

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08274

研究課題名(和文) 低栄養発育胎児における有機陰イオン輸送体の機能の解明

研究課題名(英文) Functional elucidation of an organic anion transporter which is overexpressed in undernutrition condition during fetus development.

研究代表者

内村 康寛 (Uchimura, Yasuhiro)

滋賀医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：90803990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの胎児期低栄養発育で高発現する遺伝子であるSLC22a23遺伝子のノックアウトラットを作製した。SLC22a23遺伝子のノックアウトラットは、体重増加量の低下を示した。オープンフィールド解析で、有意に総移動距離が増加しており、多動の表現型を示した。一方、前肢の牽引力が有意に低下していた。臓器を単離したところ、脳全体と、下肢の筋の重量が有意に低下していた。これらの結果は、SLC22a23遺伝子のノックアウトにより、サルコペニア様の表現型が引き起こされることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLC22a23ノックアウトラットは未だ報告されておらず、本研究での解析が新規であることから、学術的意義がある。本研究でSLC22a23ノックアウトラットが、サルコペニア様の表現型を示すことから、SLC22a23輸送体の基質を同定することで、サルコペニアを防ぐための知見が得られる可能性があり、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We generated SLC22a23 gene knockout rat. The SLC22a23 gene knockout rat showed reduced weight gain after weaning. The total distance travelled was statistically significantly increased in the knockout rat in our open-field analysis. In contrast, forelimb traction was statistically significantly reduced in the knockout rat. The weights of total brain and lower limb muscles were statistically significantly reduced in the knockout rat. These results suggest the SLC22a23 gene knockout rat have a sarcopenia-like phenotype.

研究分野：DOHaD

キーワード：DOHaD サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

妊娠中の母親の栄養状態は胎児の発育に極めて重要であり、一見正常に生まれた新生児でも、成人になった時点での糖尿病や精神疾患などの病気の発症に深く関与することが疫学的に示され、DOHaD 仮説が唱えられている (Barker 1998, Harding 2001)。本国においても、女性の痩せ願望による極度のダイエットが、胎児の発育に影響を与え、成長後の病気の発症に深く関わっていることが懸念されている。本研究テーマにおける未解決な点は、DOHaD 仮説の基盤となる分子メカニズムが明らかにされていない点である。

このため我々は、ラットをモデル動物として用いた DOHaD 研究を行なっている。胎生 5.5 日から 10.5 日の 5 日間、妊娠ラットをコントロール群の 40% の給餌量で飼育することで子宮内飢餓状態にし、その後は自由量 (Ad libitum) の給餌で飼育する DOHaD 実験系を構築した (図 1)。ラットの胎生 5.5 日から 10.5 日までの期間は、受精卵が子宮に着床する時期から神経管が閉鎖する直前の時期にあたり、初期発生における極めて重要な時期である。低栄養とコントロールラットを比較し、胎生 10.5 日の低栄養ラット胎児の脳 (前脳) で遺伝子発現が変化している遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析した。この結果、SLC22a23 遺伝子が低栄養ラット胎児の前脳で特異的に増加していることを見出した ($fc > 2$, $padj < 10^{-13}$)。

SLC22 輸送体ファミリーは、その配列の相同性から約 30 の遺伝子が知られている。これら輸送体の解析が、薬剤の取り込みや排出の観点から、腎臓・肝臓・小腸などの臓器で精力的に行われている。このうち特定の SLC22 陰イオン輸送体がプロスタグランジンなどの生体において非常に重要なメッセージ物質の輸送を行っていることが明らかにされている。このため、そのアミノ酸配列から、SLC22 輸送体ファミリーの陰イオン輸送体に属すると考えられる SLC22a23 輸送体が、生理的に重要な低分子化合物の輸送に関わっている可能性がある。このため、SLC22a23 輸送体の発現部位や基質などの機能を明らかにし、DOHaD における SLC22a23 輸送体の役割を明らかにしていく。

2. 研究の目的

SLC22a23 遺伝子の高発現により、細胞膜からの特定の陰イオンの過剰な取り込みが起き、成獣ラットの行動異常が引き起こされていると考えた。しかしながら、SLC22a23 輸送体の生体内での発現部位や輸送される物質は不明である。このため、SLC22a23 輸送体の機能の詳細を明らかにし、DOHaD の分子メカニズムを明らかにしていく。

3. 研究の方法

SLC22a23 遺伝子ノックアウト(KO)ラットの解析：我々は、胎児期に子宮内で低栄養を経験したラットにおいて、SLC22a23 輸送体が高発現し、これにより特定の陰イオンの (神経細胞における) 取り込みが増加することで、成獣ラットにおける行動異常が引き起こされていると考えている。この仮説に従うと、SLC22a23 遺伝子 KO ラットは、胎児期低栄養による行動異常の誘引に対し、抵抗性を持つと予想される。このため、SLC22a23 遺伝子のコンディショナル KO ラットを作製し、SLC22a23 遺伝子の機能を解析していく。コンディショナル KO ラットの作製には、CRISPR/Cas9 を用いる。SLC22a23 遺伝子の第 4 エキソンを loxP で挟み、floxed-SLC22a23 ラットを作製する。この floxed-SLC22a23 ラットと全身性に Cre 組換え酵素を発現する Wistar-Tg(CAG-cre)81Jmsk (NBRP-Rat No.0283) を交配させることで、SLC22a23 遺伝子を全身性に欠損させる。また、神経細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する nestin-CRE ラットを作製し、交配に用いることで、神経細胞特異的に SLC22a23 遺伝子を欠損させる。研究協力者の大阪大学大学院医学系研究科 実験動物学教室の真下知士 准教授は、CRISPR/Cas9 を用いたコンディショナル KO ラットを作製の豊富な経験がある (Miyasaka et al., 2018)。作製した SLC22a23 遺伝子 KO ラットの行動解析を行う。

食餌量の計測：SLC22a23 輸送体の有無による体重の差が、主に、(i) 摂取する食餌量の差に由来するのか、(ii) 体内での栄養の蓄積効率の差によるものであるのかを明らかにする。SLC22a23^{+/+} のヘテロ同士の交配し、産まれた同腹仔 (littermate) の食餌量と体重を、離乳後の生後 3 週以降、成獣に達するまで測定して、比較する。

4. 研究成果

ラットの胎児期低栄養発育で高発現する遺伝子である SLC22a23 遺伝子のノックアウトラット

を作製した。SLC22a23 遺伝子のノックアウトラットは、体重増加量の低下を示した。オープンフィールド解析で、有意に総移動距離が増加しており、多動の表現型を示した。一方、前肢の牽引力が有意に低下していた。臓器を単離したところ、脳全体と、下肢の筋の重量が有意に低下していた。これらの結果は、SLC22a23 遺伝子のノックアウトにより、サルコペニア様の表現型が引き起こされることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Getachew Dereje, Matsumoto Akihiro, Uchimura Yasuhiro, Udagawa Jun, Mita Nanako, Ogawa Noriko, Moriyama Shigeru, Takami Akiyasu, Otani Hiroki	4. 巻 61
2. 論文標題 Global pattern of interkinetic nuclear migration in tracheoesophageal epithelia of the mouse embryo: Interorgan and intraorgan regional differences	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 82 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamagawa T, Lundh T, Shigetoshi K, Nitta N, Ushio N, Inubushi T, Shiino A, Karlsson A, Inoue T, Mera Y, Hino K, Komori M, Morikawa S, Sawajiri S, Naka S, Honma S, Kimura T, Uchimura Y, Imai S, Egi N, Otani H, Udagawa J	4. 巻 15
2. 論文標題 Correlation between musculoskeletal structure of the hand and primate locomotion: Morphometric and mechanical analysis in prehension using the cross- and triple-ratios	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0232397 ~ 0232397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishikura Noriko, Hino Kodai, Kimura Tomoko, Uchimura Yasuhiro, Hino Shinjiro, Nakao Mitsuyoshi, Maruo Yoshihiro, Udagawa Jun	4. 巻 150(2)
2. 論文標題 Postweaning Iron Deficiency in Male Rats Leads to Long-Term Hyperactivity and Decreased Reelin Gene Expression in the Nucleus Accumbens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 212-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jn/nxz237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tetsuo Ono, Kodai Hino, Tomoko Kimura, Yasuhiro Uchimura, Takashi Ashihara, Takako Higa, Hideto Kojima, Takashi Murakami, Jun Udagawa	4. 巻 62
2. 論文標題 Excessive folic acid intake combined with undernutrition during gestation alters offspring behavior and brain monoamine profiles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 169-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内村 康寛
2. 発表標題 胎児期低栄養で発現が増加するSLC22a23輸送体の機能解析
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回 日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宇田川 潤 (Udagawa Jun) (10284027)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------