

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461636

研究課題名(和文) 脳が統合するエネルギー代謝調節機構 - ストレスによる肥満易発症の分子機序 -

研究課題名(英文) Regulation of energy metabolism between brain and peripheral organs; molecular mechanism of stress-induced life style-related diseases

研究代表者

三木 崇範 (MIKI, TAKANORI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30274294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生後早期の母子分離は、脳の神経回路の正常な形成を妨げ、結果として機能の歪として現れてくる。脳の神経栄養因子を介するシグナル伝達系やグルタミン酸受容体の異常に加え、シナプスにおける膜蛋白質のリン酸化にも影響を及ぼすことが明らかになった。これらの異常に加え、脂質代謝関連酵素群(因子)にも影響を及ぼし、神経機能の異常を惹起していることが示された。一方、母子分離された動物では腸内細菌叢の組成が変容することも明らかとなった。これらの結果は、生後早期のストレス曝露は、脳が統合する末梢代謝関連臓器との相互作用を攪乱させ、肥満など生活習慣病易発症性の分子基盤を探る手がかりとなるものである。

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 developmental crosstalk between the brain and peripheral energy-related organs. Our study can obtain insight understanding etiological mechanisms of life style-related diseases, such as obesity. Maternally separated rats showed abnormal alterations in neurotrophic factor expressions, their signal transduction systems and synapse structure protein phosphorylations. Furthermore, maternal separation stress affected various enzymes that involves in lipid metabolism. Examination on gut microbiota in these animals showed a disturbance in microbial composition leading to cause abnormal metabolism and/or nutrition. Our study showed that maternal separation stress during early postnatal life can affect the functions of both brain and peripheral organs that causes obesity in later life.

研究分野：発達神経科学

キーワード：ストレス 脳発達 生活習慣病 肥満 エネルギー代謝 末梢臓器

1. 研究開始当初の背景

本研究は、周生期特に生後早期 (= 脳発達時期) の母仔分離 (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、正常とは異なった動態変化を呈すること更には、成獣期に体重増加を認めることを報告した (Kuma et al., 2004) 研究を進展させたものである。先行研究においては、成獣期の体重増加の原因を脂肪組織に焦点を当て、分子生物学的手法で解析し、周生期のストレス曝露と将来の肥満を代表とする生活習慣病発症の易発症基盤についての基礎的研究としてきた。

脳発達期のストレス曝露は、脳と末梢代謝関連臓器 (組織) とのクロストーク・相互作用に歪を生じさせ、その結果エネルギー代謝調節機構に影響を及ぼすという仮説のもと周生期ストレスと将来の生活習慣病発症の分子基盤を明確にしたい。近年の子供が受けるストレスの過剰と生活習慣病の低年齢化が深刻な現状を鑑みると、本研究は、生活習慣病への先制医療に繋がる価値を有しているといえる。

2. 研究の目的

申請者らは、周生期ストレス曝露モデルとして、新生仔動物を母獣から離乳前に分離する「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、神経細胞数の変化について報告している。更に、この実験動物モデルにおいては、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。また、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「末梢の代謝関連臓器」の両面から解明し相互作用・クロストーク様態に関しての知見を得ようとするものである。つまり、今回の申請研究では、これまでの研究成果を進展させるため生後早期のストレス曝露が、その後の脳 (神経系) を介した臓器関連によるエネルギー代謝調節機構の獲得に与える影響について解析することを目的としている。

離乳前の母仔分離は、哺乳類仔にとっては生命の危機に関わるストレスである。このような「ストレス環境 (劣悪養育環境) のもとで育った、子供の脳や身体発達・成長に及ぼす影響を長期間に亘って評価」しようとする研究は少なくいま始端の途に有るばかりでなく、現代の子供を取り巻く環境の悪化と生活習慣病の低年齢化が社会問題となっている現代においては世相にマッチした研究と言える。

3. 研究の方法

(1) 母仔分離実験動物モデル作製

申請者らが先に確立しこれまで使ってき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 (postnatal days; PND) 4-9 日齢或

いは、2-21 日齢に行い、分離時間は 3 時間 ~ 6 時間と設定した。これらの動物から脳と脂肪組織・肝臓組織などを採取し解析に供した。

(母仔分離動物に食事性高脂肪を投与して負荷をかけ影響が出やすい状況を作製した。)

(2) ストレスホルモンの動態変化解析

母仔分離ストレス曝露が体内ホルモンに与える影響をストレスホルモン-コルチコステロンを指標として測定する。

(3) 神経作動性物質・因子の変化の解析

母仔分離ストレスによって惹起される脳の代表的神経作動性物質・因子 (グルタミン酸受容体) とその受容体の遺伝子発現解析を、記憶や学習と関連があるばかりでなく、当該領域内で 3-シナプス回路を形成し、神経回路網形成への影響を図りやすい海馬について解析した。特にシナプスにおける変化についてシナプスの膜分画のリン酸化解析を Western blotting による分子生物学的解析を行った。

(4) 海馬、mPF (medial prefrontal cortex) における脳由来神経栄養因子 BDNF が関与するシグナル伝達系因子の発現量に着目して、分子生物学的に解析した。

(5) 母仔分離動物における脂質代謝関連酵素群の動態変化解析

脂質の合成に関与する酵素 lathosterol oxidase 7-sterol 5 -desaturase (S5D) と mevalonate pyrophosphate decarboxylase (MPD) の変化に着目し、神経細胞の機能に与える影響について解析した。

(6) 消化機能・エネルギー代謝に与える腸内細菌叢の影響解析

母仔分離したラットを 21 日齢 (離乳前) に、腹腔から糞便を取り出して腸内細菌叢の組成の解析を行った。腸内細菌として、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Deferribacteres 門、Proteobacteria 門、Verrucomicrobia 門を中心として網羅的な解析を行った。

4. 研究成果

生後 4-9 日齢、3 時間/日母仔分離し、離乳後飼育用飼料として高脂肪食 (HFD-60 オリエンタル酵母) を投与して、母仔分離後の高脂肪食摂取が脳と末梢のエネルギー関連臓器関連に与える影響について解析した。母仔分離ストレスによって惹起されるコルチコステロンの上昇によって起こる脳の動態変化を解析した結果、ホモジネイト画分と粗シナプトソーム膜画分を採取し、神経回路網の形成やシナプスの可塑性に深く関与する因子であるグルタミン酸受容体: NMDA 受容体サブユニット (NR2A, NR2B) と CaMKII 発現とそのリン酸化 (CaMKII-thr286) をウエスタンブロットにて解析した。また、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーとして VGLUT2、GABA 作動性ニューロンのマーカーとして VGAT の発現も解析した。海馬のウエスタンブロット解析では GluR1 の発現量がホモジネイト画分および粗シナプトソーム膜画分ともに有意に減少して

いた。一方、ホモジネイト画分においては、VGAT 発現に変化を認めなかったが VGLUT2 の発現量が大幅に減少していた。これら一連の結果は、脳発達期のストレス暴露によるコルチコステロン上昇による影響として、グルタミン酸作動性ニューロンを中心とした神経回路網の形成に障害をもたらした、結果として機能に歪が生じていることを示唆している。

母仔分離ラット海馬の BDNF が関与するシグナル伝達系の変動と脂質代謝関連因 (酵素) の動態変化を real-time RT-PCR 並びに Western blot で解析した。その結果、BDNF が関与するシグナル伝達系因子の発現量が有意に低下していた。一方、脂質の合成に関与する酵素 lathosterol oxidase 7-sterol 5-desaturase (S5D) と mevalonate pyrophosphate decarboxylase (MPD) の発現量が母仔分離群で有意に減少していることが明らかになった。脂質コレステロールが、細胞膜成分の重要な因子であることを鑑みると、母仔分離ストレスは、BDNF の変動と相まって神経細胞の機能に与える影響は大きいことが推測できる。更に、脳の次世代シーケンス解析を行った結果、コレステロール輸送に関与する因子群への影響を示唆するデータを得ている。また、母仔分離ストレス暴露した動物では、高脂肪食餌を摂取しても体重の増加が見られなかった (対照群と比較)。これについては、再検討が必要である。

生後早期の母仔分離ストレスにより、体重の増加割合が亢進したことに関して、視床下部の BDNF 受容体 TrkB の発現量の亢進 up-regulation を示唆し、更に BDNF の放出障害が推測されるものである。神経性調節の場合は、視床下部室傍核と弓状核や迷走神経であることを鑑みると、神経栄養因子を介する神経性調節機構の存在を示唆するものである。これをより詳細な知見を得るために、実験モデル動物の腸管内の糞便の腸内細菌叢の解析を行った。生後 2-20 日、6 時間/日母仔分離したラットを 21 日齢 (離乳前) に、腹腔から糞便を取り出して腸内細菌叢の組成の解析を行った。腸内細菌として、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Deferribacteres 門、Proteobacteria 門、Verrucomicrobia 門を中心として網羅的な解析を行った。その結果、母仔分離動物においては Proteobacteria 門が最も増加し、次いで Verrucomicrobia 門が増加していることが明らかになった。これらは、腸内ミクロビオタのうち準 (亜) 優勢菌群、あるいは最優勢菌群であり、細菌叢の組成異常が惹起されていることが明らかになった。

近年、腸内細菌叢系統組成の変化が、潰瘍性大腸炎に関与するという研究に先行しそれに引き続き、消化管とは関係のない疾患群、精神神経疾患、代謝疾患、アレルギー・自己免疫疾患などの病因解明へと展開されている。報告者の一連の研究では、代謝疾患や精神神経疾患の原因の 1 つとして脳発達期のストレ

スが惹起する脳と腸管の双方向性シグナル機構の破綻に着目していることを鑑みると、今回得られた結果は今後の研究発展が期待できるものである。

[総括]

生後早期の母仔分離は、脳の発達と末梢エネルギー関連臓器に影響を与え、神経回路網形成と末梢臓器の相互作用・クロストークに大きく影響を及ぼすことを示唆し、これが将来の肥満を代表とする生活習慣病の発症に関わっているといえる。また腸内細菌叢の変化も代謝や消化機能の変化を惹起しておる可能性が示唆される結果を得た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

Jamal M, Ito A, Tanaka N, Miki T, Takakura A, Suzuki S, Ameno K, Kinoshita H. The Role of Apolipoprotein E and Ethanol Exposure in Age-Related Changes in Choline Acetyltransferase and Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in the Mouse Hippocampus. *J Mol Neurosci.* 2018;65:84-92. 査読有り

Jinnai W, Nakamura S, Koyano K, Yamato S, Wakabayashi T, Htun Y, Nakao Y, Iwase T, Nakamura M, Yasuda S, Ueno M, Miki T, Kusaka T. Relationship between prolonged neural suppression and cerebral hemodynamic dysfunction during hypothermia in asphyxiated piglets. *Brain Dev.* In press 2018. 査読有

Ohta KI, Suzuki S, Warita K, Kaji T, Kusaka T, Miki T. Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the Hippocampus during early brain development. *J Neurochem.* 2017;141:179-194. 査読有

Kubo H, Shimono R, Nakamura S, Koyano K, Jinnai W, Yamato S, Yasuda S, Nakamura M, Tanaka A, Fujii T, Kanenishi K, Chiba Y, Miki T, Kusaka T, Ueno M. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy-Associated Liver Fatty Degeneration and the Effects of Therapeutic Hypothermia in Newborn Piglets. *Neonatology.* 2017;111:203-210. 査読有

Suzuki S, Koshimizu H, Adachi N, Matsuoka H, Fushimi S, Ono J, Ohta KI, Miki T. Functional interaction between BDNF and mGluR II in vitro: BDNF down-regulated mGluR II gene expression and an mGluR II agonist enhanced BDNF-induced BDNF gene expression in rat cerebral

cortical neurons. Peptides. 2017;89:42-49. 査読有

Nakamura M, Jinnai W, Hamano S, Nakamura S, Koyano K, Chiba Y, Kanenishi K, Yasuda S, Ueno M, Miki T, Hata T, Kusaka T. Cerebral blood volume measurement using near-infrared time-resolved spectroscopy and histopathological evaluation after hypoxic-ischemic insult in newborn piglets. Int J Dev Neurosci. 2015;42:1-9. 査読有

Ueno M, Nishi N, Nakagawa T, Chiba Y, Tsukamoto I, Kusaka T, Miki T, Sakamoto H, Yamaguchi F, Tokuda M. Immunoreactivity of glucose transporter 5 is located in epithelial cells of the choroid plexus and ependymal cells. Neuroscience. 2014; 260:149-57. 査読有

Ohta K, 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. 査読有

Miki T, Yokoyama T, Kusaka T, Suzuki S, Ohta K, Warita K, Wang ZY, Ueki M, 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. 2014; 336:62-7. 査読有

Nakamura S, Kusaka T, Koyano K, Miki T, Ueno M, Jinnai W, Yasuda S, Nakamura M, Okada H, Isobe K, Itoh S. Relationship between early changes in cerebral blood volume and electrocortical activity after hypoxic-ischemic insult in newborn piglets. Brain Dev. 2014; 36:563-71. 査読有

Miki T, Kusaka T, Yokoyama T, Ohta K, Suzuki S, Warita K, Jamal M, Wang ZY, Ueki M, Liu JQ, Yakura T, Tamai M, Sumitani K, Hosomi N, Takeuchi Y. Short-term ethanol exposure causes imbalanced neurotrophic factor allocation in the basal forebrain cholinergic system: a novel insight into understanding the initial processes of alcohol addiction. J Neural Transm (Vienna). 2014;121:201-10. 査読有

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. 査読有

Suzuki S, Murotomi K, Nakajima Y, Kawai K, Ohta K, Warita K, Miki T, Takeuchi Y. Development of an artificial calcium-dependent transcription factor to detect sustained intracellular calcium elevation. ACS Synth Biol. 2014; 3:717-22. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

小澤 徹 太田健一 鈴木辰吾 三木崇範 母子分離が破綻させる内側前頭前皮質の興奮/抑制バランス第123回日本解剖学会総会全国学術集会 2018.3.28-30.(東京都武蔵野市)

三木崇範 養育環境と子どもの脳発達：健やかな発育のために基礎医学研究者ができること 第26回日本外来小児科学会春季カンファランス2016.4.3.かがわ国際会議場(香川県高松市)

三木崇範、太田健一、鈴木辰吾 養育環境が脳をかえる 分子～症状を双方向に見通す 日本赤ちゃん学会 第15回学術集会 2015.6.26-28.(香川県高松市)

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三木 崇範 (MIKI Takanori)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：30274294

(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

割田 克彦 (WARITA Katsuhiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40452669

(5)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

(6)研究分担者

日下 隆 (KUSAKA Takashi)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50274288