

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592094

研究課題名（和文）胎児期の発育障害に起因するメタボリック症候群の発症機序解明とその予防戦略の開発

研究課題名（英文）Investigation for mechanisms of the metabolic syndrome due to intrauterine undernutrition and its prevention

研究代表者

由良 茂夫（Yura Shigeo）

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60335289

研究成果の概要（和文）：胎生期の発育障害は成長後にメタボリック症候群のハイリスク群となる。本研究では、抗酸化作用を有するチオレドキシンの結合蛋白（TBP-2）が正常な妊娠の進行や胎盤内の酸素条件に応じて変動し、胎児発育障害の病態に関与することを示した。また、母体の急性栄養障害に際して、TBP-2 が血糖値の維持に重要な役割を演じること、さらに妊娠中の分岐鎖アミノ酸補充が母体低栄養による児の成長後の血圧上昇を改善する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Undernutrition in utero is closely associated with metabolic syndrome in adulthood. In the present study, we revealed that the expression of thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) in human placenta is regulated during the progression of pregnancy and dependent on oxygen condition, and is associated with physiological and pathological conditions. We also demonstrated that TBP-2 is a critical molecule that mediates glucose homeostasis during maternal undernutrition and that elevated systolic blood pressure of offspring was ameliorated by maternal ingestion of branched-chain amino acid supplemented diet during food restriction.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| | | | |
| 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：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：産科学、妊娠、胎児発育障害、酸化ストレス、チオレドキシンの結合蛋白、分岐鎖アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 低出生体重児におけるメタボリック症候群の発症リスク

低出生体重児は、出生後にも成長障害を呈することが多く、また成長後に耐糖能障害や血圧上昇を認める頻度が高いため、メタボリッ

ク症候群のハイリスクとなる。その結果虚血性心疾患罹患率が高いことが知られている。

本邦では、低出生体重児の割合が急速に増加している。そのため、胎生期の栄養調節機序を解明し、臓器障害や代謝異常を改善する

ための治療的方策を早急に確立することが望まれる。

(2)胎児発育障害と酸化ストレス関連因子
子宮内胎児発育遅延では胎盤の低形成、血流障害が高頻度に見られ、酸化ストレスが増強している。抗酸化作用を有するチオレドキシンは胎盤に高濃度に存在し、酸化ストレスの増強と共にその発現は増加する。近年、チオレドキシシンと結合能を有する Thioredoxin binding protein (TBP-2)が同定され、酸化ストレスに対する組織の応答に関与することが明らかとなってきた。また TBP-2 は、摂食制限時の血糖値維持や脂肪酸の分解など糖・脂質の利用においても必須の転写調節因子である。

(3)蛋白質、分岐鎖アミノ酸(BCAA)と胎児発育

母体の蛋白質摂取不足により胎児は発育が制限されるのみならず、将来のメタボリック症候群や行動異常など重大な問題が高率に引き起こされることが知られている。一方で、蛋白質あるいは BCAA のような特定のアミノ酸が酸化ストレスを低下させる作用を有する可能性が示唆されるようになってきている。

2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえ、本研究では、まず胎生期の発育障害とこれに起因する成長後のメタボリック症候群発症に酸化ストレスやチオレドキシシン・TBP-2 の発現変化が関与することを明らかにし、さらに妊娠中のたんぱく質、アミノ酸摂取の補充が子宮内発育の改善やメタボリック症候群の発症予防に寄与できる可能性を示すことを目的として、次のような検討を行った。

(1)正常妊婦および子宮内胎児発育遅延を呈する妊婦から胎盤を採取し、チオレドキシシン・TBP-2 発現を検討した。また、(2)妊娠動物モデルや TBP-2 の遺伝子改変動物の栄養制

限実験を行って TBP-2 が胎児発育や妊娠中の代謝変化にどのように関与するかを検討した。さらに、(3)BCAA が胎生期の発育や成長後の血圧変化に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1)①ヒト妊娠中の胎児発育調節におけるチオレドキシシン・TBP-2 の役割の検討

京都大学医学部附属病院およびその関連施設において倫理委員会の承認を得たのち、正常妊婦および子宮内胎児発育遅延 (IUGR)、妊娠高血圧症候群 (PIH) を合併する妊婦から胎盤を採取し、チオレドキシシン、TBP-2 の遺伝子発現を real time PCR にて検討した。また組織内局在を免疫染色にて検討した。

②ヒト胎盤の TBP-2 発現に及ぼす低酸素の影響の検討

正常妊婦から採取した胎盤を用いて絨毛組織の組織培養を行った。酸素濃度 1% の低酸素環境とし、TBP-2 遺伝子発現量の変化を検討した。

(2)①母体の摂食状態による、胎児血糖調節機構に対する TBP-2 の役割の検討

以下の動物実験は施設内動物実験委員会の承認を得て行った。妊娠マウスを妊娠末期に急性栄養障害 (母体 3 時間、12 時間、24 時間絶食) とし母獣の肝臓、血液を採取すると共に、胎仔、胎盤を採取した。母獣及び胎仔の血糖値を測定し、また各臓器におけるチオレドキシシン、TBP-2 の遺伝子発現を real time PCR にて検討した。また組織内局在を in situ hybridization にて検討した。

②TBP-2 遺伝子のノックアウトマウスを用いた母獣急性栄養障害の解析

まずヘテロ欠損メスマウスをヘテロ欠損オスマウスと交配した。妊娠母獣は妊娠 16.5 日目より 24 時間の自由摂餌あるいは絶食を行い、終了後の妊娠 17.5 日目にサンプリングした。母獣・胎仔の血糖値、血漿インスリ

ン値を測定し、胎仔の測定値を野生型 (+/+) とホモ欠損型 (-/-) とで比較 (paired t-test による検定) した。また胎盤における糖輸送蛋白 GLUT 発現は Western blots 法により検討した。

(3) ①母体が低栄養となった際に BCAA 摂取が胎児発育に及ぼす影響の検討

カゼインを主な蛋白成分とし、蛋白質を 20% 含有する普通餌と、蛋白質含有量は同じで BCAA 含量を増加させた BCAA 添加餌を調整した。重量あたりの総カロリーは同じとした。妊娠マウスを三群に分け、普通餌を用いた自由摂餌群 (A 群)、普通餌を用いた摂餌制限群 (B 群: 妊娠 10.5 日から 18.5 日まで A 群の 70% に給餌制限)、BCAA 添加餌を用いた摂餌制限群 (C 群: 妊娠 10.5 日から 18.5 日まで A 群の 70% に給餌制限) を作成した。妊娠 18.5 日に胎仔重量、胎盤重量を測定した。

②BCAA 摂取量が胎仔成長後の血圧変化に及ぼす影響の検討

妊娠ラットを普通餌で自由摂餌 (D 群)、妊娠 7 日目より BCAA 添加餌を自由摂餌 (E 群)、妊娠 7 日目より普通餌を用いて D 群の 30% に摂餌制限 (F 群) 及び BCAA 添加餌を用いて F 群と同カロリーに摂餌制限 (G 群) の 4 群に分類し、a) 胎仔の生後 16 週齢時に収縮期血圧を測定、b) 胎生 21 日目と生後 30 週齢時に腎臓を摘出し 1 切片あたりの糸球体数をカウントし、さらに c) アンギオテンシン受容体 (ATR) の mRNA の発現について real time PCR にて検討した。

4. 研究成果

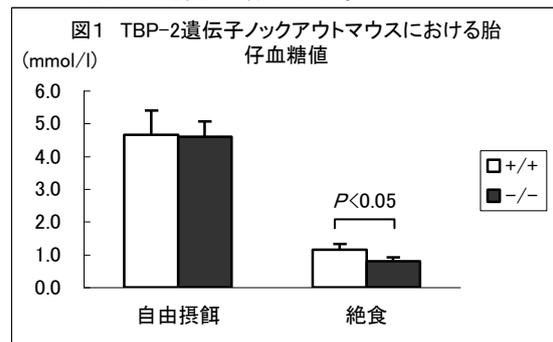
(1) ①チオレドキシンはヒト妊娠初期絨毛で強い発現を認めた。TBP-2 は妊娠後期の胎盤において、合胞性絨毛細胞、細胞性絨毛細胞、および血管内皮細胞での発現が認められた。妊娠初期絨毛では妊娠中期・後期に比べて TBP-2 遺伝子発現が有意に低値を示した。

PIH+IUGR の胎盤では、正常および IUGR のみの胎盤に比べて、TBP-2 遺伝子発現が有意に低下していた。

②胎盤組織の低酸素培養 (1% O₂) により TBP-2 遺伝子発現は有意に低下した。

これらは TBP-2 が正常な妊娠の進行や胎盤内の酸素条件に応じて変動し、また PIH や IUGR の病態形成に関与している可能性を示している。

(2) ①母獣の絶食時に、母獣および胎仔の血糖値は自由摂餌に比べて、有意に低値を示した。母獣の 3 および 12 時間の絶食で胎仔重量は自由摂餌と比べて差を認めなかったが、24 時間の絶食により自由摂餌に比べて有意に低下した。母獣肝臓では 3, 12 および 24 時間の絶食において、自由摂餌に比べて有意な TBP-2 遺伝子発現の増加を認めた。胎盤では、in situ hybridization 法にて TBP-2 mRNA が発現することを確認した。TBP-2 遺伝子発現は 3 および 12 時間の絶食では自由摂餌と差を認めなかったが、24 時間の絶食により有意な発現の増加を認めた。さらに胎仔肝臓でも 3 時間の絶食で自由摂餌に比べ有意に TBP-2 遺伝子発現が増加した。



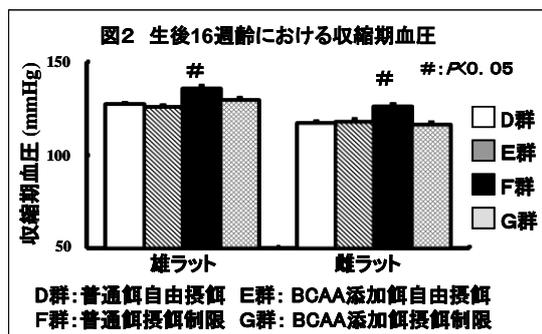
②母獣血糖・血漿インスリン値は自由摂餌群に比べて絶食群で低下を認めた。胎仔血糖値は、母獣の自由摂餌時には野生型とホモ欠損型とで差を認めなかった (図 1)。しかし母獣の絶食時に、ホモ欠損型の胎仔血糖値は野生型に比べて有意に低値を示した (図 1)。胎仔血漿インスリン値は、母獣の自由摂餌時

には、野生型とホモ欠損型とで差を認めなかった。しかし母獣の絶食時に、ホモ欠損型の胎仔血漿インスリン値は野生型に比べて有意に高値を示した。胎盤における GLUT 発現には有意な差を認めなかった。

これにより、母体絶食時に胎仔の TBP-2 遺伝子はインスリン分泌を抑制し、胎仔血糖値を維持する役割が示唆された。

(3)①普通餌自由摂餌群 (A 群) および普通餌摂餌制限群 (B 群)、BCAA 添加餌摂餌制限群 (C 群) の三群間で、妊娠母獣あたりの胎仔数には差を認めなかった。妊娠 18.5 日における胎仔重量は A 群と比較して B 群で低値を示したが、C 群では有意に回復が見られた。

②a) 16 週齢オスで F 群 (普通餌摂餌制限群) の収縮期血圧は他の 3 群と比較して有意に上昇したが、D 群、E 群、G 群の間では有意差を認めなかった (図 2)。メスでも同様の結果であった (図 2)。



b) 胎仔期のオスの右腎糸球体数は F 群、G 群では D 群、E 群に対して有意に減少しており、F 群と G 群の間には差を認めなかった。30 週齢でも同様の結果であり、メスでも胎仔期、30 週齢とも同様の結果であった。

c) 38 週齢オスの腎臓にて ATR タイプ 1 の mRNA 発現は 4 群間で差を認めなかったが、タイプ 2 の発現は G 群 (BCAA 添加餌摂餌制限群) で他の 3 群に比べ有意に高値であった。

以上より、妊娠中の BCAA 補充が母体低栄養時の胎仔の発育改善に寄与する可能性ならびに胎仔成長後の血圧上昇の改善に寄与

できる可能性を示した。

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 8 件)

①由良茂夫、インスリン抵抗性と胎児発育、産科と婦人科 査読無 79: 67-71, 2012

②由良茂夫、胎児期の栄養と生活習慣病、産婦人科治療 査読無 102: 22-26, 2011

③Itoh H, Yura S, Sagawa N, 他 2 名 (1, 2, 3 番目), Neonatal exposure to leptin reduces glucose tolerance in adult mice, Acta Physiol (Oxf). 査読有, 202:159-64, 2011 doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02268.x.

④Fujii T, Yura S, Tatsumi K, Sagawa N, 他 8 名 (1, 2, 3, 10 番目), Branched-chain amino acid supplemented diet during maternal food restriction prevents developmental hypertension in adult rat offspring. Journal of Developmental Origins of Health and Disease, 査読有, 2:176-183, 2011 Doi: 10.1017/S204017441100002X

⑤Mogami H, Yura S, Tatsumi K, 他 8 名 (1, 2, 3 番目), Thioredoxin binding protein-2 inhibits excessive fetal hypoglycemia during maternal starvation by suppressing insulin secretion in mice. Pediatric Research, 査読有, 67:138-43, 2010 Doi: 10.1203/PDR.0b013e3181c2f4cc

⑥由良茂夫、妊婦健康診査 パーフェクトマニュアル 妊娠全期間(産後も含む)を通して栄養指導・体重のコントロール、ペリネイタルケア、査読無、2010 新春増刊: 285-290、2010

⑦Kawamura M, Yura S, Sagawa N, 他 10 名 (1, 3, 11 番目), Isocaloric high-protein diet ameliorates systolic blood pressure increase and cardiac remodeling caused by maternal caloric restriction in adult

mouse offspring, Endocrine Journal, 査読有, 56:679-689, 2009

Doi: 10.1507/endocrj.K08E-286

- ⑧Mogami H, Yura S, Sagawa N, 他 8 名 (1, 2, 9 番目), Isocaloric high-protein diet as well as branched-chain amino acids supplemented diet partially alleviates adverse consequences of maternal undernutrition on fetal growth, Growth Hormone & IGF Research, 査読有, 19:478-85, 2009

Doi: 10.1016/j.ghir.2009.03.002,

〔学会発表〕(計 7 件)

- ①藤井剛、他、妊娠中摂餌制限を行ったラット母獣への分岐鎖アミノ酸投与が胎仔腎臓に与える影響、第 20 回 腎と妊娠研究会、2010 年 3 月 16 日、岡山
- ②藤井剛、他、妊娠中摂餌制限を行ったラット母獣への分岐鎖アミノ酸投与が胎仔循環系に与える影響、第 17 回 日本胎盤学会 学術集会、2009 年 10 月 16 日-17 日、東京
- ③最上晴太、他、マウス母獣絶食時におけるチオレドキシシン結合蛋白(TBP-2)の胎仔血糖調節機構に対する検討、第 33 回 日本産婦人科栄養・代謝研究会、2009 年 7 月 31 日-8 月 1 日、金沢
- ④藤井剛、他、胎生期低栄養ラットモデルにて母獣の分岐鎖アミノ酸摂取が胎仔の循環系に与える影響、第 45 回 日本周産期・新生児医学会 学術集会、2009 年 7 月 12 日-14 日、名古屋
- ⑤藤井剛、他、胎生期低栄養ラットモデルにて母獣の分岐鎖アミノ酸摂取が胎仔の循環系に与える影響、第 2 回 伊勢志摩 DOHaD カンファレンス、2009 年 7 月 4 日、津
- ⑥藤井剛、他、ラット母獣摂餌制限モデルにおいて分岐鎖アミノ酸摂取が胎仔の循環系に

与える影響、第 82 回 日本内分泌学会学術総会、2009 年 4 月 23 日-25 日、前橋

- ⑦藤井剛、他、ラット母獣の分岐鎖アミノ酸摂取量が胎生期低栄養の胎仔の循環系に及ぼす影響、第 61 回日本産科婦人科学会 学術講演会、2009 年 4 月 3 日-5 日、京都

〔図書〕(計 1 件)

- ①由良茂夫、メディカ出版、【イラストで学ぶ妊娠・分娩・産褥の生理 改訂第 2 版】2012 金山尚裕(編)、第 3 章 胎児の発育、Page114-140

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由良 茂夫 (Yura Shigeo)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：60335289

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐川 典正 (Sagawa Norimasa)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00162321

巽 啓司 (Tatsumi Keiji)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：10324633

福原 健 (Fukuhara Ken)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：00362533