

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16123

研究課題名（和文）胎児期のストレスにより思春期が早発する神経内分泌メカニズムの解明

研究課題名（英文）Neuroendocrine mechanism of precocious puberty caused by fetal stress in utero

研究代表者

美辺 詩織（Minabe, Shiori）

岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・特命助教

研究者番号：40781571

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）：本研究の目的は、思春期早発症の発症機序について、「発達期の生育環境が、成長後の健康や疾患発症に影響する」とするDOHaD仮説の実験的証明をするため、胎児期ストレスによる思春期早発症の神経内分泌メカニズムを解明することである。本研究では、母ラットの食物摂取量を対照群と比較し50%に制限し、制限給餌の母親から生まれてきたメスの子ラットを胎児期栄養ストレスモデル（UN群）とし生殖機能の解析を行なった。その結果、胎児期の栄養不足は雌ラットの視床下部の胎児プログラミングを引き起こし、ライフステージにより異なったKNDy遺伝子発現の変化を引き起こし、生殖機能を変化させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

思春期早発症は第二性徴が早期に現れる疾患である。本症の問題点として、本人の心理的・社会的な問題を引き起こすことや、骨年齢の促進による最終的な低身長などがあげられるが、発症機序の詳細は不明である。本研究により、思春期早発症が視床下部の生殖中枢の胎児プログラミングが関与することが示されたことで、これまで発症機序が謎であった思春期早発症の神経内分泌メカニズムの一端を解明でき、学術的な意義は極めて高い。

研究成果の概要（英文）：This study aims to examine the neuroendocrine mechanisms of precocious puberty induced by fetal stress to experimentally prove the DOHaD hypothesis, which states that the growth environment during development influences health and disease onset in later life. In this study, female rats born to mothers whose food intake was restricted to 50% of that of the control group were used as a model of fetal nutritional stress (UN group) to analyze their reproductive function. The results showed that nutritional deficiency during the fetal period induces fetal programming in the hypothalamus of female rats and changes in KNDy gene expression at different life stages, resulting in altered reproductive function.

研究分野：生殖神経内分泌学

キーワード：思春期早発症 神経内分泌学 性成熟 胎児プログラミング 視床下部 Kisspeptin ゴナドトロピン

1. 研究開始当初の背景

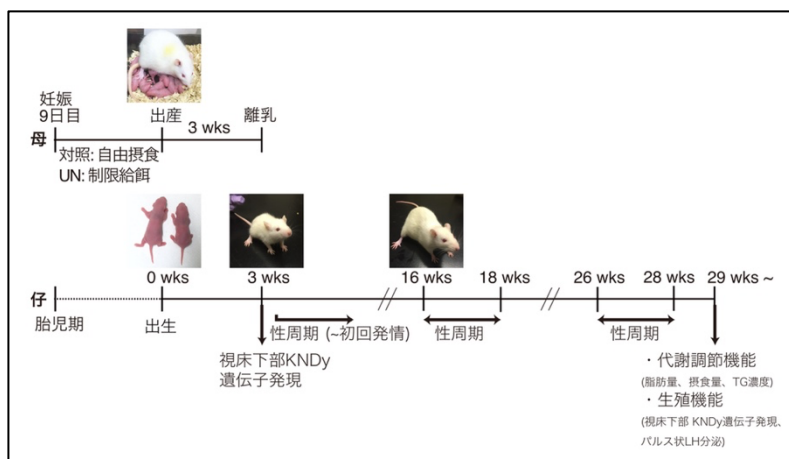
例を見ない超高齢化時代を向かえつつある中で一方、「発達期の生育環境が、成長後の健康や疾患発症に影響する」とする医学学説 (DOHaD 仮説) について検証が進んでおり、人生初期の環境は、予想を超えた長期的な影響をもたらすことが明らかとなってきた。これまでの疫学調査研究からは、胎児期の低栄養による成人での高血圧 [Ref.1-2]、2 型糖尿病の発症 [Ref.3] 等々、生活習慣病の発症起源について DOHaD 学説を支持する報告がなされてきた。これに関連した実験的研究として、申請者は環境エストロジェン (所謂、環境ホルモン) を新生仔期に投与したラットにおいて、視床下部の発達プログラミングによる不妊を認めている [Ref.4]。このような発達期における環境因子の影響に着目した研究は、次世代の健康維持のため妊娠前、妊娠中の健康管理指導の重要性を示す新たな視点と考えられる。

思春期早発症は、第二性徴 (初経、精巣・乳房や陰毛の発育、声変わりなど) が早期に現れる疾患であり、発症率は 2-3% といわれる。本症の問題点として、本人の心理的社会的な問題を引き起こすことや、骨年齢の促進による最終的な低身長などがあげられる。思春期早発症には、副腎や性腺の疾患による末梢性と、視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 早期分泌による中枢性の 2 つがある。中枢性のなかでも特に、脳腫瘍などの疾患によらない原因不明の特発性思春期早発症は女兒に多いのが特徴であるが、発症機序の詳細は不明である。発達心理学の分野ではこの発症機序について、メタ分析を通じて幼少期の心理的ストレス (父親不在) が初潮開始を早期化することが報告された [Ref.5]。また、この早熟傾向は男児ではみられないことは [Ref.5]、特発性思春期早発症の性差傾向と一致することも興味深い。このように、思春期早発症も DOHaD 学説による説明可能な疾患である可能性が高く、思春期早発症は人生初期のストレス環境によって発症素因が形成されることが強く予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、思春期早発症の発症機序について DOHaD 学説の実験的証明をするため、胎児期ストレスが将来の生殖機能に及ぼす影響と、胎児期ストレスによる思春期早発症の神経内分泌メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法 (下図)



<動物>

妊娠 5 日目の 11 週齢の Wistar-Imamichi 系統ラット 12 匹を自由摂食 (対照、n=6) 群と 50%制限給餌 (UN、n=6) 群に分けた。UN 群の制限給餌は妊娠 9 日目に開始し、出産後は全動物で自由摂食に切り替えた。生まれてきた仔ラットの産仔数、出生体重および性比を確認し、出生後 1 日目 (PND1) に産仔数を 8 匹に調整した。

<胎児期低栄養が生殖機能および代謝パラメータに及ぼす影響>

性成熟前のラットを用いて、視床下部の生殖機能中枢を担う視床下部 KNDy 遺伝子 (Kisspeptin, Neurokinin B, Dynorphin A の 3 遺伝子) 発現を調べた。UN 群及び対照群の母親から生まれてきたメスラットについて、PND21 に弓状核 (ARC) を含む視床下部組織を採

取した。視床下部組織から抽出した total RNA を用いて cDNA を合成し、qPCR を用いてキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*)、ニューロキニン B 遺伝子 (*Tac3*)、ダイノルフィン A 遺伝子 (*Pdyn*) の発現解析を行なった。さらに、UN または対照群の母親から生まれてきたメスラットの性成熟を検討するため、別の動物を用いて膣開口および初回発情について検討した。

さらに性成熟を確認後、11-13 週齢、16-18 週齢、21-23 週齢、26-28 週齢で 2 週間、毎日膣スメアを調べ、発情周期を解析した。手術前の 28-30 週齢に、一部の動物で食物摂取量をモニターした。UN または対照群の母親から生まれてきたメスラットのパルス状 LH 分泌および ARC の *KNDy* 遺伝子発現を評価するために、卵巣除去後に皮下にステロイド含有チューブを埋め込み、エストロゲン代償投与モデルを作成した。パルス状 LH 放出を検出するために頸静脈カテーテル留置手術を行い、無麻酔・無拘束下で 6 分間隔 3 時間の血液サンプリングを行なった。採血の翌日、血漿トリグリセリド (TG) 測定用の血液 (500 μ L) をペントバルビタールナトリウムによる深麻酔下で追加採血した後、脂肪組織 (後腹膜、腎周囲、卵巣周囲) の重量を測定した。その後、脳の組織学的解析のために、動物を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定した。血漿中の LH、TG 濃度はそれぞれ、ラジオイムノアッセイ、トリグリセリド E-テストワコーを用いて測定した。

<組織学的解析>

4%PFA で固定した脳は、0.05M PB 中の 20%スクロースに 4°Cで浸漬した。その後、組織学的解析のために、クライオスタットを用いて厚さ 50 μ m の連続切片を作成した。*Kiss1*、*Tac3* および *Pdyn* の mRNA 発現は、ジゴキシンゲニン DIG 標識プローブを用いた *in situ* hybridization (ISH) によって検出した。キスペプチンのタンパク質発現を検出するために、キスペプチンのモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学を実施した。

4. 研究成果

<低出生体重ラットモデルの確立>

制限給餌により妊娠 21 日目において母ラットの体重は有意に低下し、生まれてきた仔は UN 群の雌で低出生体重となった。母体の栄養条件は、妊娠期間、性比、産仔数などの他の要因には影響しなかった。

<胎児期の低栄養が生殖機能に及ぼす影響>

胎児期低栄養は雌ラットの性成熟を早める。膣開口の日齢は群間で差は認められなかったが、膣開口時の体重は UN 子孫で対照群と比較し有意に低かった。UN 子孫での初回発情は対照群と比べて早い傾向があり ($P=0.053$)、33 日齢において UN 子孫の半数は初回発情を示したが、対照群ではほとんど見られなかった (対照群 : 9% vs. UN 群 : 55%)。UN 子孫は対照群と比較して視床下部 *Tac3* 遺伝子発現が有意に増加した。UN の子孫の *Pdyn* 発現は対照群と比較し、減少傾向を示した ($P=0.07$)。 *Kiss1* mRNA レベルは群間で同程度であった。

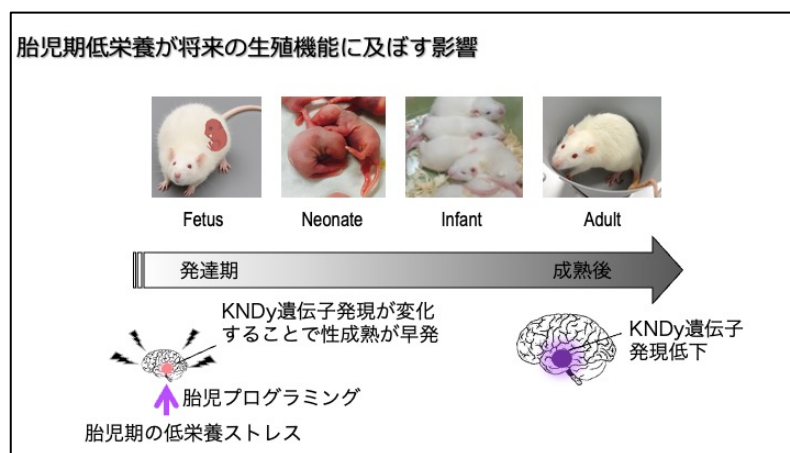
加齢に伴う発情周期の変化に対する胎児期低栄養の影響を調べるため、11-13、16-18、21-23、26-28 週齢の時に膣スメアの解析により発情周期を同定した。11 から 13 週齢にかけて、両群全てのラットが規則的な発情周期を示した。同様に、16-18 週齢と 21-23 週齢では、UN と対照群の母親から生まれてきた両群のラットが、4 日または 5 日の規則的な発情周期を示した。26-28 週齢では、UN および対照群の両子孫が、不明瞭な発情前期、発情期および発情休止期の延長といった加齢に応じた性周期の変化を示した。発情周期の長さに対して胎児期の栄養状態と週齢の 2-way ANOVA を行った結果、11-13 週齢と比べて 26-28 週齢で有意に発情周期が長くなった。胎児期の栄養状態および交互作用に有意差は得られなかった。さらに、両群とも 30-41 週齢に明瞭な LH パルスが認められ、出生前の栄養状態は成熟ラットのパルス状 LH 分泌に影響を与えなかった。一方で、その時の視床下部 *Kiss1*、*Tac3* および *Pdyn* 遺伝子発現は、対照群と比べて UN 群の子孫では有意に抑制されていた。UN 子孫の ARC キスペプチン免疫反応細胞数は、対照群と同程度であった。

<子宮内低栄養が成熟雌の代謝パラメータに与える影響>

出生前の低栄養が子孫の代謝パラメータに影響を与えるかどうかを評価するために、成熟したラットの体重、脂肪量、血中 TG、およびカロリー摂取量を評価した。UN 群の仔の体重は 4 週齢で対照群の仔に追いつき、その後は両群間で体重に有意差は見られなかった。一方で、30 週齢以降の成体において、UN 子孫は対照群と比較して、脂肪量、血漿 TG 値、摂取カロリーが有意に増加した。

<まとめ (右図) >

本研究では、出生前の低栄養により性成熟前に視床下部 *Tac3* 遺伝子 (*Tac3*) 発現が増加し、その後の初回発情が早まることが示された。一方で、UN 子孫では 30 週齢以降の ARC の *KNDy* 遺伝子発現が抑制された。これは、子宮内低栄養ストレスにより *KNDy* ニューロンの発達プログラミングが起これ、ライフステージによってその遺伝子発現が変化することが示唆された。しかし、成熟した UN 子孫は正常な LH パルスを示し、キスペプチン免疫反応細胞数も対照群の子孫と同程度であった。このように GnRH/LH パルスジェネレーターは、子宮の栄養環境の悪化に対しても正常な生殖機能を維持することが可能な強固なメカニズムだと考えられる。さらに、出生前の低栄養は低出生体重を引き起こすが、4 週齢での急速なキャッチアップ成長、内臓脂肪の蓄積、成人期のカロリー摂取量と血漿トリグリセリド値の増加などの肥満誘発効果を惹起する。これら代謝プロファイルの変化は、子宮内の栄養環境の悪化が胎児の視床下部や末梢組織の胎仔プログラミングを誘発し、胎児の代謝やホルモン環境を変化させ、メタボリックシンドロームの素因となるという *thrifty phenotype* 仮説と一致する [Ref.6]。本研究では、子宮内低栄養が視床下部の胎仔プログラミングを引き起こし、雌ラットの代謝および生殖の表現型を後世に変化させることを示した。本研究成果は、国際誌 *Endocrine Connections* で誌上公表した [Ref.7]。



引用文献リスト

1. Law CM *et al.*, *J Hypertension*. 14:935-41 (1996).
2. Kajantie E *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab*, 91:4953-6 (2006).
3. Barker DJ, *Trends Endocrinol Metab*. 13:364-8 (2002).
4. Minabe S, *et al.*, *Endocrinology*. 160:1223-33 (2019).
5. Webster GD *et al.*, *Evol Psychol*. 12:273-94 (2014).
6. Hales CN & Barker DJ. *Diabetologia* 35:595-601 (1992).
7. Minabe S, *et al.*, *Endocr Connect*. 12:e220307 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuyama Shuichi, Nakamura Sho, Minabe Shiori, Sakatani Miki, Takenouchi Naoki, Sasaki Takuya, Inoue Yuki, Iwata Hisataka, Kimura Koji	4. 巻 90
2. 論文標題 Deterioration of mitochondrial biogenesis and degradation in the endometrium is a cause of subfertility in cows	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 141 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23670	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 Minabe Shiori, Iwata Kinuyo, Watanabe Youki, Ishii Hirotaka, Ozawa Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Long-term effects of prenatal undernutrition on female rat hypothalamic KNDy neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrine Connections	6. 最初と最後の頁 e220307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/EC-22-0307	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 -
1. 著者名 Komaki Shohei, Ohmomo Hideki, Hachiya Tsuyoshi, Sutoh Yoichi, Ono Kanako, Furukawa Ryohei, Umekage So, Otsuka-Yamasaki Yayoi, Minabe Shiori, Takashima Akira, Tanno Kozo, Sasaki Makoto, Shimizu Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Evaluation of short-term epigenetic age fluctuation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-022-01293-9	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 -
1. 著者名 Chen Jing, Minabe Shiori, Munetomo Arisa, Magata Fumie, Sato Marimo, Nakamura Sho, Hirabayashi Masumi, Ishihara Yasuhiro, Yamazaki Takeshi, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko, Matsuda Fuko	4. 巻 69
2. 論文標題 Kiss1-dependent and independent release of luteinizing hormone and testosterone in perinatal male rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 797 ~ 807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ21-0620	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 該当する

1. 著者名 Sato Marimo, Minabe Shiori, Sakono Takahiro, Magata Fumie, Nakamura Sho, Watanabe Youki, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko, Matsuda Fuko	4. 巻 162
2. 論文標題 Morphological Analysis of the Hindbrain Glucose Sensor-Hypothalamic Neural Pathway Activated by Hindbrain Glucoprivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqab125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqab125	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 Wang Tse-En, Minabe Shiori, Matsuda Fuko, Li Sheng-Hsiang, Tsukamura Hiroko, Maeda Kei-Ichiro, Smith Lee, O' Hara Laura, Gadella Bart M, Tsai Pei-Shiue	4. 巻 161
2. 論文標題 Testosterone regulation on quiescin sulphydryl oxidase 2 synthesis in the epididymis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 593 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-20-0629	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 該当する

1. 著者名 Tatebayashi Ryoki, Nakamura Sho, Minabe Shiori, Furusawa Tadashi, Abe Ryoya, Kajisa Miki, Morita Yasuhiro, Ohkura Satoshi, Kimura Koji, Matsuyama Shuichi	4. 巻 104
2. 論文標題 Gene-expression profile and postpartum transition of bovine endometrial side population cells†	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 850 ~ 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaab004	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 Minabe Shiori, Iwata Kinuyo, Tsuchida Hitomi, Tsukamura Hiroko, Ozawa Hitoshi	4. 巻 142
2. 論文標題 Effect of diet-induced obesity on kisspeptin-neurokinin B-dynorphin A neurons in the arcuate nucleus and luteinizing hormone secretion in sex hormone-primed male and female rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170546 ~ 170546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2021.170546	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 -

1. 著者名 Wang Tse-En, Minabe Shiori, Matsuda Fuko, Li Sheng-Hsiang, Tsukamura Hiroko, Maeda Kei-Ichiro, Smith Lee, O' Hara Laura, Gadella Bart M, Tsai Pei-Shiue	4. 巻 161
2. 論文標題 Testosterone regulation on quiescin sulfhydryl oxidase 2 synthesis in the epididymis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 593 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-20-0629	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 該当する

1. 著者名 Tatebayashi Ryoki, Nakamura Sho, Minabe Shiori, Furusawa Tadashi, Abe Ryoya, Kajisa Miki, Morita Yasuhiro, Ohkura Satoshi, Kimura Koji, Matsuyama Shuichi	4. 巻 104
2. 論文標題 Gene-expression profile and postpartum transition of bovine endometrial side population cells†	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 850 ~ 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaob004	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 MINABE Shiori, NAKAMURA Sho, FUKUSHIMA Eri, SATO Marimo, IKEGAMI Kana, GOTO Teppei, SANBO Makoto, HIRABAYASHI Masumi, TOMIKAWA Junko, IMAMURA Takuya, INOUE Naoko, UENOYAMA Yoshihisa, TSUKAMURA Hiroko, MAEDA Kei-Ichiro, MATSUDA Fuko	4. 巻 66
2. 論文標題 Inducible <i>Kiss1</i> knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 369 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-164	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5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 美辺詩織、岩田衣世、渡辺雄貴、石井寛高、井上直子、上野山賀久、束村博子、小澤一史
2. 発表標題 発達期環境ストレスによる生殖機能不全をもたらす神経内分泌メカニズム
3. 学会等名 日本内分泌学会第 40 回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美辺詩織、井上直子、上野山賀久、小澤一史、束村博子
2. 発表標題 発達期エストロゲン曝露による生殖機能不全をもたらす神経内分泌メカニズム
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美辺詩織、井上直子、上野山賀久、小澤一史、束村博子
2. 発表標題 発達期環境ストレスと神経内分泌メカニズム
3. 学会等名 第22回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minabe, S., Iwata, K. and Ozawa, H.
2. 発表標題 Effects of Diet-Induced Obesity on Hypothalamic Kisspeptin-Neurokinin B-Dynorphin (KNDy) Neurons and Luteinizing Hormone Secretion in Sex Hormone-Primed Male and Female Rats
3. 学会等名 ENDO2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 美辺詩織、井上直子、上野山賀久、小澤一史、束村博子
2. 発表標題 Neonatal exposure to estrogen causes irreversible infertility via specific suppressive action on hypothalamic Kiss1 neurons in male and female rodents
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（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者：81名、技術情報協会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬/診断技術への応用	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------