

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791173  
 研究課題名 (和文) 母体カロリー摂取制限による胎児オートファジーの誘導と発育への影響に関する解析  
 研究課題名 (英文) Involvement of intra utero growth retardation on fetal autophagy and infant growth  
 研究代表者  
 根本 崇宏 (NEMOTO TAKAHIRO)  
 日本医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：40366654

## 研究成果の概要：

交配後の給餌量をコントロールラットの 60%に制限した母体から生まれた仔ラットの体重は妊娠期間を通して自由に摂食した母ラットの仔よりも生後 6 週齢で 25.5%軽く、体長も約 20%短かった。生後 7 週齢での比較では摂餌制限群とコントロール群間では有意な差は見られなくなっていたが、摂餌制限群の 10%で対照群の平均 $\cdot$ 2SD 以下に満たない個体が存在した。カロリー制限母ラットの妊娠期間や出産数、仔ラットの 9 週齢までの生存率や出生児の体重あたりの臓器重量および肉眼的形態には変化が無かった。飢餓などでオートファジーが誘導されやすい肝臓で、低出生体重仔ラットのオートファジーの誘導をウェスタンブロッティング法で解析したが、コントロール仔ラットとの間に変化は見られなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・産婦人科学

キーワード：カロリー制限、母胎、発育

## 1. 研究開始当初の背景

肥満妊婦では難産の確率が高くなり、妊娠中毒症の危険性も高まるため、妊婦の体重増加を抑えるようにとの指導が多いが、実際には妊娠中の体重増加が極端に少ない妊婦が増えている。低出生体重児の出産要因には妊婦の喫煙や飲酒が挙げられている

が、摂取カロリー制限や偏食も低出生体重児のリスクファクターであると考えられている。胎児の発育や機能分化のための栄養素は全て母体の食事に依存しており、適切な時期に適切な栄養素が供給されないと低出生体重児が生じることも明らかになっている。動物実験においても摂餌量を 30%制

限したマウスの新生仔は体重が 17%減少したとの報告がある。低出生体重児は成長後に肥満、耐糖能異常、高血圧、心血管障害、腎機能低下などの疾患だけでなく、統合失調症や人格障害などの精神神経系の発達にも影響を及ぼすことが報告されている。

オートファジーは、飢餓に応答して自己のタンパク質をアミノ酸に分解することで、それらを栄養素として利用し飢餓に耐えるタンパク質分解機構である。オートファジーは選択的タンパク質分解系であるユビキチン-プロテアソーム系と異なり、細胞内小器官や細胞質タンパク質を隔離膜に取り込み、リソソームに輸送し、リソソーム酵素により非選択的に分解する。オートファジーの実行過程では、ユビキチン様タンパク質修飾機構と類似した ATG 遺伝子群による Atg12p-Atg5p 複合体の形成と Atg8p (哺乳細胞では MAP-LC3) の脂質修飾と、オートファゴソームと呼ばれる隔離膜で包まれた小胞の形成が観察される。オートファゴソーム形成過程において Atg12p-Atg5p 複合体は隔離膜伸長先端に、脂質修飾を受けた Atg8p は隔離膜の内外に結合することが明らかになっている。申請者はこれまでにオートファジー実行分子であるマウス *ATG10* 遺伝子(当初は *APG10* 遺伝子)を単離し、*ATG10* 遺伝子過剰発現で Atg12p-Atg5p 結合体形成と MAP-LC3 の脂質修飾が亢進することを明らかにした (Nemoto, et al. *J.Biol Chem* 2003)。

これまでの研究で新生児におけるオートファジーは重要であることが明らかにされている。胎盤を介した栄養供給は出産時に突然遮断され、母乳摂取により栄養状態が回復するまでの間、新生児は深刻な飢餓に直面することから、新生児はオートファジーによりこの危機を凌ぐことが示されている。オートファゴソーム形成に必要な *atg5* あるいは *atg7* 遺伝子を欠損したマウスは、ほぼ正常に生まれるが、自身のタンパク質をオートファジーで分解し栄養素としてのアミノ酸を産生することが不可能であるため、生後 1 日以内に死亡する (Kuma A, et al. *Nature* 2004 432: 1032-1036, Komatsu M, et al. *J Cell Biol* 2005 169: 425-434)。胎児では母体から常に十分な栄養が胎盤を通して供給され続けているため、オートファジー活性は低く保たれていると考えられているが、母体のカロリー摂取不足で胎児への十分な栄養が供給されないと、発生・分化途中の胎児組織でオートファジーが誘導され、発育の遅延や異常が発生するのではないかと仮説を申請者は立てた。

## 2. 研究の目的

摂取カロリー制限や偏食も低出生体重児のリスクファクターであると考えられている。胎児の発育や機能分化のための栄養素は全て母体の食事に依存しており、適切な時期に適切な栄養素が供給されないと低出生体重児が生じることも明らかになっている。母体のカロリー摂取不足で胎児への十分な栄養が供給されないと、発生・分化途中の胎児組織でオートファジーが誘導され、発育の遅延や異常が発生するのではないかと仮説を申請者は立て、母体カロリー摂取制限による胎児オートファジーの誘導と低出生体重児や子宮内胎児発育遅延の関連を明らかにすることを本研究課題の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 妊娠全期を通して母ラットの食餌量を対照ラットよりも 40%に抑制し、母獣血中栄養素の解析や母獣の肝・心・骨格筋・腎におけるオートファジーの誘導の有無を明らかにする。

(2) 食餌制限母ラットから胎盤および胎仔を摘出し、胎盤および胎仔肝・心・骨格筋・腎の各組織での Atg12p-Atg5p 複合体形成と Atg8p の脂質修飾についてウェスタンブロット法を用いて解析し、オートファジー誘導の有無を明らかにする。

(3) 食餌制限母ラットから出生した仔ラットの視床下部や下垂体での摂食、エネルギー代謝、ストレス応答に関与する遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で比較し、食餌制限による代謝やストレス反応性の違いを明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 交配後の給餌量をコントロールラットの 60%に制限した母体から生まれた仔ラットの体重は妊娠期間を通して自由に摂食した母ラットの仔よりも生後 6 週齢で 25.5%軽く、体長も約 20%短かった。生後 7 週齢での比較では摂餌制限群とコントロール群間では有意な差は見られなくなっていたが、摂餌制限群の対照群の平均-2SD 以下に満たない個体が 10%存在した。母獣の摂餌量を 40%抑制した群では出生仔の出生時体重はより軽くなったが、妊娠期間、出生数、生存率、肝臓でのオートファジー誘導の有無のいずれについても 60 に制限した群と変化は見られなかった。

(2) カロリー制限母ラットの妊娠期間や出産数、仔ラットの 9 週齢までの生存率や出生

児の体重あたりの臓器重量および肉眼的形態には変化がなかった。飢餓などでオートファジーが誘導されやすい肝臓で、低出生体重仔ラットのオートファジーの誘導をウェスタンブロッティング法で Atg12-Atg5 複合体の有無について解析したが、コントロール仔ラットとの間に変化は見られなかった。以上のことから、母体の 40% のカロリー制限による子宮内発育不全では、胎仔および新生仔にオートファジーの誘導は見られないことが明らかとなった。さらに出産間近の母獣の肝臓および骨格筋では顕著なオートファジーの誘導が見られたことから、母獣は自らを犠牲にし、胎児への栄養補給を行っていることが示された。オートファジーの誘導は主として血中のアミノ酸によって制御されているとの報告があることから、母獣に低脂肪・高タンパク質食でカロリー制限を行ったが、出生仔の出生時体重および仔のオートファジーの誘導、母獣のオートファジーの誘導いずれにおいても通常食との間に変化は見られなかった。このことから、食餌中の栄養成分よりも絶対的な摂取カロリーが母獣のオートファジーの誘導と胎仔および出生仔の成育を制御していると考えられる。

(3) 成長障害の見られた発育不全仔ラットの視床下部における代謝関連遺伝子発現量の比較では空腹情報を伝える胃由来のペプチドホルモンの受容体である GHS-R 発現量が対照よりも少なかった。このことは、胎仔期のエネルギー不足により空腹情報を視床下部に伝えるグレリンの作用が抑えられることで、エネルギー消費が少ない体になっている可能性が高いことを示している。また、子宮内発育遅延児の 33% では、成長ホルモン分泌が低下しているとの報告がある。グレリンは強力な成長ホルモン分泌促進作用を有しているが、GHS-R 発現量の低下により成長ホルモン分泌が低下している可能性も十分に考えられる。今後、発育不全ラットでの血中成長ホルモン濃度の測定や成長ホルモン投与による発育改善効果についても検討したい。

(4) 視床下部では抗不安作用を有するウロコルチン 2 発現量が減少しており、ストレス感受性が高くなっていることも考えられる。これは子宮内発育遅延児にみられる精神発育遅延に関与する可能性もあり、今後さらなる検討が必要であると考えられる。我々は、このウロコルチン 2 が下垂体にも発現し、ゴナドトロピンの発現と分泌を抑えることを明らかにした。ウロコルチン 2 の中和抗体の連日投与は未成熟雌ラットの初回発情開始までの日数を短縮する傾向を示したことから、母胎カロリー不足による下垂体ウロコル

チン 2 の変化についても今後検討を加える予定である。下垂体ウロコルチン 2 にも変化が見られるならば、子宮内発育遅延での性腺系への影響に下垂体ウロコルチン 2 が関与する可能性も考えられる。

(5) 今回の申請研究ではどのような機序によってカロリー制限母獣から出生した仔の GHS-R やウロコルチン 2 遺伝子発現量が変化したか、明らかになっていない。今後は変化の機序についても遺伝学的解析を行っていききたい。

#### 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) Takahiro Nemoto, Naoko Yamauchi Tamotsu Shibasaki. Novel action of pituitary urocortin 2 in the regulation of expression and secretion of gonadotropins. *Journal of Endocrinology*. 201 (1) 105-114, 2009
- (2) Arika Mano, Hisayuki Ohata, Azusa Iwasaki, Takahiro Nemoto, Tamotsu Shibasaki. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *Journal of Endocrinology*, in press.

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 根本 崇宏、山内 直子、芝崎 保. 下垂体ウロコルチン 2 はゴナドトロピンの遺伝子発現と分泌を抑制制御している 第 81 回 日本内分泌学会学術総会 2008 年 5 月、青森
- (2) Takahiro Nemoto, Naoko Yamauchi, Tamotsu Shibasaki. Pituitary urocortin 2 is involved in the regulation of expression and secretion of gonadotropins. The Endocrine Society's Annual Meeting (90th ENDO), 2009 年 6 月 San Francisco, CA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 崇宏 (TAKAHIRO NEMOTO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40366654

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者