

「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」
平成17年度採択研究代表者

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、昨年度までの解析で母体から胎仔への移行可能性が示されたグレリンにつき、その添加が培養マートセット神経系前駆細胞に及ぼす影響を解析した。予備実験の段階ではあるが、グレリンによる細胞増殖作用の可能性を見いだした。また、ヒトラクトフェリン由来の補体 C5a アゴニストペプチド lactomedin 1 や牛乳 beta-lactoglobulin 由来のニューロテンシンアゴニストペプチド beta-lactotensin の抗不安作用についてその分子機序を明らかにした。さらに、ラクトフェリン由来のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド LRP を見出し、抗不安作用を示すことをマウスで見出した。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引き続き解析し、高脂肪食で飼育した雌マウスの産仔の新生海馬神経細胞の樹状突起は幼若期においては対照仔と比較して分岐数と伸長が低下していることが見いだされた。成体期では有意な差は見いだすことができなかった。また記憶学習能についても検討し、幼若期において学習獲得過程で遅延を見いだしたが、成体期においては有意差を見いだすことができないという結果を得た。他方、授乳中の雌マウスを70%のカロリー制限で飼育した場合についても行動科学的評価を行い、やはり幼若期に不安様行動が増加するが成体期には差を見いだせなくなるという結果を得た。以上、本年度は、母体由来生理活性物質の抗不安作用についてその機序を同定し、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。なお母子間バイオコミュニケーションという用語を公知にすべく総説を発表した。

§ 2. 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)

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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と作用解析

A) 流産死したマーモセット胎仔の脳より神経系前駆細胞を初代培養法またはニューロスフェア法に従い調製した。さらに、レプチン(0.6-10nM)または活性型グレリン(0.06-10 μ M)を培地に添加した際と同細胞の増殖度の変化をBrdUの取り込みにより測定した。

B) ヒトラクトフェリン由来の補体 C5a アゴニストペプチド lactomedin 1 (FKDCHLAR)の抗不安機構をマウスを用いた高架式十字迷路試験で検討した。

C) 牛乳 beta-lactoglobulin 由来のニューロテンシンアゴニストペプチド beta-lactotensin の抗不安機構をニューロテンシン受容体ノックアウトマウス等を使用し、高架式十字迷路試験で検討した。

D) ラクトフェリン由来のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド LRP 及び関連ペプチドの血圧降下および記憶増強作用を自然発症高血圧ラット(SHR)およびマウスを用いて検討した。

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から出生した仔の幼若期脳並びに成体期脳に GFP 発現レトロウイルスベクターを導入し神経系前駆細胞より発生した神経細胞の形態評価を樹状突起の分岐、伸長の点から行った。

B) マウスに高脂肪食を負荷し肥満モデルから出生した仔の幼若期並びに成体期の記憶学習能をバーンズ迷路学習試験により評価した。

C) 授乳期の母体の摂餌量を70%に制限した場合の仔の幼若期並びに成体期の行動をオープンフィールド法試験、ホールボード試験などにより評価した。

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と作用解析に関して

A) マーモセット神経系前駆細胞に対するレプチンまたはグレリン作用の解析

マーモセット神経幹細胞はレプチン(10nM)添加で有意な増加が認められ、また活性型グレリン(0.25-1 μ M)の添加で増加傾向が認められた。

B) ヒトラクトフェリン由来の補体 C5a アゴニストペプチド lactomedin 1 による抗不安機構の解析^{5, 7)} lactomedin 1 (FKDCHLAR)は、主要な人乳タンパク質として知られるラクトフェリンのトリプシン消化物から単離した補体 C5a アゴニストペプチドであり、プロスタグランジン(PG)D2 を介して抗不安作用を示すことを昨年報告した。さらに、マウスを用いた高架式十字迷路試験において、本ペプチドならびに補体 C5a による抗不安作用は、アデニン A2A 受容体および GABAA 受容体に対するアンタゴニストで阻害されることを見出し、PGD2 の睡眠誘発作用と同じメディエーターを介することを明らかにした。PGD2 自身の抗不安作用も新たに見出しているが、この抗不安作用も A2A および GABAA 受容体を介していた。

C) 牛乳 beta-lactoglobulin 由来のニューロテンシンアゴニストペプチド beta-lactotensin の抗不安機構⁷⁾

beta-lactotensin (HIRL)はマウス経口投与により抗不安作用を示すことを見出した。NT1 受容体ノ

ックアウトマウスでは、本ペプチドの抗不安作用が観察されたが、NT2 受容体ノックアウトマウスでは抗不安作用が認められないことが判明した。また、この抗不安作用はドーパミン D1 受容体および GABAA 受容体のアンタゴニストにより阻害されたことから、NT2 受容体の下流で D1 および GABAA 受容体を活性化することが明らかとなった。

D) ラクトフェリン由来のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド LRP 及び関連ペプチドの血圧降下および記憶増強作用

Leu-Arg-Pro (LRP)は食品由来のペプチドとしては最も強力なアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性(IC50 = 0.21 μ M)を示すペプチドであり、多くの動物のラクトフェリン中に存在する。我々は、ラクトフェリンをペプシンおよびトリプシンで消化することにより、ACE 阻害活性を有する LRPVA (IC50 = 0.7 μ M)というペプチドがまず生成し、本ペプチドの C 末端の2残基がアンジオテンシン変換酵素そのものによって除去されることにより、さらに強力な阻害作用を有する LRP に変換されることを見出した。すなわち、LRPVA はプロドラッグ型の ACE 阻害ペプチドに分類できる。本ペプチドを lactopril と命名した。SHR への経口投与により、LPR および lactopril はそれぞれ、投与2時間後および4時間後に最大の血圧降下作用を示した。一方、step-through 装置を用いた受動的回避実験において、lactopril はマウスへの経口投与(15 mg/kg)により、記憶増強作用を示した。

D)その他関連事項

神経系前駆細胞の分化に時計遺伝子が関わることを見出した²⁾。

2) 妊娠母体の生活習慣と子の脳機能発達の関連性解明に関して¹⁾

A) 母体のエネルギー摂取過剰による産仔海馬神経細胞の形態変化の発見

妊娠前から高脂肪食で飼育した雌マウスの産仔は幼若期において通常飼育雌マウスの産仔に比し、新生海馬神経細胞の樹状突起分岐数ならびに伸長度が低下していた。成体期においてはこれらの差は見いだされなかった。

B) 母体のエネルギー摂取過剰による産仔記憶学習能変化の発見

妊娠前から高脂肪食で飼育した雌マウスの産仔は幼若期においてバーンズ迷路学習試験で学習は成立するが、その獲得過程の遅延を呈することが示された。成体期においてはこの獲得過程の遅延は見いだされず学習の成立も対照マウスと差がなかった。

C) 母体のエネルギー摂取減少による産仔不安様行動変化の発見

授乳期の母体の摂餌量を70%に制限した場合の仔は幼若期(生後21日)においてオープンフィールド法試験、高架式十字迷路試験で自発運動量の減少、ホールボード試験において自発運動量減少と不安反応の亢進を呈することが示された。成体期(生後30週)においてはこの自発運動量減少と不安反応の亢進は見いだされず対照マウスと差がなかった。

D)その他関連事項

前年報告書に記載した enriched environment の仔に与える影響の論文が出版された¹⁾。また、情動性記憶に関して、再固定と消去の薬理学的弁別法を開発した³⁾。さらに、エネルギー代謝に関して脂肪細胞の増殖分化に関わる分子の同定に成功した⁴⁾。

3) 母子間バイオコミュニケーションの用語認知⁶⁾

母子間バイオコミュニケーションという用語を公知にすべく英文総説を発表した。

結論

- 1) 母体由来生理活性物質の抗不安作用についてその機序を明らかにした。
- 2) 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明らかにした。
- 3) 母子間バイオコミュニケーションという用語を公知にすべく総説を発表した。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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.** 2009 Apr 17;454(1):28-32. Epub 2009 Feb 27. DOI:10.1016/j.neulet.2009.02.052
2. Kimiwada, T., Sakurai, M., Ohashi, H., Aoki, S., Tominaga, T., Wada, K. Clock genes regulate neurogenic transcription factors, including NeuroD1, and the neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells. **Neurochem. Int.**, 54, 277-285, 2009 Dec 11. [Epub ahead of print] DOI:10.1016/j.neuint.2008.12.005
3. Yamada D, Zushida K, Wada K, Sekiguchi M. Pharmacological discrimination of extinction and reconsolidation of contextual fear memory by a potentiator of AMPA receptors. **Neuropsychopharmacol.**, 2009 Nov;34(12):2574-84. Epub 2009 Aug 12. DOI:10.1038/npp.2009.86
4. Suzuki, M., Setsuie, R., Wada, K. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L3 promotes insulin signaling and adipogenesis. **Endocrinology**, 2009 Dec; 150(12):5230-9. Epub 2009 Oct 16. DOI:10.1210/en.2009-0332

(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.** 2009 Apr;88(3-4):68-72. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2008.10.001