

妊娠中のカロリー制限による次世代への影響とリスク

近久 幸子

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部統合生理学分野 助教

諸言

現在、糖尿病や肥満症などの代謝機能障害の増加が世界的に大きな社会問題となっているなか、日本の若年層では過度のダイエットによる代謝障害や摂食障害が問題となっている。特に妊婦における過度のダイエットは問題視されており、日本の低体重新生児（2500g未満）の比率は他の先進国に比べて極めて高いことが知られている。一方、不眠症等の睡眠障害、不安・うつ等の情動障害などを患う患者の増加も近年問題視されている。妊婦の栄養状態が、生まれてくる子供の脳機能や代謝機能に何らかの影響を及ぼすことは以前から指摘されているものの、その詳細については不明な点が多い。

2型糖尿病のような代謝異常は、睡眠障害やうつなどの脳機能障害とも互に関連しあっている。睡眠と代謝との関連性として、健常者を対象とした報告で、深い睡眠とされるを選択的に奪うと、2型糖尿病のリスクが高まることが示唆されている¹⁾。我々は、高脂血症治療薬として広く用いられている peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) のアゴニストであるベザフィブレートが、睡眠深度を増大するとともに、断眠後に生じるリバウンドを小さくさせることを発見し報告している²⁾。また、体内のエネルギーセンサーと言われている AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化は、睡眠の深さを上昇させ、逆に不活性化は深さの低下を誘発することを見出し報告した³⁾。PPARs や AMPK は胎児や新生児においても発現しており、妊娠期・授乳期での母親の栄養状態は、胎児、新生児から幼児にかけての代謝調節や脳機能発達に様々な影響を与えることが考えられる。しかし、その機構は環境要因と遺伝要因が複雑に関係し合っており、詳しいメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、これらの仔マウスにおいて脳機能異常や代謝異常が引き起こされるメカニズムについて明らかにし、その対処法を探ることを目標とした。

実験方法

1. 妊娠マウス作製と摂餌制限

実験動物には 12 週齢の ICR 系マウスを用いた。カロリー制限は雌マウスの妊娠成立後 12 日目から 18 日目にかけて行った。カロリー制限の群として、妊娠マウスの平均摂取量の 50% の群を作製した⁴⁾。授乳期、母親マウスには通常どおりに飼料を与え、離乳後、仔マウスにも飼料は自由に摂取させた。その後、成長した仔マウスが 8 週齢になった時点で、不安・うつ行動の度合いを行動解析装置を用いて測定した。また行動実験用のマウスとは別のマウス群を用意し、脳波・筋電図の測定を行い、睡眠を解析した。

2. 行動実験による不安・うつ傾向の解析

不安行動の度合いを観察するオープンフィールドテスト、明暗箱、高架式十字迷路、うつ行動の度合いを観察する強制水泳を行った。

3. 脳波・筋電図測定による睡眠の解析

脳波測定を行うために、頭蓋骨にネジ電極を埋め込む手術を行った。2 週間の回復後、マウスをシールドルームに移し、ケーブルに繋いで脳波・筋電図の測定を行った。測定は、通常時の睡眠と断眠後の睡眠状態に関して行った。

4. 生化学的分析

強制水泳中のモノアミン系の神経伝達物質の海馬や線条体における放出量を、マイクロダイアリス法を用いてリアルタイムに採取し、HPLC で定量した。また、脳内の各種遺伝子発現の変化について、リアルタイム RT-PCR を用いて増減を確認した。

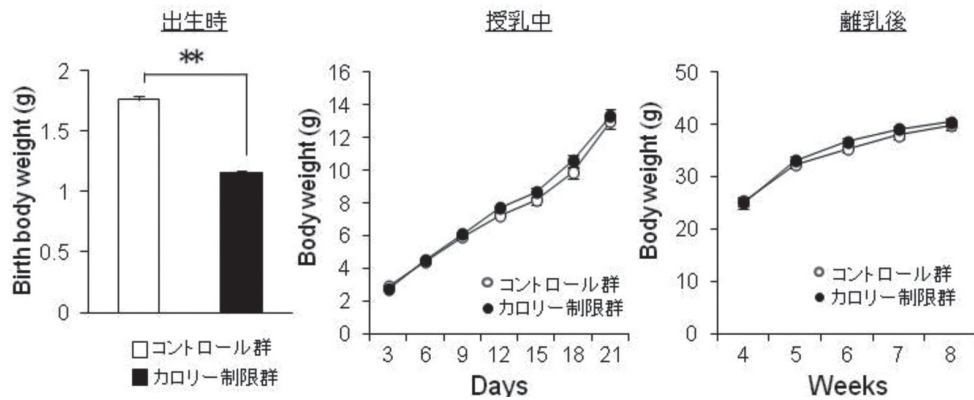


図1 低出生体重モデルマウスの体重推移

結果

1) 低出生体重モデルマウスの作成

妊娠後期に50%のカロリー制限を行うことにより、その母親マウスから生まれた仔マウスは出生時に低体重を示し、成長とともに急激な体重増加を起こす、低出生体重モデルマウスを作成した(図1)。

2) 高次脳機能および代謝変化の測定

低出生体重モデルマウスを用い、成熟後における記憶・学習能などの高次脳機能変化や情動行動の変化、睡眠や生体リズムの変化について測定を行った結果、低出生体重モデルマウスは成熟後、不安様行動(図2)およびうつ様行動の増加(図3)、睡眠深度の増大(図4)と活動量の低下(図5)を示すことが明らかとなった。

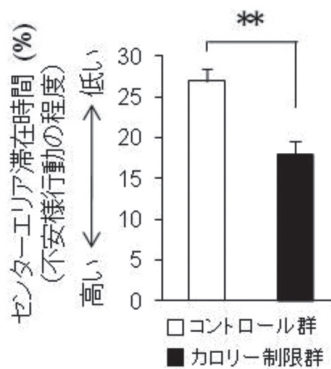


図2 オープンフィールドにおけるセンターエリア滞在時間

代謝変化を測定するため、血中グルコース、血中遊離脂肪酸、血中ケトン体分画の測定、Glucose tolerance test や Insulin tolerance test を行ったところ、低出生体重モデルマウスは胎生期における血中グルコース濃度が

顕著に低下していたが(図6)、成熟後(8週齢)はこれらのパラメータに両群間で差は認められなかった(図7)。

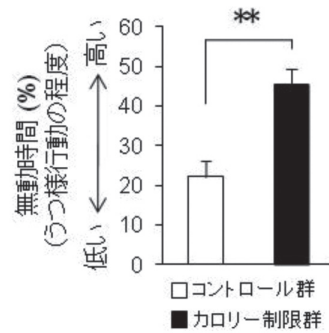


図3 強制水泳実験における無動時間

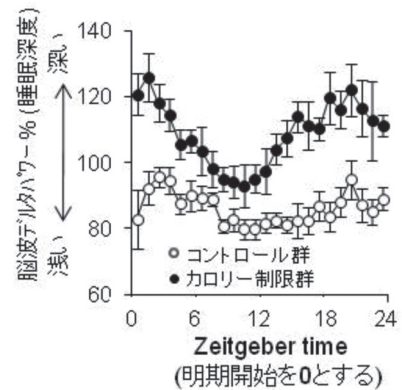


図4 ノンレム睡眠時の脳波デルタパワーの変動

3) マイクロダイアリス法による神経伝達物質の測定

うつ様行動の指標である、強制水泳テストに差が認められたことから、海馬および線条体におけるモノアミン系に関して、マイクロダイアリス法を用いてリアルタイム(強制水泳中)に採取し、HPLCで定量したとこ

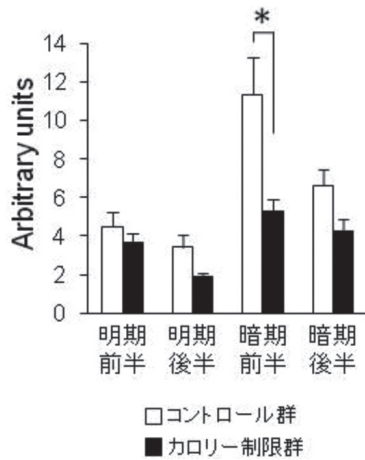


図 5 活動量の変化

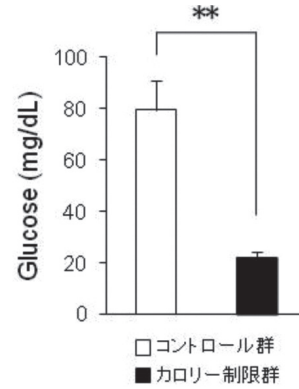


図 6 胎児期における血中グルコース濃度

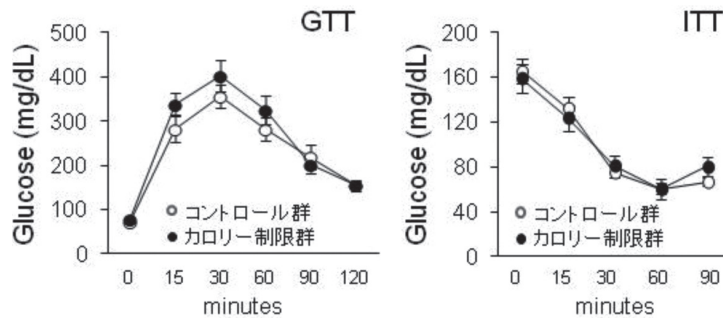


図 7 成熟期 (8 週齢) における Glucose tolerance test (GTT) および Insulin tolerance test (ITT)

ろ海馬のドーパミン代謝産物およびセロトニン代謝産物が増大する傾向が認められた。

4) 仔マウスにおける脳内分子変化の解析

低出生体重モデルマウスの脳において、脂質代謝や摂食行動を制御する因子であり、ケトン体の合成に関わる遺伝子である PPAR α や 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Hmgcs2) の増大 (図 8)、および情動行動の調節に関与するセロトニン受容体の mRNA 発現に減少が認められた。

考 察

本研究の結果より、妊娠中のカロリー制限は次世代に様々な影響を及ぼすことが明らかとなった。我々の以前の研究において、PPAR α が睡眠制御に関与していることが明らかとなっている²⁾。本研究においても低出生体重モデルマウスの脳において、PPAR α mRNA が増大するとともに、睡眠深度の増大が認められた。また、情

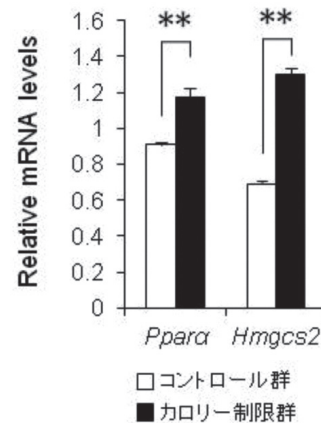


図 8 脂質代謝関連遺伝子の変化

動行動の制御に関与するセロトニンについても、代謝産物の増大や受容体の遺伝子発現に減少が認められ、なおかつ低出生体重モデルマウスが不安様行動やうつ様行動を示したことから、妊娠中のカロリー制限は、次世代に遺伝子変化を伴う脳機能異常および行動異常を引き起こ

すリスクを増大させることが明らかとなった。

脳内分子機構を把握するため、DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を行ったが、PPAR α や Hmgcs2 の他にも、免疫系や運動機能など様々なメカニズムが複雑に関与していることが明らかとなったため、今後さらに詳細に調べていく必要性が示された。また、免疫組織染色を用いて、海馬の神経細胞数の測定を行ったが、変化が認められなかった。このため、他の脳部位やグリア細胞、神経新生についても今後測定・比較していく必要があると考えられる。

要 約

妊娠中のカロリー制限による低出生体重モデルマウスを作製し、モデルマウスにおける成熟後の行動解析と脳内代謝変化を測定することによって、以下の点が明らかとなった。低出生体重モデルマウスは成熟後、①不安様行動およびうつ様行動の増加、②睡眠深度の増大と活動量の低下、③脳内における脂質代謝関連遺伝子の変化を示すことが明らかとなった⁵⁾。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり中心的な役割を果たしてくれた徳島大学大学院医科学教育部清水紀之君に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Tasali E, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1044-9, 2008.
- 2) Chikahisa S, et al.: *Endocrinology*, 149, 5262-71, 2008.
- 3) Chikahisa S, et al.: *Neuropharmacology*, 57, 369-74, 2009.
- 4) Isganaitis E, et al.: *Diabetes*, 58, 1192-200, 2009.
- 5) Shimizu N, et al.: *PLoS One*, 8, e64263, 2013.