

氏 名 西倉 紀子

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士乙第 447 号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項

学 位 授 与 年 月 日 令和 2 年 3 月 1 0 日

学 位 論 文 題 目 Postweaning Iron Deficiency in Male Rats Leads to Long-Term Hyperactivity and Decreased Reelin Gene Expression in the Nucleus Accumbens

審 査 委 員 (離乳後の鉄欠乏は雄ラットにおいて側坐核におけるリーリン遺伝子の表現を減少させ、長期的に続く多動を引き起こす)
主査 教授 等 誠司

副査 教授 勝山 裕

副査 教授 扇田 久和

論文内容要旨

*整理番号	451	(ふりがな) 氏名	(にしくら のりこ) 西倉 紀子
学位論文題目	Postweaning Iron Deficiency in Male Rats Leads to Long-Term Hyperactivity and Decreased Reelin Gene Expression in the Nucleus Accumbens (離乳後の鉄欠乏は雄ラットにおいて側坐核におけるリーリン遺伝子の表現を減少させ、長期的に続く多動を引き起こす)		
<p>【研究の目的】</p> <p>胎児期・乳児期早期の成育環境(栄養、ストレスなど)は児の体質に変化を与え、生後の発達障害や精神疾患の発症リスクに大きく関わっていることが疫学研究により示されている。栄養素の中でも、鉄は髄鞘形成に必要な脂質の生合成に関与し、serotonin や dopamine などの神経伝達物質の合成酵素にも必須の物質であり、欠乏による認知機能への影響は大きいとされている。</p> <p>鉄欠乏性贫血が2歳以上に発症した場合は、鉄剤投与により貧血も神経機能の障害も改善するが、2歳未満に発症した場合は認知機能の改善は乏しく、治療終了10年後もその影響は残存するという報告がある。また、乳幼児期は身体発達が急速で身体の鉄の必要量が多いため、母乳栄養は鉄の吸収率が高いものの含有量が少なく、調製粉乳ではその逆であり哺乳のみでは鉄欠乏に陥りやすく、現代においても実際には気付かれずに離乳期を終える児が多数存在すると考えられる。</p> <p>鉄欠乏により不可逆的な変化をもたらし、鉄剤治療にはクリティカルピリオドが存在することが明らかとなっている。これらの知見を踏まえ、本研究では未だ明らかとなっていない鉄欠乏が不可逆的な中枢神経系に及ぼす影響を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いた転写産物の解析を行い、乳児期早期のプログラミングへ与える影響を調査した。</p> <p>【方法】</p> <p>Fischer344/Jcl ラットを妊娠、出産させ、子雄ラットを離乳後である生後21日から39日までの期間において、鉄量を10%量に制限し、それ以降は十分量を与える鉄欠乏群(ID)と普通食の対照群(CN)の2群を研究対象とし、以下の実験を行った。</p> <p>1. 行動実験</p> <p>オープンフィールド試験・高架式十字迷路試験を8、12週齢に施行した。</p> <p>2. モノアミン定量実験</p> <p>行動実験後の9、13週齢に脳内モノアミン定量を前頭前皮質(PFC)、側坐核(NAcc)、尾状被殻、中脳背側、中脳腹側、橋においてHPLC法を用いて施行した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

3. 遺伝子発現解析 (RNA-seq 法を用いた解析)

13 週齢の PFC および NAcc の 2 領域において次世代シーケンサーを用いた転写産物 (mRNA) の解析を RNA-seq 法を用いて施行した。

4. 組織形態解析

13 週齢の PFC および NAcc の 2 領域において抗 synaptophysin 抗体を用いてシナプスの免疫染色を施行した。

【結果】

8 および 12 週齢のオープンフィールド試験において、ID 群では総移動距離および辺縁部移動距離の週齢に伴う減少率が CN 群より低く ($p < 0.05$)、ID 群は成獣になってからも多動が残った。13 週齢での脳内モノアミン測定では、dopamine 代謝産物である 3-methoxytyramine、homovanillic acid が PFC および NAcc のそれぞれにおいて増加しており、中脳腹側では dopamine の低下が認められた。一方、NAcc および中脳腹側では serotonin の主要代謝産物である 5-hydroxyindoleacetic acid が増加していた。RNA-seq では、NAcc における Reelin 遺伝子の発現が ID 群で有意に減少していた (adjusted $p < 0.01$)。抗 synaptophysin 抗体を用いた免疫染色では、NAcc のシナプス密度が CN 群に比して ID 群で有意に増加していた ($p < 0.01$)。しかしながら、PFC のシナプス密度には両群間で有意差がなかった。

【考察】

今回の実験で鉄制限を行った期間は、人間の 9 か月から 2 歳に相当し、現在の日本でも存在する離乳期の鉄欠乏性貧血のモデルラットと考えている。Reelin 遺伝子はシナプスの可塑性に関わる重要な遺伝子であり、統合失調症や双極性障害、発達障害の一つである自閉スペクトラム症などの神経疾患では Reelin 遺伝子の発現の低下の報告がある。また、シナプス密度は統合失調症では低下、自閉スペクトラム症では増加が認められるとも報告されている。Reelin 遺伝子は dopamine の神経の発達にも関連していることが報告され、発達障害の一つである注意欠如多動症では dopamine 神経の機能の低下および dopamine 受容体感受性亢進があるとされ、多動や衝動的な行動に深く関与しているとされる。乳児期の鉄欠乏により Reelin 遺伝子の発現量がエピジェネティックな変化により減少することで不可逆的な変化をもたらし、神経伝達物質やシナプス形成にも影響を与え、成人期にも行動特性が残る一因となることを明らかにしたのではないかと考えている。

【結論】

離乳後の鉄欠乏雄ラットにおいて成獣となってからも多動が残存し、脳内のモノアミンの変化を引き起こした。また、NAcc 領域において Reelin 遺伝子の転写産物は低下しシナプス密度は増加していた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	451	氏名	西倉 紀子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>胎児期や発達早期に受けた侵襲が、発達後の行動や脳の構造・機能に長く影響するという仮説を検証するため、離乳直後に一時的に鉄欠乏状態にしたラットを用い、成獣後に行動や脳の解析を行った結果、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 生後 21 日-39 日の鉄欠乏食により、血清鉄が顕著に低下して体重も減少したが、生後 13 週齢までにそれらは回復した。2. 鉄欠乏雄ラットでは、オープンフィールドテストにて多動傾向が見られた。3. 脳内モノアミン測定により、鉄欠乏雄ラットでは中脳腹側でのドーパミン低下や、前頭前野や側坐核でのドーパミン代謝産物増加が観察され、モノアミン代謝が変化していることが示唆された。4. 側坐核のトランスクリプトーム解析により、Reelin 遺伝子の発現低下が検出された。5. 抗 Synaptophysin 抗体を用いた免疫染色により、側坐核でシナプス密度が減少している可能性が示唆された。 <p>本論文は、発達早期の鉄欠乏が、鉄が正常化された発達後においても行動やモノアミン代謝、神経ネットワーク形成などに影響を及ぼし得るという新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 531 字)</p> <p style="text-align: right;">(令和 2 年 1 月 28 日)</p>			