

和田 圭司

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部・部長

脳発達を支える母子間バイオコミュニケーション

1. 研究実施の概要

本研究では、母体環境と子の脳機能発達の関連性について科学的検証を加えることをめざす。特に、1) 母体由来生理活性物質が胎児期、乳児期の脳に作用し、生後の行動発達などに影響するという仮説を実証するため当該生理活性物質を同定し、母子間の物質的コミュニケーション(バイオコミュニケーション)の存在をほ乳類で実証するとともに、2) 母体環境の変動が子供の脳発達に与える影響を脳科学的に解明する。これらの成果は、脳発達障害の病因の解明やその予防法の開発に繋がることが期待される。今年度は、1) に関しては、妊娠中ストレス環境下で飼育したマウス母体胎仔の G 蛋白質共役型受容体遺伝子発現を対照胎仔と比較し、さらにその内在性リガンドについて母体から胎仔への移行性を解析した結果、グレリンが我々が求める生理活性物質であることを見出した。妊娠時にグレリン投与を受けたマウス母体から出生した産仔は成熟後も視床下部ニューロンの一部に変化を有し、CRH 産生のストレス時反応性が低下していた。また、BDNF 欠損マウスの解析から母体側 BDNF が胎仔に移行しその生存性に必須であることを見出した。BDNF もやはり我々が求める物質と考えられる。さらに、人乳由来の免疫促進ペプチド(lactomedin 1)を新たに同定し本ペプチドが抗不安作用を示すことをマウスで見出した。本ペプチドは免疫-神経ネットワークの重要な因子であること示した。2) については、母体の摂取カロリーと胎仔の生後脳機能発達について解析し、高脂肪食で飼育した雌マウスの産仔は不安様行動の増加を呈し、海馬における過酸化脂質の蓄積、BDNF の発現低下を示すことを見出した。逆に、授乳中の雌マウスを70%のカロリー制限で飼育した場合、産仔の体重が離乳期まで対照に比し低体重であり、不安様行動が増加することを見出した。以上、本年度は、胎仔、産仔の成長、脳機能発達に影響を及ぼす母体由来生理活性物質3種を同定し、母体の生活習慣と産仔の脳機能発達を結ぶ分子的基盤の一部を明らかにすることができた。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

研究目的

胎児、新生児は成体と異なりその発育に必要な栄養は母体から供給されるという特徴を有して

いる。したがって、この時期の発育は子側の自律的な発生、発達プログラムだけでなく母体側要因の制御を受ける。従前より、喫煙、飲酒に代表されるように子の発達に関しては負の要因に関する研究が多くなされてきた。しかし、その作用機序の詳細は未だ不明であり、正の要因も含め母体-子の代謝クロストークに関する研究はまだ少ない。そもそも内在性の機序が不明であるだけでなく、蛋白質、ペプチド、脂質など母体由来の個々の生理活性物質がどのように子の発育に寄与するのかについても体系的な研究がなく、推論を交えた俗説が跋扈するものの科学的に探求し実証した例は皆無に近い。

本研究では母体環境と子の脳機能発達について十分な科学的根拠を構築するため母体-子が織りなす物質的クロストークについて、まず齧歯類においてその存在を実証する。具体的に、母体由来の生理活性物質が胎児、乳児期の脳の発達に積極的に寄与するという実験的根拠を構築する。さらに、同定された生理活性物質の測定法確立などを通して齧歯類のみならず霊長類、さらにはヒトにおいて成果を蓄積し、子の健全な発育に寄与する疫学的、臨床的研究に発展させるための基盤を形成する(物質的クロストークについては母子間バイオコミュニケーションと提唱し、そこに作用する母胎由来生理活性物質を母子伝達物質と提案する)。

研究方法

1) 胎児脳の発達に寄与する母体由来生理活性物質の同定

- A) 妊娠マウスの飼育条件を変動させた際の胎仔脳内 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 発現を定量的に解析し、対照母体から出生した胎仔に比べ有意に発現が変動した GPCR を同定した。さらに、当該 GPCR に作用する母体内の内在性リガンドを同定し、胎仔への移行性を確認した。また、同リガンドを母体に投与した胎仔の生後の行動について検討を行った。GPCR を選択した理由はゲノム上最大ファミリーを形成し種類が多いだけでなく生理活性物質の受容体として最も普遍的な存在であることによる。
- B) BDNF が脳機能発現に重要な因子でありながらそのノックアウトマウスは胎生中ではなく生後まもなく死亡することが多いという事実に着目し、母体由来の BDNF が胎生中のノックアウトマウスの生存を支えているという可能性を想定した。すなわち、BDNF が我々が求める母体由来生理活性物質の一つであるという仮説を実証することにした。そのため BDNF ヘテロマウスを使用し、その交配に基づく胎仔の genotype と BDNF 量の関連性を妊娠期間中モニタした。
- C) ヒトラクトフェリン由来の生理活性ペプチド lactomedin 1 (FKDCHLAR) が情動に及ぼす影響を検討するため、本ペプチドを投与したマウスの行動解析を行った。

2) 妊娠母体の生活習慣と子の脳機能発達の関連性解明

- A) マウスに高脂肪食を負荷し肥満モデルを作成した。ついで当該マウスの妊娠状況、仔の発育状況を妊娠後期から生後に渡ってモニタし、物質面での変動を生化学的に、情動面での変動を行動科学的に解析した。

結果

1) 胎児脳の発達に寄与する母体由来生理活性物質の同定に関して

A) 母体由来グレリンを介した母子間バイオコミュニケーションの発見¹⁾

妊娠マウスに拘束ストレスを負荷した場合、母体で血中の活性型グレリンが増加するだけでなく、

胎仔血中における活性型グレリン量も増加した。この際、胎仔体中におけるグレリン mRNA 発現量に変化はなかった。また、母体に投与した活性型グレリン依存的に胎仔中グレリン量が増加したことから、母体グレリンの胎仔への移行の可能性が考えられた。さらに、活性型グレリンを投与した母体から出生した仔マウスは生後4ヶ月においても拘束ストレス時の CRH 分泌増加不全、オープンフィールド試験における中央滞在率の増加不全などストレス反応性の低下が認められた。また、視床下部におけるニューロペプチド Y の発現量が当該の仔では胎児期から成体に到るまで低下していた。以上の結果から、母体由来のグレリンが胎仔脳に作用し、生後長期にわたって影響を及ぼす可能性が示された。

B) 母体由来 BDNF による胎仔生存機構の同定²⁾

BDNF ヘテロマウスの交配では子宮内で野生型、ヘテロ、ノックアウトの3種の胎仔が存在する。それぞれの BDNF 量を測定したところ、ノックアウト仔においても他の2タイプ同様に BDNF が存在した。ノックアウト仔においては BDNF mRNA は測定されず、また、妊娠初期では3種の間で BDNF 量に差がなかったのに対し、妊娠後期では BDNF 量は genotype に依存して低下した。さらに、出生した仔について genotype 依存的な母体の食殺行動が観察された。以上の結果は、BDNF が我々が求める母子伝達物質の一つであり、さらに胎仔の生存に必須であるだけでなく、出産後の母体の哺育行動にも影響を及ぼす極めて重要な因子であることを示す。

C) ヒトラクトフェリン由来の生理活性ペプチド lactomedin 1 による抗不安作用の発見⁴⁾

ラクトフェリンは、人乳では主要なタンパク質である。ヒトラクトフェリンのトリプシン消化物から、回腸収縮活性を指標にして2種類のペプチド FKDCHLAR および CFQWQR を単離し、lactomedin 1 および 2 と命名した。両ペプチドはそれぞれ、補体 C5a 受容体および vasopressin 受容体に対して親和性を示した。lactomedin 1 の回腸収縮活性は補体 C5a との間でクロスタキフィラキシーを起こすことから、C5a アゴニストとして作用することが明らかとなった。さらに、高架式十字迷路を用いた行動学的検討を行い、lactomedin 1 をマウスに経口投与することにより抗不安作用を示すことを見出した。この結果は免疫系と神経系の新しいクロストークを示している。現在、補体 C5a には補体 C5a 受容体と C5L2 受容体の2種類のサブタイプが知られており、いずれも中枢神経系に存在する。そこで、さらに lactomedin 1 の抗不安作用がいずれのサブタイプを介しているかを各受容体に対するアンチセンス ODN を用いて検討した。その結果、lactomedin 1 の腹腔内投与による抗不安作用は C5a 受容体アンチセンス ODN の脳室内投与により阻害される一方、C5L2 受容体アンチセンス ODN では阻害されないことを見出し、本ペプチドによる抗不安作用は中枢の C5a 受容体を介することを明らかにした。さらに、補体 C5a 自身の脳室内投与により抗不安作用を示すことも見出した。また、lactomedin 1 の抗不安作用は、COX 阻害剤およびプロスタグランジン (PG) D₂ 受容体 (DP₁) アンタゴニストによりブロックされることから、この抗不安作用は PGD₂ の放出促進を介していることが判明した。さらに、PGD₂ 自身の情動調節作用を検討し、PGD₂ も同様に DP₁ 受容体を介して抗不安作用を有することを明らかにした。

2) 妊娠母体の生活習慣と子の脳機能発達に関連性解明に関して

A) 母体のエネルギー摂取過剰による産仔性差の変動と酸化ストレスの蓄積の発見³⁾

雌マウスを妊娠前から高脂肪食で飼育した産仔は、離乳期に到るまで対照に比し高体重であり、出生時から成体に到るまで血中脂質酸化が有意に亢進していた。胎生期はこのような蓄積はなく、

また授乳期のみ母体に高脂肪食を与えた仔では過酸化脂質の増加は認めるものの有意ではなかった。さらに、妊娠前から高脂肪食で飼育した場合、産仔は不安様行動の増加を hole board 試験で呈し、海馬における過酸化脂質の蓄積(特に歯状回)、BDNF の発現低下を示した。また、出生産仔の性別では雌が雄に比し有意に増加していた。以上の結果は、母体の慢性的なカロリー摂取増加が、子宮内受精環境や出生仔の初期の発育のみならず成長後の脂質代謝、脳機能にも影響することが示された。

結論

- 1) 母子間の物質的コミュニケーションに関わると考えられる物質を4種同定した。
- 2) 人乳ラクトフェリン由来の新規補体 C5a アゴニストペプチド lactomedin 1 が、プロスタグランジン D₂を介して抗不安作用を示すことを発見した。

3. 研究実施体制

(1)「神経研究所」グループ

①研究分担グループ長：和田 圭司（国立精神・神経センター神経研究所部長）

②研究項目

胎児・乳児脳の母子伝達受容機構解明、母子伝達物質の同定と解析(ヒト母乳、大型動物乳腺分泌物の解析は除く)、ヒトでの実用化に向けた脳機能発達における母子伝達の機能解明

(2)「京都大学」グループ

①研究分担グループ長：吉川 正明(大阪大学 教授)

②研究項目

母子伝達物質の同定と解析(ヒト母乳、大型動物乳腺分泌物の解析)

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表（原著論文）

神経研究所グループ

1. Kodomari, I., Maruoka, T., Yamauchi, R., Wada, E., Wada, K. Ghrelin alters postnatal endocrine secretion and behavior in mouse offspring. **Neurochem. Int.**, 2009 March - April;54(3-4):222-228. Epub 2008 Dec 9
2. Kodomari, I., Wada, E., Nakamura, S., Wada, K. Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta. **Neurochem. Int.**, 2009 Feb;54(2):95-98. Epub 2008 Dec 9.
3. Tozuka, Y., Wada, E. Wada, K. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. **FASEB J.**, 2009 Jan 21. [Epub ahead of

print]

4. Maruoka, T, Kodomari, I, Yamauchi, R., Wada, E. Wada, K. Maternal enrichment affects prenatal hippocampal proliferation and open-field behaviors in female offspring mice. **Neurosci. Lett.** in press

京都大学グループ

5. Zhao H., Ohinata K., Yoshikawa M. Central prostaglandin D₂ exhibits anxiolytic-like activity via the DP₁ receptor in mice. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, 2008 Oct 21. [Epub ahead of print]

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）