

令和元年6月25日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09728

研究課題名(和文) 発達期の栄養環境変化による個体の脆弱性形成のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of vulnerability formation by nutritional environment change at developmental stage.

研究代表者

桑形 麻樹子 (Kuwagata, Makiko)

昭和大学・医学部・客員教授

研究者番号：70398684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期の低栄養は生活習慣病の発症リスクを増加させ、生後の制限はリスクを減少させる、即ち、出生前後で低栄養に対する影響が逆転することに着目し、21個の遺伝子を選抜した。C57BL/6Jマウスの生後1週間、母動物を低栄養曝露した児マウスを用いて、リポポリサッカライド(LPS: Toll様受容体4を刺激し炎症を起こす)を生後11週に投与し、変化する遺伝子を見出した。OATP family トランスポーター(Slco2b1)は新生児期の低栄養の影響をまた、生後11週まで受けていた。LPS投与により、Lrtm1, Mrap, Ii1b, Slco2b1の発現が異なったことから、責任遺伝子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
マウス新生児期の低栄養曝露により、成熟期においても影響が継続していた遺伝子(Slco2b1)が選抜された。また、成熟期のLPS投与に対する反応が、新生児期の低栄養曝露により影響を受けていた。本課題で得られた結果は、これまで注目されてきた胎生期の栄養環境のみではなく、新生児期の栄養環境の変化も、個体の脆弱性に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have investigated candidate genes which are associated with increased risk of adult diseases by analyzing developing tissues from the C57BL/6J mouse model of developmental origins of health and disease (DOHaD). We focused on experimental evidence that the effect of undernutrition on adult offspring is opposite between the fetal and neonatal periods. We selected 21 candidate genes which were expressed opposite between prenatal and neonatal undernutrition. After 7-days neonatal 50% food restriction in dam, offspring kept until 11-weeks of age. At 11-weeks of age, LPS (TLR4 inducer) was administered to offspring and expression of 21 candidate genes were examined. One of 21 genes such as OATP family transporter (Slco2b1) were affected, and development of spleen and thymus altered after neonatal undernutrition. Adult LPS treatment changed 4 genes such as Lrtm1, Mrap, Ii1b, and Slco2b1 between neonatal FR offspring and control offspring. These four genes may be candidate genes for DOHaD.

研究分野：生殖発生毒性

キーワード：DoHaD 遺伝子解析 新生児期栄養環境 マウス LPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人期に発症する多くの疾患原因が発達期環境に素因があるという成人期疾患発達期起源説 (DOHaD) が提唱されてきた。また、出生児低体重と、うつ病、ADHD、学習・行動異常といった精神疾患との関連も懸念されている。

我々は2012-2014年度の基盤研究Cにおいて、胎生期の栄養制限は疾病発症リスクを増加させるが、生後の制限は生活習慣病の予防や長寿につながる、即ち、生前と生後では同じ低栄養環境に対して児には逆の影響がみられることに着目し、胎児期^{a, b)}あるいは新生児期に栄養環境を変化させ、出生前後の肝臓および脳の網羅的遺伝子解析を行い、生活習慣病や精神疾患の発症リスクに關与する責任候補遺伝子群の絞り込みを試みた。文献a) Ogawa T. et al., *Congenital Anomalies*, 51, 110-125(2011); 文献b) Ogawa T. et al., *Congenital Anomalies*, 54, 195-219 (2014)

その結果、胎児脳では免疫系遺伝子群の発現が減少したが、幼若期脳(胎児、新生児)では変動した遺伝子数が少なく、脳の解析だけではDOHaD説に結びつく遺伝子群の絞り込みはできなかった。一方、造血機能を有する発達期肝臓の網羅的遺伝子解析の結果、出生前後で遺伝子発現の動きが逆を示した遺伝子が21個に絞られ(下表)、成人病に關連する脂肪代謝、肥満、糖新生に關与するものが含まれていた。また、免疫系に關与する遺伝子発現も変動し (Ifng, IL1B, Stat1

	Fetal liver	Neonatal liver	
	Whole genome	Whole genome	
	Expression	Expression	
Symblo	fold change		Description
Ccl7	0.5	2.2	reflMus musculus chemokine (C-C motif) ligand 7 (Ccl7), mRNA [NM_013654]
Cd274	0.5	2.1	reflMus musculus CD274 antigen (Cd274), mRNA [NM_021893]
Cxcl10	0.4	2.9	reflMus musculus chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10), mRNA [NM_021274]
Cyp2b10	4.6	0.6	reflMus musculus cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10 (Cyp2b10), transcript variant 2, mRNA [NM_009999]
Gbp3	0.4	2.6	reflMus musculus guanylate binding protein 3 (Gbp3), mRNA [NM_018734]
Gzmb	0.5	1.8	reflMus musculus granzyme B (Gzmb), mRNA [NM_013542]
Ifi47	0.4	2.7	reflMus musculus interferon gamma inducible protein 47 (Ifi47), mRNA [NM_008330]
Igtp	0.4	3.3	reflMus musculus interferon gamma induced GTPase (Igtp), mRNA [NM_018738]
Il1b	0.3	1.8	reflMus musculus interleukin 1 beta (Il1b), mRNA [NM_008361]
Irgm2	0.4	2.1	reflMus musculus immunity-related GTPase family M member 2 (Irgm2), mRNA [NM_019440]
Lrtm1	3.2	0.5	reflMus musculus leucine-rich repeats and transmembrane domains 1 (Lrtm1), mRNA [NM_176920]
Mpa2l	0.3	2.4	reflMus musculus macrophage activation 2 like (Mpa2l), mRNA [NM_194336]
Mrap	1.8	0.6	reflMus musculus melanocortin 2 receptor accessory protein (Mrap), mRNA [NM_029844]
Samhd1	0.4	1.7	reflMus musculus SAM domain and HD domain, 1 (Samhd1), transcript variant 1, mRNA [NM_018851]
Sds	2.2	0.5	reflMus musculus serine dehydratase (Sds), mRNA [NM_145565]
Slc36a2	0.5	1.9	reflMus musculus solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2 (Slc36a2), mRNA [NM_153170]
Slco2b1	2.4	0.4	reflMus musculus solute carrier organic anion transporter family, member 2b1 (Slco2b1), mRNA [NM_175316]
Stat1	0.3	2.6	reflMus musculus signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1), mRNA [NM_009283]
Xaf1	0.5	1.5	reflMus musculus XIAP associated factor 1 (Xaf1), mRNA [NM_001037713]
Xcl1	0.3	1.7	reflMus musculus chemokine (C motif) ligand 1 (Xcl1), mRNA [NM_008510]

等) 胎児期の低栄養環境は自然免疫系を劣勢に、新生児期では優性になっていた。

したがって、発達期の栄養環境変化と免疫機能との関連性を明らかにすることはDOHaD研究のみならず幼若児の毒性評価にも非常に重要であると考えた。

我々は、新生児期の遺伝子発現の変化が個体の脆弱性を招き、後のストレス負荷により機能的異常が起こり疾病に至る可能性を解析するために、免疫系の関与も考慮にいれて本計画をたてた。

2. 研究の目的

胎児期の栄養制限は出生後のカロリー摂取過多で増悪し、摂取制限では改善するという逆作用に着目して我々が選抜した 21 個の責任候補遺伝子群を手掛かりに、発達期に栄養環境の変化を受けた児の成熟期にストレス負荷(今回は炎症)をかけた時の生体反応の違いを免疫系への影響を考慮しながら生活習慣病および精神疾患罹患のメカニズムの解明を試みる。また、成人疾患発症が発達期の栄養環境変化による個体の脆弱性(特に免疫系)に起因し、脆弱性の確立には出産時以外にも臨界期が存在する可能性を探る。

3. 研究の方法

これまでの我々に基づき、C57BL/6J マウスを用いて、生後 1 週間、母動物に対照群の 50% 摂餌量を給餌し、その後は自由給餌する 50% 給餌制限群 (FR 群) と固形飼料 (CE-2) を自由摂取させる対照群を設定した。動物は生後 4 週に離乳し、生後 11 週まで飼育した。その間に体重測定を週 1 回の頻度で実施した。生後 11 週に各腹雌雄 1-2 匹の出生児に 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のリポポリサッカライド (LPS, ToII 様受容体 4 を刺激し、炎症を起こす) を 3 日間腹腔内投与し、最終投与翌日に全ての出生児を安楽死させた。その際に、器官重量 (肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、背側脂肪) を測定し、脾臓および胸腺については病理組織学検査を実施した。また、肝臓は選抜した 21 個の遺伝子の変動を確認するために外側左葉の一部を採取し、RT-PCR にて LPS 処理の有無による変動を確認した。

4. 研究成果

(1) 生後 1 週間の FR の影響

FR 群の出生児の体重推移は、給餌制限後、急速に体重増加し (キャッチアップグロース)、離乳時以降、対照群よりも高値に推移したが、生後 11 週には両群の体重に差はなかった。

器官重量測定の結果、雌雄ともに体重値に差はなかったが、FR 群の雄では、背側脂肪および脾臓重量が対照群と比較して増加し、胸腺は低値を示した。FR 群の雌では、肝臓および脾臓重量が増加した。雌の背側脂肪量は両群に差はなかった。

脾臓の病理組織学的検査の結果、FR 群では白髄の中心動脈周囲領域 (PALS) の T 細胞 (CD3 陽性細胞) が少なく、辺縁帯の樹状細胞 (抗原提示細胞、Iba-1 陽性細胞) の局在が不明となり、細胞数も多かった。濾胞領域の B 細胞 (CD45R 陽性細胞) には著変はなかった。胸腺では、CD-3 陽性 (T 細胞) 細胞が減少し、被膜直下の大型細胞が目立った。これらの変化は生後 1 週の観察から同様であり、新生児期の栄養環境の変化が生後の免疫器官の発達に影響を及ぼすことが明らかになった。

(2) LPS 投与の影響

LPS 投与により、両群ともに体重が減少した。この減少の程度に雌雄両群に差はなかった。

器官重量の結果、雄では、LPS 投与により、両群ともに、肝臓、腎臓、脾臓重量が増加した。増加の程度は両群ともに同等であった。また、胸腺および背側脂肪重量は減少し、その程度は背側脂肪は両群間で同程度であったが、胸腺の減少の程度は FR 群で顕著であった。

雌では LPS 投与により、両群ともに、肝臓、腎臓、脾臓重量が増加し、胸腺および背側脂肪重量が減少した。背側脂肪の減少の程度が FR 群で顕著であった。そのほかの変動は両群で同程度であった。

胸腺および脾臓の病理組織学的検査の結果、LPS 投与により胸腺では顕著な萎縮がみられ、胸腺細胞が両群ともに枯渇した。胸腺の病理組織学的評価には LPS 投与条件が不適切 (オーバードーズ) であったと考えられた。一方、脾臓では、両群ともに PALS 領域の T 細胞減少、辺縁帯の樹状細胞の増加、赤髄のマクロファージ増加が観察されたが、FR 群のほうが顕著であった。

(3) 21 個の選抜遺伝子の変動

出生前後の FR 処理にて遺伝子発現が逆に変動した 21 個の遺伝子について、生後 11 週に、LPS 処理動物と非処理動物とで比較した。3 つの因子 (栄養条件、LPS 投与、性) を用いた 3 way ANOVA 解析を実施した。

その結果、生後 11 週まで新生児期の FR 処理の影響が継続していた遺伝子として Slco2b1 の増加が確認された。しかし新生児期 FR の影響は LPS 投与により消失した。

また、LPS 投与により、対照群で Lrtm1 および Mrap の増加がみられ、FR 群で、Il1b の減少が観察された。なお、Slco2b1 は、OATP family トランスポーターであり、肝臓をはじめとして、多くの組織に存在するトランスポーターである。Lrtm1 は細胞骨格形成に関与し、また、中脳腹側ドパミン神経前駆細胞の表面抗原として同定されている。Mrap は肥満抑制遺伝子であり、Mrap ノックアウトマウスでは肥満となることが知られている。Il1b は炎症性サイトカインである。

(4) 考察

新生児期の栄養環境変化により、育成期に体重増加傾向がみられた。本実験の解剖時である生後 11 週には、体重値に影響はなかったが、皮下組織量の増加、脾臓重量の増加および胸腺重量の減少が成熟期にみられた。すでに実施していた生後 1 週および 3 週に肝臓の網羅的遺伝子解析から、自然免疫系が優位で肥満に関連する遺伝子発現が減少していたが、生後 1, 3, 11 週に実施した免疫器官の病理組織学的観察結果から、新生児期の栄養環境変化は、生後、成熟期まで免疫機能に影響を及ぼすこと、自然免疫系が継続的に優位になっていることが明らかになった。また、新生児期栄養環境変化により、皮下脂肪量が多くなることが明らかになった。

選抜した 21 個の遺伝子のうち、生後 11 週まで新生児 FR の影響が観察された遺伝子として Slco2b1 が確認された。FR 胎児期処理により増加、新生児期 FR 処理後は減少したが、生後 11 週には再び増加していた。栄養代謝、消化吸収に発達期 FR 処理は影響を及ぼすことを示している。

また、Toll like 4 受容体を刺激して炎症を起こさせる LPS を生後 11 週に投与させた結果、対照群では増加した Lrtm1 および Mrap は新生児 FR 処理群では増加しなかった。また、対照群では反応しなかったが、新生児期 FR 処理群では Il1b の発現が減少するといった対照群では反応が異なる遺伝子が 3 つ確認された。

新生児期 FR 処理により、免疫器官の発達が継続的に影響を受けることが明らかになり、また注目すべき遺伝子が絞られた。本課題で得られた結果は、これまで注目されてきた胎生期の栄養環境のみではなく、新生児期の栄養環境の変化も、個体の脆弱性に影響を及ぼすことを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

M Kuwagata, M Senuma, M Todoroki, F Kumagai, T Kumamoto, T Ogawa. . . Induction of a thoracolumbar supernumerary rib in rat developmental toxicity studies: A short discussion on the critical window. *Congenital Anomalies*, 査読有、*Accepted on Nov 29*. 2018. doi: 10.1111/cga.12320.

M Kuwagata, Y Sakai, S Tanaka et al., Historical control data on developmental toxicity studies in rats. *Congenital Anomalies*, 査読有、*Accepted on Aug 7*. 2018. doi: 10.1111/cga.12305.

M Kuwagata, F Kumagai, Y Saito, K Higashisakab, Y Yoshioka, Y Tsutsumi. Permeability of skin to silver nanoparticles after epidermal skin barrier disruption in rats. *Fundam Toxicol Sci* 査読有、4(3) 2017, 109-119

R Ohta, F Kumagai, H Marumo, K Usumi, Y Saito, M Kuwagata. Stress reactive

(high-avoidance rats) have a shorter life span than stress non-reactive rats (low-avoidance rats). Journal of Toxicologic Pathology 査読有、 29. 77-84 2016

〔学会発表〕(計 6 件)

等々力舞、瀬沼美華、熊谷文明、斉藤義明、桑形麻樹子

新生児期低栄養暴露による免疫器官の発達への影響 . 第 34 回日本毒性病理学会総会および学術集会 2018.1.25-26、(沖縄、那覇)

M. Kuwagata, J Shibato, R Rakwal, M Senuma M, M Todoroki, T Ogawa

Seeking genes responsible for developmental origins of health and disease from neonatal mouse liver following maternal food restriction.

56th Society of Toxicology Annual Meeting Baltimore, 2017. 3.12-15 (MA, USA)

等々力舞、瀬沼美華、熊谷文明、斉藤義明、桑形麻樹子

新生児期低栄養暴露児の LPS 曝露に対する免疫反応の増強

第 33 回日本毒性病理学会総会および学術集会 2017. 1.26-27 (大阪、堺市)

等々力舞、瀬沼美華、熊谷文明、斉藤義明、桑形麻樹子

発達期高脂肪食による児の免疫組織への形態学的影響

第 32 回日本毒性病理学会総会および学術集会 2016. 1.28-29 (香川、高松)

瀬沼美華、等々力舞、柴藤淳子、Rakwal Randeep, 小川哲郎、桑形麻樹子

新生児期の栄養環境変化による生活習慣病発症責任遺伝子群の検索

第 55 回日本先天異常学会学術集会 2015. 7.25-27 (神奈川、横浜)

小川哲郎、柴藤淳子、斉藤智美、Rakwal Randeep、桑形麻樹子、瀬沼美華、塩田清二

マウス低栄養モデルを用いた DOHaD 責任遺伝子の検索

第 55 回日本先天異常学会学術集会 2015. 7.25-27 (神奈川、横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：柴藤順子

ローマ字氏名：Shibatoh Junko

研究協力者氏名：小川哲郎

ローマ字氏名：Ogawa tetsuo

研究協力者氏名：ラクワル ランディーブ

ローマ字氏名：Rakwal Randeep

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。