栄養環境と出生後の精神発達障害の関連性は不明な点が多い。本研究は胎児期の低栄養環境と精神発達障害の関連、及びその機序を明らかにし、予防法や治療法の確立につなげることを目的とした。本研究では、妊娠中期～出産後1週間の母獣にカロリー制限を加える子宮内発育遅延(IUGR)モデルマウスを用いて、神経・精神発達への影響について検討した。コントロールと比較してIUGRにおいて、運動協調発達の遅延、不安行動の増加、即時記憶または空間学習における記憶障害を示す結果が得られた。シナプス機能変化がその原因の1つと思われる。

研究成果の概要(英文)：Intrauterine growth retardation (IUGR) leads to low birth weight. Recent human studies have shown that IUGR is associated with learning disability and memory impairment. However, the interactions between IUGR and neurodevelopmental disorders remain unclear. In this study, we tested the hypothesis that IUGR would be caused by moderate food restriction in pregnant females and that the offspring would have neurodevelopmental disabilities. Mid-pregnant mice received moderate food restriction through the early lactation period. The results showed that IUGR offspring had low birth weight and delayed development of physical and coordinated movement. They also exhibited mental disabilities such as anxiety and poor cognitive function. Male offspring exhibited significantly impaired hippocampal synaptogenesis at 3 weeks of age. These results suggested that restricted maternal diet increases developmental disability in IUGR offspring and that male offspring might be especially susceptible.

研究分野：周産期

キーワード：周産期 低体重出生児

1. 研究開始当初の背景

多くの疫学研究より、母胎内で低栄養に曝された低出生体重児は将来代謝関連疾患の発症リスクが高まることが指摘されている (Barker 仮説)。すなわち、胎児期の栄養環境により代謝関連遺伝子の DNA メチル化やヒストン修飾等が個体ごとに調節され、その後維持されることで遺伝子発現量に個体差が生じた結果と考えられており、生活習慣病をはじめとする代謝疾患の罹患性との関連が注目されている。また、低体重出生児では注意欠陥・多動性障害等の精神発達障害の発症率が高いことも指摘されている。これらの神経発達障害の発症機序は未だ明らかになっておらず、治療法も確立されていない。解剖学的に前頭前皮質や大脳基底核等の脳の特定部位の形成不全が認められていることから、原因の一つに胎児期の脳の形成・発達異常が考えられる。神経幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、脳の形成・発達において中心的な役割を果たしている。精神発達障害の発症リスクとして出生時の低体重が挙げられているものの、胎児期の低栄養環境が神経幹細胞の分裂および分化制御をはじめとする脳の形成・発育に及ぼす影響と精神発達遅延・障害の発症との関連は全く不明である。

NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 は酵母や線虫等で寿命を延ばす作用が知られており、飢餓応答に必須の調節因子として作動する。カロリー制限マウスにおいて、脳内 SIRT1 タンパク発現量は増加し、低栄養条件下での生理学的応答に重要な役割を果たしている。一方、神経幹細胞には SIRT1 が高発現しており、幹細胞を分化させると SIRT1 の発現は著明に減少し、また幹細胞の SIRT1 発現量を増加させるとニューロンへの分化が誘導される。興味深いことに、SIRT1 ノックアウトマウスはシナプス可塑性の低下により即時記憶、古典的条件付け、空間学習における記憶障害を示す。

2. 研究の目的

本研究では子宮内発育遅延 (intrauterine growth retardation, IUGR) モデル動物を用いて、胎児期の低栄養環境と SIRT1 を中心とした神経幹細胞のエピゲノム制御、そして脳の形成・発達への影響について検討を行う。

胎児低栄養環境による、脳の形成・発達の遅延または障害

胎児低栄養環境による、胎児神経幹細胞の自己複製能および多分化能の障害

胎児低栄養環境による、胎児脳 SIRT1 の活性変化と神経幹細胞に対する影響

胎児低栄養環境による、新生児期以降の脳 SIRT1 による神経幹細胞のエピゲノム制御

行動学的評価を用いた胎児低栄養環境

と精神神経学的発達に関連について
ヒストンアセチル化に対する化合物を用いた胎児薬物治療法の有用性について

本研究は胎児期の低栄養環境と精神発達遅延・障害の関連、およびその機序を明らかにし、予防法や治療法の確立につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

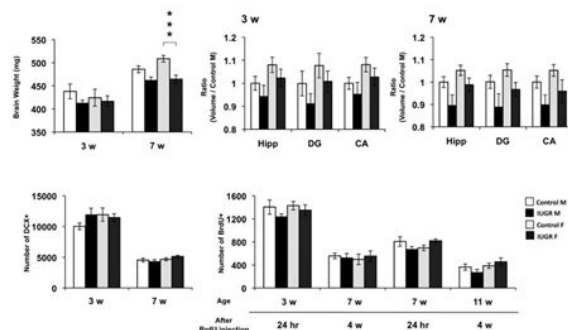
本研究では妊娠期の摂餌制限による低出生体重児モデル (IUGR マウス) を作製し、その神経発達への影響を検討した。実験は妊娠 ddY マウスに妊娠 8 日目から自由摂食コントロール群に比べ 30% の摂餌量制限を行った。

- (1) その胎児から成獣までの脳組織発達を組織学的に検討
- (2) 内在性神経幹細胞数、自己複製能、多分化能等を解析
- (3) 脳 SIRT1 活性の神経幹細胞系譜制御化への影響を解析
- (4) 離乳後に行動学的手法を用いて多動性、運動能力、学習記憶能力等を検討
- (5) 分子レベルでの脳機能障害の病態解明を行い、胎児期～新生児期の低栄養環境が及ぼす脳の形成・発達への影響を検討した。

4. 研究成果

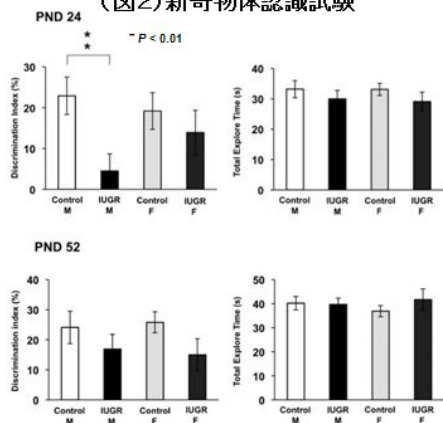
初めに IUGR モデル ddY マウスの確立、そして胎児から成獣までの脳神経発達を正常マウスと組織学的に比較検討を行った。既報を参考に IUGR マウスの作製を行ったが、妊娠期全体または部分的な摂食制限や、摂食制限量の違いによって、仔マウス自体が生まれにくいことや出生時体重に変化を来さない場合も認められた。最終的に、妊娠中期～出産後 1 週間の母獣への 30% の摂餌量制限により、出生時体重が正常体重と比較して 10～20% 減少した IUGR マウスを安定的に作出することが可能となった。この IUGR マウスはコントロールと比較して開眼が約 1 日遅延し、離乳後通常飼料で飼育する限りにおいてコントロール群に catch-up することなく低体重のままであった。また、脳/体重比および海馬体積比は

(図1) 脳神経系の発達



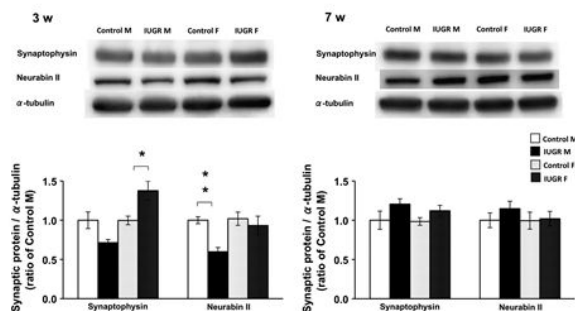
IUGR マウスで小さかった。脳組織において、大きさ以外に明らかな形態変化はみられず、海馬における神経幹細胞数、神経前駆細胞やその自己複製能、多分化能に有意な変化は認められなかった(図1)。これらの結果から、脳 SIRT1 活性による神経幹細胞の分化やエピジェネティック制御を検討することは困難と判断した。

(図2)新奇物体認識試験



次に、出生後の身体運動機能の評価、Open-field test や Novel object recognition test (新奇物体認識試験) 等による行動学習評価を行った。IUGR マウスはコントロールと比較して、出生後早期に認められる運動協調発達の遅延、思春期前期の即時記憶または空間学習機能の障害、不安行動の増加等有意な変化が認められた(図2)。また、これらの障害は離乳後の群飼育に比べ個別飼育環境によって増悪傾向が認められ、その反応性に性差が認められた。これまでの検討から、IUGR マウスにおいてシナプス後膜の構成蛋白の発現低下が認められ、何らかのシナプス障害の可能性が示唆された(図3)。

(図3)シナプス後膜蛋白



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1件)

Akitake Y, Katsuragi S, Hosokawa M, Mishima K, Ikeda T, Miyazato M, Hosoda H. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. *Nutrition research* 35:76-87, 2015. (査読有)

[学会発表](計2件)

秋武義治、桂木真司、細田洋司、他「妊婦の摂取栄養が子どもの脳と精神に及ぼす影響」第3回日本DOHaD研究会

桂木真司、秋武義治、細田洋司、他「妊婦のダイエットが子どもの脳と神経に及ぼす影響」第67回日本産婦人科学会学術講演会

[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
記載(予定)なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

桂木真司 (KATSURAGI, Shinji)
国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員
研究者番号：50521283

(2)研究分担者

細田洋司 (HOSODA, Hiroshi)
国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：40359807

秋武義治 (AKITAKE, Yoshiharu)
国立循環器病研究センター・研究所・流
動研究員
研究者番号：20508791

(3)連携研究者