

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19388

研究課題名(和文) 発生学的考察に基づいた、低出生体重児の循環器リスクを明らかにする基盤技術の創出

研究課題名(英文) Development of the murine low birth weight model

研究代表者

有馬 勇一郎 (Arima, Yuichiro)

熊本大学・医学部附属病院・寄附講座教員

研究者番号：60706414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低出生体重児は、循環器疾患を含めた成人後の循環器リスクを上昇させることが知られているが、メカニズムは明らかでない。本研究では原因を明らかにするためのモデルマウスの作成を行なった。妊娠したICRマウスに対して、カロリー制限と帝王切開を施すことで、2種類の低出生体重マウスを作成することを可能とした。一部の群では成長と共に重量差が消失しており、なんらかの代償機構が働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to generate murine low birth weight models. Using the calorie restriction or early delivery, we successfully established two types of low birth weight models. Serial measurement of body weights showed low birth weight partially normalized in adult. These changes suggested that something compensation mechanisms would work during development.

研究分野：循環器内科学

キーワード：低出生体重 D0HaD 動物モデル

### 1. 研究開始当初の背景

世界で生まれる子供の16%は出生児体重が2,500g未満の低出生体重児である(UNICEF 世界子供白書2016)。Developmental Origin of Health and Disease(DOHaD)学説は糖尿病、慢性腎臓病、虚血性心疾患といった成人後の生活習慣病が胎生期の状況に影響されるという概念で、Barkerらが1986年に低出生体重であることが将来の虚血性心疾患の罹患リスクを上昇させることを明らかにした報告に由来する(Barker et al., Lancet 1986)。これまでに大規模な疫学研究が欧米でなされており、出生時体重2500g未満では約3割、2300g未満では約5割虚血性心疾患のリスクが上昇することが報告されている(Rick-Edwards et al., BMJ 1997)。また近年になりゲノムワイドの解析も行われ、低出生体重が成人後の血圧・冠動脈疾患の発症と強く相関することが報告された(Horikoshi et al., Nature 2016)。

先進国の中で日本は特に低出生体重児の問題に直面している。出産年齢の高齢化や妊婦のやせ(低栄養)などの要因が加わり、厚生労働省の最新の人口動態統計によると、出生児体重2500g未満の低出生体重児の割合は全出生児のおよそ1割に達している(図1)。加えて、日本は諸外国と比べて新生児の救命生存率が著しく高く、その結果として日本では低出生体重で生まれた胎児の大部分が成人まで成長できるという大きな特徴を有する。これは高度先進医療の進歩による恩恵であるが、同時に循環器疾患を含めた生活習慣病罹患のハイリスク群が将来にわたって増加することを意味し、今の時点でリスクに対する備えを検討する必要がある。しかしながらDOHaD学説は疫学研究により明らかになったもので、なぜリスクが上昇するのかというメカニズムについては未解明な点が多く、特に循環器領域においてその機序を明らかにした報告はない。

### 2. 研究の目的

本研究は周産期に加わる環境ストレスが、成長後の個体の機能低下にどのように作用するかを検証することを目的とする。そのために必要な動物実験モデルを作出するため、妊娠中期のカロリー制限、もしくは帝王切開を用いた早期娩出による異なる種類の低出生体重マウスモデル作成を試みた。

### 3. 研究の方法

以下の方法で実験を行なった。

- (1) 低出生体重マウスの作成  
カロリー制限もしくは帝王切開による早期娩出により、低出生体重マウスの作成を試みた。
- (2) 心臓における構成細胞比率の変化  
細胞核の単離法を検討し、FACSによる細胞種別の単離と、構成比率の解析を試みた。

- (3) 心筋障害モデルの作成  
生後3日目のマウスに対して、凍結障害を施すことで、心筋再生能を検討した。
- (4) 転写産物の網羅的解析  
採種した心臓組織を用いてマイクロアレイ解析を行い、変動因子について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 低出生体重マウスの作成

妊娠したICRマウスに対して、胎生中期より50%の総カロリー制限を施すことで、安定的に出生時体重の軽いマウスを作出することができる。同時に出生予定日前日に帝王切開により胎児を娩出するモデルも作出し、2種類の低出生体重マウスを作出することを可能とした。出生後の体重を経時的に測定すると、カロリー制限により作出した低出生体重マウスは3週齢時点で重量差が消失していることが明らかとなった(図1)。

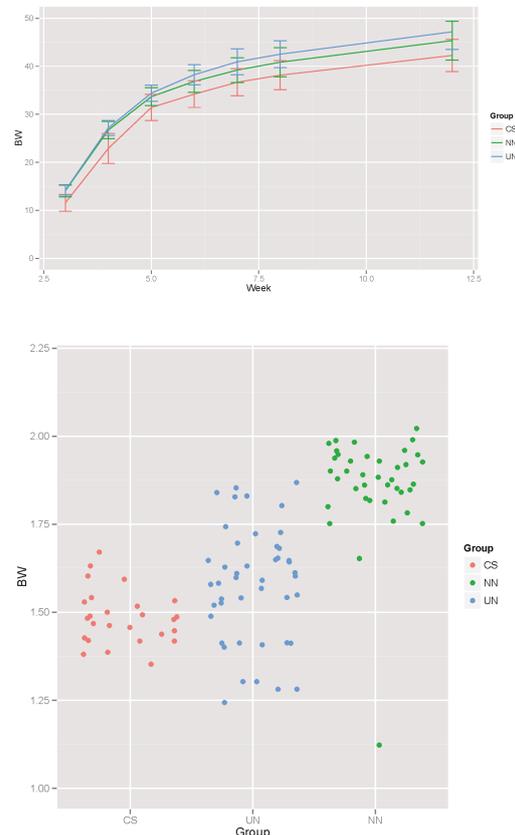


図1:(左図)出生児体重、左より帝王切開による低体重マウス、カロリー制限による低体重マウス、対照群。(右図)3週齢以降の体重推移:(赤)帝王切開による低体重、(青)カロリー制限による低体重、(緑)対照群、カロリー制限モデルと対照群の体重差は、3週齢以降は消失する。

- (2) 心臓における構成細胞比率の変化  
低出生体重マウスの心室重量についても成人期には重量差が消失しており、なんらかの

代償機構が働いていることが示唆された。低出生体重マウスでの心臓における表現型を明らかにするため、採取した心臓から細胞核を抽出し、核染色と心筋細胞の核を染色し、フローサイトメトリーを用いて心筋・非心筋分画に分けて構成細胞比率を測定した。その結果、生後3日目の時点で低体重マウスでは非心筋細胞分画が有意に低下していることが確認された(図2)。

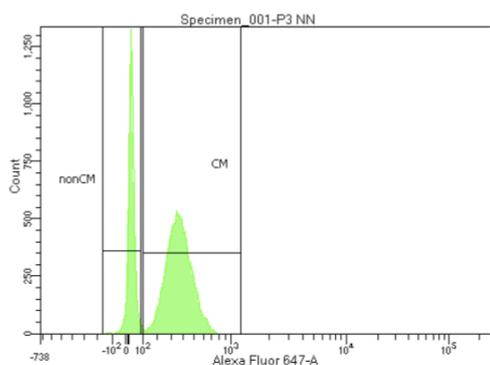


図2:細胞核を用いた構成比率の解析。抗 PCN-1 抗体を用いて心筋細胞核を標識後、FACS にてソーティングした。生後3日目の心臓では対照群に比べて、低出生体重マウスの非心筋細胞分画が有意に低下している。(対照群: 31.8±1.5%、低出生体重マウス: 26.3±2.2%, n=4, p<0.05)

### (3) 心筋障害モデルの作成

低出生体重マウスの心疾患リスク上昇のメカニズムを明らかにするため、生後3日目の心筋に凍結障害を加え、心筋再生能、障害応答能を検討した。生後6週時点で心機能を評価すると、低出生体重マウスでは左心室の有意な拡大を認め、心筋再生能が低下している可能性が示唆された(図3)。

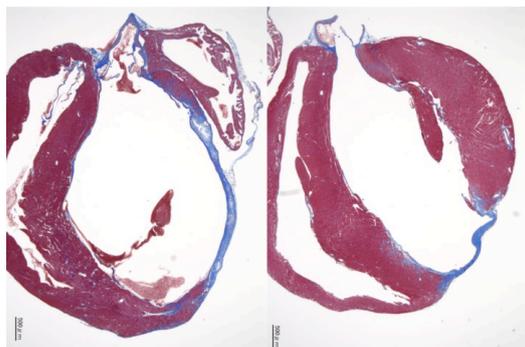


図3:心筋凍結障害作成後、6週齢での組織所見(マッソントリクローム染色)。障害部位を反映する心筋線維化領域が、低体重マウス群で後半に認められる(左:低体重マウス、右対照群)。

(4)ケトン体合成酵素、HMGCS2 の変化を同定  
低出生体重マウスで認められる心臓表現型の分子メカニズムを明らかにするため、単離心筋を用いたマイクロアレイ解析を行い、対照群と低出生体重マウスでの遺伝子発現を比較した。その結果、生後3日目の低出生体重マウスでHMGCS2 の発現が低下していることを確認し、

タンパクレベルでも発現が減少していることを確認した(図4)。



図4:HMGCS2発現比較(WB)。生後3日目の心臓をサンプルとして利用した。対照群(NN)と比較して低体重群(UN)では、HMGCS2 の発現が低下している。

### (5) HMGCS2 ノックアウトマウスの作成

HMGCS2 の機能を検討するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて HMGCS2 ノックアウトマウスを樹立した。本 KO マウスは2017年4月時点でデータベース上に報告がなく、新たに樹立した遺伝子欠損マウスである。

以上の研究により、新生仔期の低出生体重マウス心臓では心筋細胞と非心筋細胞の構成細胞比率が変化していることが明らかとなり、心筋再生能の低下が認められた。同時に、これまでケトン体を消費すると考えられていた心臓において、一時的にケトン体産生が亢進する時期があることが明らかとなり、低出生体重マウスではケトン体合成能の低下が生じていることを見出した。心筋のエネルギー代謝は、胎仔期は解糖系が中心であるが成体では脂肪酸酸化が主体となる。新生仔期はその移行期に当たるが、その移行期にケトン体合成能が亢進する意義については明らかでない。現在で低出生体重マウスにおける心筋形質の変化を、心筋エネルギー代謝の変化とケトン体合成能の関わりを中心に検討しながら、特に HMGCS2 の発現調整領域について DNA メチル化の解析を行いながら、病的及び生理的意義を見いだすことを目標としている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Arima Y, Kaikita K, Ishii M, Ito M, Sueta D, Oimatsu Y, Sakamoto K, Tsujita K, Kojima S, Nakagawa K, Hokimoto S, Ogawa H. Assessment of platelet-derived thrombogenicity by the total thrombus-formation analysis system in coronary artery disease patients on antiplatelet therapy. J Thromb Haemost. 2016 Apr;14:850-9.
2. Kitazawa T, Fujisawa K, Narboux-Nême N, Arima Y, Kawamura Y, Inoue T, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Kodama T, Kim KS, Sato T, Uchijima Y, Maeda K, Miyagawa-Tomita S, Minoux M, Rijli FM, Levi G, Kurihara Y, Kurihara H. Distinct effects of Hoxa2 overexpression in cranial neural crest populations reveal that the mammalian hyomandibular-ceratohyal boundary maps within the styloid process. Developmental Biology. 2015 Jun 15;402(2):162-74.

[学会発表] (計2件)

1. 第4回日本DOHaD研究会 学術集会 2015年8月1-2日、昭和大学(東京)  
胎生期低栄養マウスモデルにおける心重量・心機能の検討  
有馬勇一郎
2. 第5回日本DOHaD研究会 学術集会 2016年7月23-24日、成育医療センター(東京)  
胎生期低栄養マウスにおける心重量の変化  
有馬勇一郎

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ  
<http://www.kumadai-junnai.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 勇一郎 (ARIMA, Yuichiro)  
熊本大学医学部付属病院  
心血管治療先端医療寄附講座  
循環器内科 特任助教  
研究者番号：60706414