

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650180

研究課題名(和文) 母親の高脂肪食摂取が胎児の神経発生と行動に及ぼす影響：発達障害のモデルとして

研究課題名(英文) Influence of maternal high-fat diet on the neurogenesis and behaviors of their pups: as a model of developmental disorders such as ADHD

研究代表者

仙波 恵美子 (SENBA, Emiko)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00135691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中期(6日~14日)に脂肪エネルギー比率50%の高脂肪食を与えた母から生まれた仔において、オレキシン神経細胞数が増加し、さらに自発運動量も増加することを明らかにした。さらに脂肪酸の組成による影響を検討したところ、オレイン酸食やラード食(一価不飽和脂肪酸食)が、パルミチン酸食やバター食(飽和脂肪酸食)、あるいはリノール酸食(多価不飽和脂肪酸食)に比べ有意に仔の過活動とオレキシン細胞数の増加を起こすことがわかった。オレイン酸が胎児の神経幹細胞に働きニューロンへの分化を促進することにより、オレキシン細胞数を増加させ、それが過活動を引き起こしたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Offspring mice of dams on a high-fat diet (HFD) (50% fat) from gestational day 6 to 14 showed increased expression of orexin (OX) neurons in the lateral hypothalamus and abnormal spontaneous motor activity compared to those of dams fed on a normal diet (13% fat). We focused on the influence of fatty acid composition of maternal HFD on the locomotive activity and OX neurons of their offspring mice. Maternal HFD containing oleic acid (monounsaturated fatty acid) caused hyperactivity of pups and their hypothalamus exhibited more numerous OX neurons. On the other hand, HFD containing palmitic acid or butter (saturated fatty acid), or linoleic acid (polyunsaturated fatty acid) did not cause any change in their pups. OX neurons play a key role in the control of arousal, locomotion and motivation. These findings suggest that maternal HFD is one of the causes of mental disorders characterized by hyperactivity such as ADHD in children, probably by affecting the neurogenesis in fetal period.

研究分野：神経解剖学、神経科学

キーワード：高脂肪食 過活動 オレキシン 脂肪酸組成 神経分化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

「発達障害」というのは、脳の発育・発達が妊娠中や乳幼児期の何らかの異常により損なわれ、言葉・社会性・行動や感情のコントロールなどの発達が、未熟・アンバランスになるために起こる、と考えられている。障害の種類が幅広く多様であるだけでなく、一人の発達障害者が複数の障害を併せ持つケースも多い。

その原因も染色体や遺伝子の異常から、環境による遺伝子発現のエピジェネティクス修飾によるものなど多種多様であると考えられ、現在、ADHD については、SHR, DA transporter(DAT) KO マウス、SNAP25 KO マウス、Git1 KO マウスなどが hyperactivity と attention deficits を示すことから動物モデルとして提唱され、自閉症については、Pax6 遺伝子変異や染色体 15q の重複、染色体 7q22-q33 に位置する FOXP2, RAY1/ST7, IMMP2L, RELN、などが候補としてあげられている。さらに胎児期のバルプロ酸 (valproic acid=HDAC inhibitor) 投与などの動物モデルが提唱されており、母体の感染や免疫学的異常、microglia の活性化との関連も示唆されているが、母体の食習慣・栄養状態に起因するモデルについては報告がない。

2. 研究の目的

近年、食の欧米化により脂質の多い食事摂取頻度が増えたことから、食事に占める脂肪エネルギー比が増加している。健康増進や疾病予防の観点から国の施策の「健康日本 21」では 20~40 歳の 1 日あたりの平均脂肪エネルギー比率の目標値を 30~25% 以下と定めているが¹⁾、しかし昨年度の国の調査では、男女とも殆どの世代で平均値がこの目標値を超えており、国民的に脂質の摂取過多が問題となっている²⁾。また、胎児期における母体内環境が胎児の将来のメタボリックシンドローム (肥満・高血圧・糖代謝異常・脂質代謝異常) や生活習慣病の発症を左右するとい

うエピジェネティクスの概念が提唱されてきた³⁾。エピジェネティクスは神経発達においても重要な役割を果たしており、その破綻は様々な先天性発達障害や疾患の原因になるとされている⁴⁾。これに加え、胎児期の母体内環境が脳の発達にも大きく影響を及ぼす可能性が指摘されている⁵⁾。近年、広汎性発達障害 (自閉症など)、学習障害 (LD)、注意欠陥多動性障害 (ADHD) などの発達障害を持つ患者が増えているが^{6,7)}、このことに神経発達障害仮説が関係していると考えられる。

Chang らは妊娠 6 日目から出産まで母親マウスに脂肪エネルギー比率 50% の高脂肪食を摂取させると、胎児の脳室周囲の視床下部となる領域の神経細胞の分化が促進されたと報告している⁸⁾。また、これらのマウスは成熟期以降、室傍核や外側野の神経細胞数が増加し、視床下部外側野のオレキシン mRNA の量が 1.5 倍になるという⁸⁾。オレキシン神経細胞は脳の摂食中枢である視床下部外側野に存在しており⁹⁾、神経伝達物質であるドーパミンやノルアドレナリンの合成を促進させる。これらノルアドレナリン神経やドーパミン神経は生体の活動を亢進させることも知られている¹⁰⁾。

これまでの我々の研究において、妊娠中期以降 (6 日~出産まで) にラードを主成分とした脂肪エネルギー比率 50% の高脂肪食を与えた母から生まれた仔において、オレキシン神経細胞数が増加し、さらに自発運動量も増加することを明らかにした^{11,12)}。このことから、自発運動量の増加、すなわち多動に影響するものが妊娠期の高脂肪食であることが示唆され、ヒトの ADHD のモデル動物になる可能性も考えられる。

ラード 100 g 中には脂肪酸が豊富で、およそ飽和脂肪酸は 40 g (主にパルミチン酸 24 g)、一価不飽和脂肪酸は 45 g (主にオレイン酸 41 g)、その他多価不飽和脂肪酸が 11 g 含ま

れている¹³⁾。そこで本研究では、妊娠期に与える高脂肪成分のうち、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のどの脂肪酸が成熟後の仔の自発運動量増加を引き起こしているかということを検討する目的で、飽和脂肪酸からはC16:0のパルミチン酸とバターを、一価不飽和脂肪酸からはC18:1のオレイン酸を、さらに多価不飽和脂肪酸からはC リノール酸を選び、餌を45~50%の高脂肪に調合して妊娠マウスに与え自発運動量を測定した。

3. 研究の方法

本研究は公立大学法人大阪府立大学動物実験規定に基づき実施した。動物飼育方法は試料及び水は自由摂取とし、飼育は個別ケージで室温22±2℃、1日12時間の採光周期(8:00 am~8:00 pm 明期)の動物舎で行った。動物は日本SLCから妊娠1日目のICRマウス21匹を購入し、普通食群(ND群; n=7)、高脂肪食群(HFD群; n=14)に分けた。普通食群には継続して普通食飼料(オリエンタル酵母社: MF/脂質12.8% kcal, たんぱく質25.7% kcal, 炭水化物61.5% kcal)を与えた。高脂肪食群には妊娠1日目から5日目は普通食群と同じ普通食を与え、6日目から14日目は5群に分け、いずれも餌100g中、第1群(パルミチン酸食; n=4)はMF 81gとパルミチン酸(Wako社製)19gを、第2群(バター食; n=5)はMF 77gに無塩バター(雪印社製)18g¹¹⁾、コーン油(味の素社製)5gを与えた。第3群(ラード食; n=5)はMF 77gにラード(雪印社製)18g¹¹⁾、コーン油(味の素社製)5gを与えた。第4群(オレイン酸食; n=5)はMF 77gにオレイン酸(Wako社製)23gを加え、第5群には同様多価不飽和脂肪酸(リノール酸食; n=3)(Wako社製)を23gを与えた。いずれも妊娠14日目以降は再び普通食を与えた。各飼料の脂肪酸組成については表1に示す。高脂肪食については週3回新たに調整し新鮮な餌を与えた。出産後も全群とも継続して普

通食を与えた。生後3週目に親マウスから仔マウスを離し集団(各5匹)で飼育した。本実験はオスのみを使用した。仔マウスは全群とも普通食を与えた。全期間普通食を与えた母マウスから生まれた仔マウスをND群、高脂肪食を与えた母マウスから生まれた仔マウスをHFD群とする。HFD群については妊娠期にオレイン酸食を与えた母マウスから生まれた仔マウスをO-HFD群、パルミチン酸食をP-HFD群、ラード食をL-HFD群、バター餌をB-HFD群、リノール酸をLi-HFD群とする。

表1 各飼料の脂肪酸組成 (g/100g 餌)

diet	Saturated	Monoun	Polyun	
		saturated	saturated	
(100g 中)	(g)	(g)	(g)	
ND	1.48	1.86	0.75	
P-HFD	15.07	1.60	0.65	
B-HFD	12.05	6.49	3.68	
HFD	L-HFD	8.85	10.61	4.75
	O-HFD	1.14	21.76	0.58
	Li-HFD	1.14	1.43	23.58

出生後2ヶ月から3ヶ月に各群から仔マウスをランダムに選択し(5~25匹)個別ケージに移動させ、自由に飲食や移動ができる状態で、赤外線センサーで運動量を感知できる自発行動量測定装置(MDC-WO1, プレインサイエンス・イデア社製)を用いて約1週間各マウスの自発運動量を継続して測定した。この赤外線センサーはグルーミングや立ち上がり等のわずかな動きには反応せず、約1.5cm動くと1カウントする特性がある。各群の自発運動量の統計学的比較は、各群のマウスの1日平均運動量をもとにTukey-Kramer法, Scheffe's F test, Bonferroni/Dunn法, Dunnett法を用いて多重比較検定を行った。

次に、オレキシン細胞数が増加しているか否

かを確認するため、生後 3~4 か月の ND 群 11 匹, P-HFD 群, L-HFD 群, O-HFD 群, Li-HFD 群のマウス各 4~5 匹ずつをランダムに選択し、ネンプタール (160mg/kg) で深麻酔させ、ザンボニ液で灌流固定して脳を取り出し、30% sucrose 液にて置換後、クリオスタット (ミクローム社/ドイツ) で 20 μ m の凍結切片を作製し、抗オレキシン抗体を用いて免疫組織染色を施行した。第 1 抗体にはオレキシン抗体 (goat, サンタクルズ社), 第 2 抗体にビオチン化抗 goat IgG 抗体 (Invitrogen 社), 第 3 抗体に ABC キット (ベクター社) を使用し, DAB-Ni で呈色反応後, 光学顕微鏡で脳の視床下部外側野の細胞数の多い部分から 5 箇所を選択し, オリンパスの顕微鏡計測ソフト (Cell Sense) で画像を取り込み, オレキシン細胞数を数えた。計測面積は 10 倍視野全体の 0.47 mm² である。細胞数差異は *t* 検定を用いて検討した。

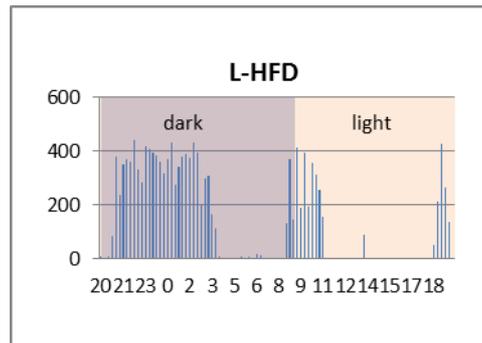
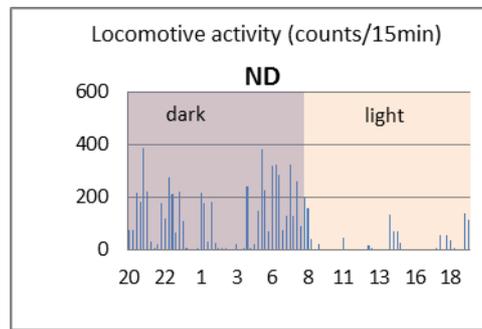
4. 研究成果

(1) 妊娠期の高脂肪食

妊娠期に普通食を与えた母親から生まれた仔マウスの群を ND 群、妊娠期に高脂肪食を与えた母親から生まれた仔マウスの群を HFD 群とし、O-HFD 群 (オレイン酸食), P-HFD 群 (パルミチン酸食), L-HFD 群 (ロード食), Li-HFD 群 (リノール酸食) の各仔の自発運動量を測定した。

図 1 は ND 群とオレイン酸食 L-HFD 群の 3 日間の自発運動量の一例である。L-HFD 群、O-HFD 群とも、明期と暗期と比べると特に夜間の暗期に自発運動量が増加した。マウスは夜行性であり、暗期に行動し、明期に睡眠をとるが、全ての群で睡眠覚醒リズムは正常に保たれていた。

図 1 仔の自発運動量の一例

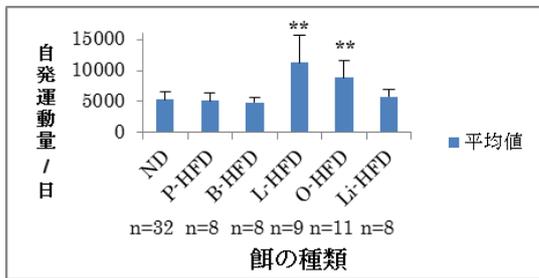


(2) 脂肪酸組成の自発運動量への影響

出生 3~4 か月の ND 群, P-HFD 群, L-HFD 群, O-HFD 群, Li-HFD 群の各マウスの数日間の自発運動量を測定し、1 日平均運動量を各群間で比較した (図 2)。結果は ND 群に対し L-HFD 群と O-HFD 群の自発運動量は両群とも有意に増加していた。しかし P-HFD 群, B-HFD 群と Li-HFD 群は ND 群と差は認められなかった。このことから、胎生 5 日~14 日間に母体がラードおよびオレイン酸 (一価不飽和脂肪酸) を過剰摂取することが、生まれてきた仔の成熟時の自発運動量の増加を引き起こしていると考えられる。一方、妊娠期のパルミチン酸、バター の飽和脂肪酸やリノール酸の多価不飽和脂肪酸の過剰摂取は仔の自発運動量に影響を与えないと考えられる。

図 2 仔の自発運動量 (1 日平均)

ND 群は 32 匹の平均、高脂肪食群の仔は 8 匹~11 匹の平均を示す。L-HFD 群、O-HFD 群は 1 日あたりの自発運動量が増加しており、ND 群と比較して有意差が認められた。P-HFD 群、B-HFD 群、Li-HFD 群は ND 群と変わらなかった。** $P < 0.05$ 。



(3) 脂肪酸組成によるオレキシンニューロン数への影響

生後3~4か月のND群, P-HFD群, L-HFD群, O-HFD群, Li-HFD群のマウスの視床下部のオレキシン陽性ニューロンの0.47 mm²あたりの数を計測し各群間で比較した(図3, 4)。結果はND群に対しL-HFD群とO-HFD群のオレキシン陽性細胞数は有意に増加していた。しかしP-HFD群, B-HFD群とLi-HFD群はND群と差は認められなかった。このことから, 胎生5~14日に母体がラードおよびオレイン酸(一価不飽和脂肪酸)を過剰摂取したことが, 仔の成熟時のオレキシンニューロン数の増加を引き起こしていると考えられる。一方, 妊娠期のパルミチン酸, バターやリノール酸の過剰摂取は仔のオレキシンニューロン数に影響を与えないと考えられる。

図3 LH(視床下部外側野)のオレキシン(OX)神経細胞顕微鏡写真。OX神経細胞はL-HFDマウスで増加していた。

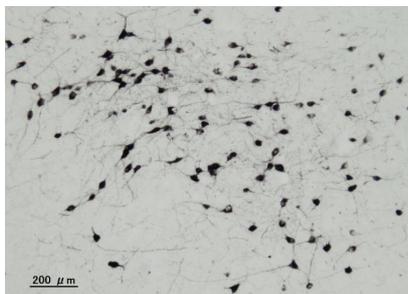
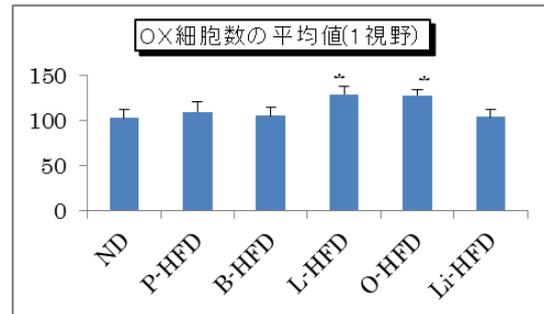


図4 視床下部外側野のオレキシン(OX)細胞数の比較。ND群(n=11)と比較してL-HFD群(n=5)、O-HFD群(n=4)はOX細胞数が増加しており、有意差が認められた。P-HFD群(n=5)、B-HFD群(n=4)、Li-HFD(n=4)群は増加せず、有意差が認められなかった。** P<0.05。



研究成果の考察

(1) 妊娠期の高脂肪食摂取

マウスの妊娠期間は約20日であり、胎生9日から脳の前基ができる。11日から神経細胞が発生し、14日から胎児の神経分化が活発になり、17日目頃には神経分化はほぼ完了するといわれている^{4,14,15}。Changらは50%の高脂肪食(ラード食)を出産まで母親マウスに摂取させると、胎児の脳室周囲の視床下部となる領域の神経細胞の分化が促進されたと報告している⁶。今回我々はChangと同じように妊娠6日目から50%の高脂肪食を母親マウスに食べさせた。さらに高脂肪という胎児環境の影響をより限局させるため、彼らより早く妊娠14日まで、すなわち妊娠中期にのみ高脂肪食を与えた。

結果は50%高脂肪食群のうちラード食群とオレイン酸食群とも成熟期の仔の自発運動量が増加したことから、妊娠中期の環境が影響を与えたことが示唆される。

(2) 脂肪酸組成による違い

飽和脂肪酸からはパルミチン酸を, 一価不飽和脂肪酸からはオレイン酸を選んで餌の脂肪エネルギー比率が50%になるよう調合し妊娠マウスに与えた結果、オレイン酸を主成分とする高脂肪食を母親が摂取すると仔の自発運動量が増加したことから、一価不飽和

脂肪酸であるオレイン酸の過剰摂取は仔に影響を与えられられる。一方、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の過剰摂取による仔への影響は少ないと考えられる。また、多価不飽和脂肪酸であるリノール酸食でも自発運動量は増加しなかったことから、影響は少ないと考えられる。

Fatty acid-binding protein (FABP)にはリガンド選択性があり、オレイン酸には特に親和性が高く、パルミチン酸とは結合しないことが報告されており、このことが今回の結果に影響した可能性が高い¹⁶⁾。また Medina らは、オレイン酸が神経栄養因子のように神経細胞の分化に関与すると報告している¹⁷⁾。これらのことよりオレイン酸は脳内で働きやすく、そのため胎児期の神経細胞の分化が促進したことが大いに考えられる。

これまで我々はマウスの妊娠期高脂肪食摂取が仔の自発運動量の増加とオレキシン神経細胞数の増加を引き起こすことを明らかにしてきた¹²⁾。オレキシンは摂食中枢に局在し摂食量を増加させる作用や、睡眠・覚醒を制御する作用を持つことが知られている。今回の研究では、オレキシンの増加により覚醒系の活動が高まった結果、自発運動量が増加したと考えられる。

(3) 脂肪酸が神経分化に与える影響

オレキシンにはノルアドレナリンやドーパミンなどのモノアミン系の神経細胞の活性化を持続的に高め、覚醒を維持する機能がある^{9,10)}。本研究の結果により、妊娠中期のオレイン酸の過剰摂取によりオレキシン神経細胞の分化が促され、その細胞数が増加した結果、下流にあるモノアミン系の神経細胞が活性化され、仔マウスの自発運動量の増加を引き起こしたと考えられる。

子供の健康な精神発達には妊娠期の母親の栄養バランスの重要性があげられ、特に妊娠早期に不飽和脂肪酸を過剰に摂取しないように指導する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. 丹間瑞季, 菅 詩音, 山野真利子, 妊娠期高脂肪食は仔マウスに影響する オリーブ油の検討, J Life Sci Res 12: 21-24, 2014. 査読有
2. Hideo Shinagawa, Mariko Yamano, Tatsuyoshi Saijo, and Makoto Muratsugu. Protective Activity of Antioxidants in the Hypothalamic Paraventricular Nuclei of Chronic Restraint-Stressed Mice. J Life Sci Res, 11:1-4, 2013. 査読有
3. 澤井 彩, 黒瀬結子, 山野真利子, 妊娠期高脂肪食は仔マウスに影響する一餌の種類の検討. J Life Sci Res 11:11-15, 2013. 査読有
4. 仙波恵美子, 細江さよ子, 人間には聴こえない動物の声を聴く. 脳 2 1, 16:494-498, 2013. 査読なし

[学会発表](計 2 件)

1. 山野真利子, 波平昌一, 仙波恵美子, 妊娠期高脂肪食は仔マウスの行動に影響する一餌の脂肪酸組成の検討 第 57 回日本神経化学大会, 奈良, 2014.10.1
2. 山野真利子, 高蛋白食摂取と運動の効果 マウス筋線維の肥大と再生, 第 119 回日本解剖学会, 栃木, 2014.3.28

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仙波 恵美子 (SENBA, Emiko)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号: 00135691

(2) 研究分担者

山野 真利子 (YAMANO, Mariko)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・准教授
研究者番号: 80192409