

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591236

研究課題名（和文）

メタボリック症候群発症の背景としての脳脂肪細胞系の生後発達とその異常に関する検討

研究課題名（英文）

Postnatal development of the brain-adipose axis and its abnormality: as the background of the metabolic syndrome

研究代表者

山本幸代（ YAMAMOTO YUKIYO ）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：20279334

研究成果の概要（和文）：

Nesfatin-1は近年発見された摂食調節蛋白で脳脂肪細胞系の主要因子として注目されている。今回我々は生後発達過程の仔ラットを用いて視床下部におけるNesfatin-1遺伝子発現を*In situ*ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。Nesfatin-1遺伝子の発現は、生後発達過程においてそれぞれ特異的な発現動態のパターンを呈し、それぞれの部位における生理作用に密接に関連している可能性があることが示唆される。次に我々は、母仔分離による母乳制限が遺伝子発現に与える影響を検討した。PVN、SONともにNesfatin-1遺伝子の発現は有意に増加した。Nesfatin-1は離乳前の時期においても浸透圧調節に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To begin to understand the physiological role of Nesfatin-1 during postnatal development, we examined the developmental changes of the Nesfatin-1 gene expression in the PVN, SON and ARC during postnatal day 1 to day 60, using *in situ* hybridization histochemistry. Development of Nesfatin-1, which showed different patterns each hypothalamic nucleus during postnatal development, may be associated with its region-specific roles during postnatal development. Next, we examined the effect of the maternal deprivation for twenty-four hours on the gene expression of the Nesfatin-1 during pre-weaning period. After 24 h milk deprivation, the Nesfatin-1 gene expression was significantly increased at postnatal day 15. Significant increase in the expression of the Nesfatin-1 gene after milk deprivation suggested that osmolality change induced by milk deprivation might be a stimulant to induce the expression of the Nesfatin-1 gene in the preweaning period. Development of Nesfatin-1 may be associated with its critical role in the maturation of neurosecretory function in the hypothalamus-pituitary axis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：Nesfatin-1、室傍核、弓状核、摂食調節、生後発達、脳脂肪細胞系、視床下部、視索上核

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪蓄積を必須基盤として発症するメタボリック症候群は、糖代謝異常、脂質代謝異常、血圧異常が集積する病態で、現代医療の主要な課題となっている。その中心的病態である肥満（内臓脂肪蓄積）は摂食行動とエネルギー代謝調節機構の異常によって生じ、視床下部が中心的役割を果たす。視床下部において摂食促進系や抑制系が形成する複雑なネットワークの解明が進んでおり、新規の生理活性物質やその受容体の発見が相次いでいる。それらの因子のほとんどは末梢脂肪組織にも存在しており、脂肪細胞の分化増殖に影響を及ぼす。このように脳視床下部と末梢脂肪細胞の密接な双方向性の機能連関は脳・脂肪細胞系と定義され、その破綻は過食、肥満を来とし、さらに糖尿病、高脂血症などのメタボリック症候群発症の重要な要因と考えられる。しかし脳脂肪細胞軸の複雑なネットワーク形成の出生後発達の機構や調節因子に関しては未解明の領域である。

2. 研究の目的

小児期において肥満やメタボリック症候群が急速に増加している背景には、現代社会における生活習慣の変化が子宮内あるいは新生児期の栄養状態の変化やそれに伴うホルモン環境の変化として小児の発達に恒久的に影響を与えることも深く関与している。特に胎児期の子宮内環境はもっとも早期の環境的要因と考えられる。その病態には摂食行動やエネルギー代謝を調節する脳・脂肪細胞軸の出生後発達の異常が存在することが考えられる。胎児期や新生児期は視床下部神経細胞の髄鞘化や軸索形成によるネットワーク形成の時期に当たり、摂食行動やエネルギー代謝の調節機構も出生後発達過程に複雑な調節機構が完成する。その時期は特に環境の変化に対して感受性が高いと考えられ、栄養状態やホルモン環境の変化が摂食行動調節機構に対して恒久的な異常を引き起こすメカニズムの解明は、メタボリック症候群の小児期での予防、治療に大きく貢献すると考えられる。本研究は脳・脂肪細胞軸の出生後発達の機構やそれを調節する種々の因子を解明およびすることを目的として、近年同定されている新規のアディポサイトカインや摂食調節神経ペプチドの出生後の発達過程における生理的発現変動を *In situ* ハイブリダイゼーション法、画像解析などを統合的に用いて検討を行なう。また出生前後の栄養状態やホルモン環境の脳脂肪細胞軸の出生後発達に及ぼす影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物

(1) 生後発達の検討

妊娠後期の Sprague-Dawley ラットを飼育し、出生した仔ラットの脳を Day1 (出生当日)、Day8 (新生児期後期)、Day15 (離乳開始)、Day22 (離乳完了)、Day40 (思春期)、Day60 (成熟期) に摘出した。(すべての日令で雄 n=6)

(2) 母乳制限による影響の検討

妊娠後期の SD ラットを飼育し、出生した仔ラットを 8 および 14 生日目に母ラットから一定温度 (8 日目: 34°C、15 日目: 33°C) で保温器に分離した。コントロール群は母ラットのゲージに残した。(各群雌雄 6 匹ずつ)

In situ hybridization

断頭後、脳を摘出し、脳凍結切片 (12 μm) を作成した。PVN、SON、ARC での Nesfatin 遺伝子の発現を RI 標識 (35S) した合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて検討した。画像解析装置 MCID (Imaging Research, Ontario, Canada) を用いて定量化した。各日令での発現量の平均値を One-way ANOVA によって解析した。Fisher's PLSD によって検定し、 $P < 0.05$ を有意とした。

統計学的検討

各日令での発現量の平均値を One-way ANOVA によって解析した。Fisher's PLSD によって検定し、 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

ラット視床下部での Nesfatin-1 遺伝子発現の検討—発現部位特異的な生後発達に伴う生理的変動—

(1) ARC での Nesfatin-1 遺伝子発現の生後発達に伴う変化

ARC での Nesfatin-1 mRNA 発現は出生当日から認められ、生後 8 日目 (新生児期後期) にかけて増加傾向を示した。その後、22 日目 (離乳完了期) までは発現量はほぼ一定で、40 日目 (思春期令) と 60 日目 (成熟期) では再度増加傾向を示した。

(2) PVN での Nesfatin-1 遺伝子発現の生後発達に伴う変化

PVN での Nesfatin-1 mRNA 発現は出生当日から認められず、生後 8 日目 (新生児期後期) ではじめて認められた。その後、発現量に有意な変化はなかったが、40 日目 (思春期令) 以降は低下する傾向が認められた。

(3) SON での Nesfatin-1 遺伝子発現の生後発達に伴う変化

SON での Nesfatin-1 mRNA 発現は出生当日から認められず、生後 8 日目 (新生児期後期) ではじめて認められた。その後、15 日目まで増加したが、22 日目以降は低下傾向を示した。40 日目 (思春期令) では 15 日目と比較し有意に低下していた。

生後発達過程での ARC、PVN、SON におけ

る Nesfatin-1 遺伝子発現は、それぞれの部位で異なっており、特異的な発現動態のパターンを呈した。Nesfatin-1 遺伝子発現の変動は、それぞれの発現部位における生理作用に密接に関連している可能性がある。生後発達過程において、Nesfatin-1 は PVN、SON、ARC でそれぞれ異なった生理作用を有することが示唆される。

母仔分離がラット視床下部での Nesfatin-1 遺伝子発現に及ぼす影響について

24 時間の母仔分離によって出生 15 日目では、PVN、SON とともに Nesfatin-1 遺伝子の発現は有意に増加した。これまでの報告では、成熟ラットでは絶食負荷で、Nesfatin-1 遺伝子の発現は低下することが報告されている。今回、離乳前の時期での母仔分離による母乳制限では Nesfatin-1 遺伝子の発現に有意増加したことは、成熟期における変化とは相反する結果であった。Nesfatin-1 は PVN、SON において Vasopressin および Oxytocin と共存していることが報告されており、浸透圧調節への関与が示唆されている。離乳前の時期での母仔分離は絶水刺激としても知られており、浸透圧上昇により遺伝子発現が上昇したことが示唆される。Nesfatin-1 は離乳前の時期においても浸透圧調節に関与していることが示唆された。

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 4 件)

1. Araki S, Dobashi K, Yamamoto Y, Asayama K, Kusuhara K. Increased plasma isoprostane is associated with visceral fat, high molecular weight adiponectin, and metabolic complications in obese children. *Eur J Pediatr*. 169(8) 965-970. 2010. (査読有)
2. Araki S, Dobashi K, Kubo K, Kawagoe R, Yamamoto Y, Kawada Y, Asayama K, Shirahata A. Prevalence of 'obesity disease' and 'metabolic syndrome' in obese pediatric outpatients at the University Hospital of Occupational and Environmental Health *J UOEH* 30 309-319 2008. (査読有)
3. Araki S, Dobashi K, Kubo K, Kawagoe R, Yamamoto Y, Kawada Y, Asayama K, Shirahata A. Plasma visfatin concentration as a surrogate marker for visceral fat accumulation in obese children *Obesity* 16 384-388 2008 (査読有)
4. Kawagoe R, Yamamoto Y, Kubo K, Dobashi K, Asayama K, Shirahata A, Ueta Y. Postnatal development of galanin-like peptide mRNA expression in rat hypothalamus. *Regulatory Peptide* 145 133-140 2008 (査読有)

[学会発表] (計 33 件)

1. Yamamoto Y, Araki S, Dobashi k, Gotoh M, Kusuhara K. Decreased plasma levels of brain-derived neurotrophic factor and its relationship with obesity-related metabolic complication, birth weight and plasma levels of adipocytokines in obese children. Neuroscience 2010, the Society's 40th annual meeting. 2010年11月15日. San Diego, USA (San diego Convention center)
2. Kawada K, Araki S, Kawagoe R, Kubo K, Yamamoto Y. Longitudinal study of thyroid function in girls with Turner syndrome. 14th International Congress of Endocrinology 2010. 2010年3月26日. 京都(京都国際会議場)
3. Kubo K, Yamamoto Y, Kawagoe R, Gotoh M, So M, Araki S, Kusuhara K. Developmental changes of neuromedin U and galanin-like peptide gene expressions in the rat pituitary: an analysis by *in situ* hybridization histochemistry. 14th International Congress of Endocrinology 2010. 2010年3月26日. 京都(京都国際会議場)
4. 後藤元秀, 山本幸代, 斎藤玲子, 荒木俊介、久保和泰、川越倫子、楠原浩一、土橋一重、神代万壽美、有馬透. 高TG血症による急性膵炎を発症した二例. 第37回日本小児栄養消化器肝臓学術総会. 2010年10月9日. 高松(かがわ国際会議場)
5. 石井雅宏, 山本幸代、後藤元秀、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、下野昌幸、楠原浩一. 新しい骨質マーカーとしての低分子カルボキシル化オステオカルシンの重症心身障害児(者)における検討. 九州医師会医学会総会. 2010年11月13日. 鹿児島(城山観光ホテル)
6. 後藤元秀、土橋一重、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、山本幸代、朝山光太郎、楠原浩一. 肥満小児における血中脳由来神経栄養因子の血中レベルとアディポサイトカインとの関連性. 第113回日本小児科学会学術総会. 2010年4月23日. 盛岡(盛岡市民文化ホール)
7. 後藤元秀、河田泰定、山本幸代、石井雅宏、荒木俊介、川越倫子、久保和泰、楠原浩一、鳴海覚志、長谷川奉延. 甲状腺受容体 β にヘテロ接合型遺伝子変異を認めたTSH不適切分泌症候群(SITSH)の7歳女児例. 第83回日本小児内分泌学会. 2010年10月7日. 大阪(大阪市中央公会堂)
8. 河田泰定、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、山本幸代、楠原浩一. 腹腔鏡にて性腺摘出術を行ったX/XY混合性性腺異形成症の2例. 第83回日本小児内分泌学会. 2010年10月7日. 大阪(大阪市中央公会堂)

9. 石井雅宏、山本幸代、後藤元秀、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、下野昌幸、楠原浩一。重症心身障害児(者)における新しい骨質マーカーとしての低分子カルボキシル化オステオカルシンの検討。第83回日本小児内分泌学会。2010年10月7日。大阪（大阪市中央公会堂）
10. 斉藤玲子、山本幸代、後藤元秀、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、楠原浩一。当科内分泌外来での幼児肥満における肥満症とメタボリックシンドローム（MS）の頻度と特徴。日本小児科学会福岡地方会。2010年4月10日。福岡（九州大学百年記念講堂）
11. 後藤元秀、下野昌幸、山本幸代、秋山沙織、宗前玲子、石井雅宏、楠原浩一。月経てんかんが疑われた1女児例。日本小児科学会福岡地方会。2010年4月10日。福岡（九州大学百年記念講堂）
12. 河田泰定、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、山本幸代、楠原浩一、鳴海覚志、長谷川奉延。早発乳房精査を契機に発見された甲状腺ホルモン不応症の一例。第10回日本内分泌学会九州地方会。2010年8月27日。鹿児島（鹿児島大学鶴陵会館）。
13. Yamamoto Y., Kubo K., Kawagoe R., Gotoh M., So M., Araki S., Kusuhara K. Postnatal development of neuromedin U and galanin-like peptide gene expressions in the rat pituitary: an analysis by *in situ* hybridization histochemistry. Neuroscience 2009, the Society's 39th annual meeting. 2009年10月19日。Chicago, USA（Chicago Convention Center）
14. 石井雅宏、山本幸代、斉藤玲子、千手絢子、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、下野昌幸、土橋一重。長期臥床重症心身障害児における骨代謝マーカーおよび骨塩量の検討。九州小児内分泌談話会。2009年2月7日。福岡（三鷹ホール）
15. 山本幸代、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、白幡聡、鳴海覚志、長谷川奉延。新生児マススクリーニングで発見されなかった PAX-8 遺伝子異常による甲状腺機能低下症の1家系。第82回日本内分泌学会。2009年4月23日。群馬（群馬県民会館）
16. 川越倫子、山本幸代、久保和泰、宗まりこ、土橋一重、白幡聡。生後発達に伴うラット視床下部 Nesfatin-1 遺伝子発現動態の検討—発現部位特異的な生理的変動—。第82回日本内分泌学会。2009年4月23日。群馬（群馬県民会館）
17. 後藤元秀、山本幸代、石井雅宏、荒木俊介、川越倫子、酒井道夫、土橋一重、楠原浩一。極度の偏食によるヨード欠乏性甲状腺機能低下症を発症した自閉症の1例。第36回日本小児栄養消化器肝臓学会。2009年10月10日。札幌（北海道大学学術交流会館）
18. 荒木俊介、山本幸代、後藤元秀、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、楠原浩一、朝山光太郎。肥満小児における脳由来神経栄養因子（BDNF）の血中レベルとアディポサイトカインレベルとの関連性。第43回日本小児内分泌学会。2009年10月2日。宇都宮（栃木県総合文化センター）
19. 久保和泰、山本幸代、川越倫子、後藤元秀、荒木俊介、土橋一重、楠原浩一。ラット視床下部における Nesfatin-1 遺伝子発現動態の検討—生後発達過程での発現部位特異的な生理的変動—第43回日本小児内分泌学会。2009年10月2日。宇都宮（栃木県総合文化センター）
20. 石井雅宏、山本幸代、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、下野昌幸、楠原浩一。長期臥床状態の重症心身障害児(者)における骨塩量、骨代謝マーカーの検討。第43回日本小児内分泌学会。2009年10月3日。宇都宮（栃木県総合文化センター）
21. 河田泰定、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、山本幸代、土橋一重、酒井道生、白幡聡、楠原浩一、野田正紀。慢性特発性血小板減少性紫斑病を合併した21水酸化酵素欠損症の一例。第43回日本小児内分泌学会。2009年10月3日。宇都宮（栃木県総合文化センター）
22. 川越倫子、山本幸代、久保和泰、荒木俊介、宗まりこ、土橋一重、楠原浩一。ラット視床下部 Nesfatin-1 遺伝子発現動態の検討—生後発達に伴う発現部位特異的な生理的変動—。第9回内分泌学会九州地方会。2009年8月29日。北九州（産業医科大学ラマツィーニ会館）
23. 荒木俊介、森下高弘、神代万壽美、森貞直哉、野津寛大、山本幸代、楠原浩一。長期臥床状態の重症心身障害児(者)における骨塩量、骨代謝マーカーの検討。第43回日本小児内分泌学会。2009年8月29日。北九州（産業医科大学ラマツィーニ会館）
24. 河田泰定、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、山本幸代、土橋一重、楠原浩一。尿糖陽性で発見された幼児糖尿病の一例。第9回内分泌学会九州地方会。2009年8月29日。北九州（産業医科大学ラマツィーニ会館）
25. 後藤元秀、土橋一重、荒木俊介、山本幸代、神代万壽美、有馬透、楠原浩一、膝炎を繰り返した高TG血症の9歳女児例。日本小児脂質研究会。2009年12月5日。福岡（福岡ソフトリサーチパーク）
26. 後藤元秀、山本幸代、石井雅宏、荒木俊介、川越倫子、楠原浩一。長期間の偏食によるヨード欠乏の危険性：ヨード欠乏性甲状腺機能低下症をきたした自閉症の1男児例。日本小児科学会福岡地方会。2009年12月12日。福岡（九州大学百年記念講堂）

27. Yamamoto Y., Kawagoe R., So, M., Kubo K., Dobashi K., Shirahata A., Region-specific changes in the Nesfatin-1 gene expressions in rat hypothalamus during postnatal development Neuroscience 2008, the Society's 38th annual meeting 2008年11月19日 DC, USA (DC Convention Center)

28. 山本幸代、川越倫子、荒木俊介、久保和泰、土橋一重、白幡聡. ラット視床下部でのガラニン様ペプチド遺伝子の発現動態—生後発達および生後早期からの高脂肪負荷が与える影響. 第81回日本内分泌学会学術総会. 2008年5月17日. 青森 (青森市文化会館)

29. 山本幸代、川越倫子、宗まりこ、久保和泰、荒木俊介、土橋一重、白幡聡. 胎児期からの高脂肪負荷はラット視床下部での galanin-like peptide 遺伝子発現の出生後発達に伴う生理的変動に影響を与える. 第29回日本肥満学会. 2008年10月17日. 大分 (iichiko 総合文化センター)

30. 久保和泰、山本幸代、川越倫子、荒木俊介、土橋一重、白幡聡. 母乳栄養からの完全離乳後に自然軽快した高コレステロール血症の1例. 第35回日本小児栄養消化器肝臓学会. 2008年10月25日. 東京 (アキバホール)

31. 荒木俊介、山本幸代、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、白幡聡. マススクリーニングで発見されなかった PAX-8 遺伝子異常による甲状腺機能低下症の1家系. 第8回日本内分泌学会九州地方会. 2008年月8月30日. 長崎 (長崎大学良順会館)

32. 重松玲子、山本幸代、久保和泰、川越倫子、土橋一重、下野昌幸、白幡聡. 低血糖を契機に下垂体低形成による下垂体前葉機能不全が診断された 18p-症候群の1例. 第42回日本小児内分泌学会. 2008年10月3日. 米子 (米子コンベンションセンター)

33. 後藤元秀、山本幸代、重松玲子、土橋一重、下野昌幸、白幡聡. 長期間経腸栄養のみで管理されている重症心身障害児7名の甲状腺機能および血中微量元素濃度の検討: ヨード欠乏性甲状腺機能低下症、セレン欠乏の危険性. 第19回微量元素学会. 2008年月7月4日. 東京 (東京・学士会館)

[図書] (計4件)

1. 山本幸代、朝山光太郎. 診断と治療社. 小児内分泌疾患鑑別診断チャート. p134-p137. 2009.
2. 山本幸代、朝山光太郎. 診断と治療社. 小児内分泌疾患鑑別診断チャート. p138-p141. 2009.
3. 山本幸代、朝山光太郎. 診断と治療社. 小児内分泌疾患鑑別診断チャート. p130-p133. 2009.

4. 山本幸代、朝山光太郎. 永井書店. よくわかる子どもの肥満. 100-105. 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本幸代 (YAMAMOTO YUKIYO)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20279334

(2) 研究分担者

土橋一重 (DOBASHI KAZUSHIGE)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号: 60260569

(平成20年度~21年)