

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号	32666
研究種目	挑戦的萌芽研究
研究期間	2011～2012
課題番号	23659480
研究課題名（和文）	SGA 性低身長機序における GH-IGF-1 軸へのエピジェネティック変異関与の解明
研究課題名（英文）	The analysis of epigenetic changes in GH-IGF-1 axis of small for gestational age rats
研究代表者	
	芝崎 保 (SHIBASAKI TAMOTSU)
	日本医科大学・大学院医学研究科・教授
	研究者番号：00147399

研究成果の概要（和文）：出生時の身長や体重が在胎期間に比して小さい SGA 児の追いつき成長を規定する内分泌学的因子の詳細は不明である。我々は短体長低体重ラット (SGA-NCG) で肝臓での成長ホルモン受容体 (GHR) 発現量が対照ラットに比べ低下している機序に GHR に結合する miR-322 の発現亢進が関与する可能性を示し、その機序に miR-322 の 5' 非翻訳領域の DNA のメチル化の低下が関与する可能性を示した。さらに、雌雄の SGA-NCG ラットを交配実験より、これらの遺伝子の発現量の変化は次世代まで遺伝することが示された。

研究成果の概要（英文）：The hormonal factors involved in catch-up growth in the small for gestational age (SGA) are unknown. To reveal the mechanism underlying growth failure in SGA, we analyzed growth hormone (GH)/ insulin-like growth factor (IGF)-1 axis in a rat model. In SGA and non-catch up growth (SGA-NCG) rats, hepatic growth hormone receptor (GHR) expression was reduced. We revealed that the reduction of GHR expression is caused by elevation of miR-322 expression in the liver of SGA-NCG rats. We further found that DNA methylation in the miR-322 coding region is reduced in the liver of SGA-NCG rats and that these changes in the expression of GHR and miR-322 are trans-generational.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：低出生体重、母胎低栄養、成長ホルモン受容体、マイクロ RNA、DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

出生時の身長や体重が在胎期間に比して小さい small for gestational age (SGA)

児は軽度の心身発達異常や糖・脂質代謝異常、心疾患などが出現するリスクが高い。SGA 児の約 90%は思春期までにその身長や体重が健

常児のレベルに達する追いつき成長を示すが、約 10%は追いつき成長を示さず最終身長も小さい。しかし、この追いつき成長を規定する内分泌学的因子は不明のままである。

骨の長軸方向の成長には、主として脳下垂体前葉から分泌された成長ホルモン（GH）が肝臓に存在する成長ホルモン受容体（GHR）を介しインスリン様成長因子（IGF-1）を分泌することにより、骨端軟骨の細胞分裂・増殖を促す。血中で IGF-1 はインスリン様成長因子結合蛋白 3 型（IGF-BP3）と酸不安定性サブユニット（IGF-ALS）に結合し、安定化した状態で標的臓器まで運ばれ、IGF 受容体を介して情報を伝達する。

我々は、予備実験によりカロリー制限した母ラットから出生し、3 週齢時の体長および体重がそれぞれ正常ラットの平均体長-2SD および平均体重-2SD 以下を呈する短体長低体重ラット（SGA-NCG, SGA and non-catch up growth）では、血中 GH 値は、追いつき成長を示した SGA-CG 群および SGA-NCG 群共に対照群との間に差はみられないにも関わらず、血中 IGF-1 値は SGA-NCG 群では対照群や SGA-CG 群に比べ有意に低下していることを明らかにしている。また、SGA-NCG 群の肝における GHR、IGF-1、IGFB-P3、IGF-ALS の mRNA 発現量は、それぞれ対照群や SGA-CG 群に比べ有意に低下していることを明らかにし、これらの異常の原因が GHR の発現低下によると考えた。

2. 研究の目的

SGA-NCG ラットでの GHR 発現低下の機序は不明であったが、その機序の一つとして我々は遺伝子の翻訳の阻止あるいは転写のサイレンシングを引き起こすマイクロ RNA（miRNA）が関与するのではないかと考えた。そこで、ラットを用い、SGA-NCG ラットの肝

でどの miRNA 発現の亢進が見られるか、その miRNA が GHR の発現あるいは翻訳調節に直接関与するか、さらに、miRNA の発現亢進の機序への DNA のメチル化の変化の関与の有無と次世代への影響を明らかにすること、そして miRNA を内包することから疾患の診断への応用の可能性が示されているエクソソーム内に SGA-NCG ラットの短体長に関与する miRNA が内包されているか、追いつき成長を示していない SGA-NCG ラット仔の血中エクソソーム内の miRNA が対照ラット仔や追いつき成長を示した仔よりも増加しているかを明らかにし、追いつき成長を示さない SGA 児の診断法確立への可能性を探ること等を目的に以下の実験を行った。

3. 研究の方法

(1) ウィスター系ラットを用いて、日本医科大学動物実験規約に基づき、委員会による承認を受けた後に本研究を行った。摂餌制限群は交配確認当日から妊娠全期にわたり対照群の体重あたりの摂餌量を 60%にし、連日体重の測定を行った。出産後の母ラットはいずれの群も自由摂餌、自由飲水とした。対照および摂餌制限ラットからの出生仔はいずれも 21 日齢で離乳し、さらに 1 週間自由摂餌下で飼育し、体長および体重を測定した。4 週齢までに対照ラットの体長および体重の平均-2 SD 以内まで追いつき成長しない群（SGA-NCG, small for gestational age and non-catch up growth）、追いつき成長した群（CG, catch up growth）に分け、無麻酔下で断頭採血し、肝臓を摘出した。次世代への影響では、雌雄の SGA-NCG ラットを交配し、妊娠期間および授乳期を自由摂餌下で飼育した母ラットからの出生仔を解析に用いた。初代培養肝細胞は Ronza 社から購入したコラゲナーゼ還流初代培養肝細胞を使用した。

(2) 血中 IGF-1 値は R&D 社製の rodent IGF-1 ELISA キットを用い、添付プロトコールに従い測定した。

(3) エクソソーム内の miRNA の解析は、遠心分離した血清 250 μ l あるいは下垂体培養上清 1 ml に SBI 社製 ExoQuick 試薬を添加し、プロトコールに従いエクソソームを抽出した。

(4) 各ラットから摘出した下垂体および抽出したエクソソームからニッポンジーン社製 ISOGEN II を用い、全 RNA を抽出した。抽出した RNA 中の mRNA の逆転写反応にはタカラバイオ社製 PrimeScript RT キットを用い、miRNA の逆転写反応にはクロンテック社製 miR-X miRNA first strand synthesis and SYBR qRT-PCR キットを用いた。合成された cDNA は Takara perfectPCR システムにより SYBR Premix ExTaq を用いた。mRNA 発現量は内部標準とした GAPDH mRNA 発現量で、miRNA 発現量は U6 snRNA 発現量で補正し、いずれも 2nd derivative 法で定量した。

(5) DNA のメチル化の解析は Epigen DX に委託した。

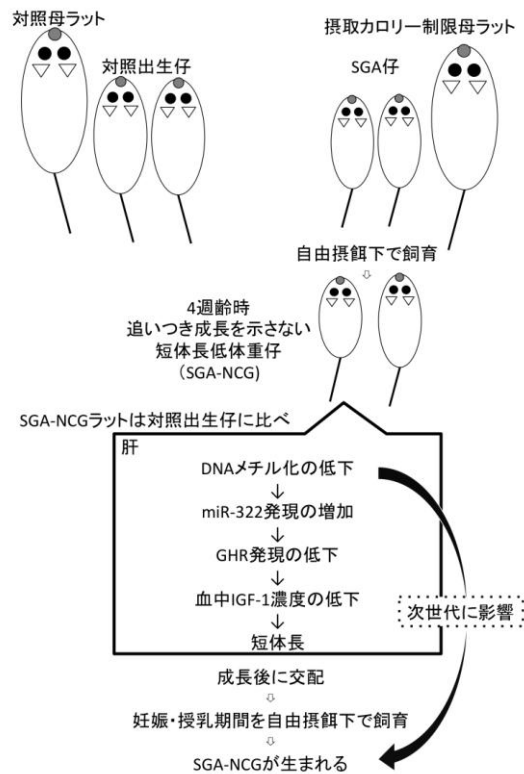
4. 研究成果

(1. SGA-NCG ラットで血中 IGF-1 および肝臓での成長ホルモン受容体 (GHR)、IGF-1、IGF-BP3 の mRNA 発現量が対照ラットに比べ低下している機序に GHR 遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合する配列を有する miR-322 の発現亢進が関与する可能性があることを明らかにした。初代培養肝細胞への miR-322 の過剰発現は GHR 発現を抑制したこと、ルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に GHR 遺伝子の 3' UTR を挿入したプラスミドとの共発現ではルシフェラーゼ活性の低下が見られたこと、miR-322 のノックダウンで GHR の発現が増加したことから、miR-322 が GHR の発現と翻訳を抑制的

に調節することが示された。肝での miR-322 の発現量は体長や GHR mRNA 発現量と有意な負の相関を示すことも示された。

(2) miR-322 は初代培養肝細胞培養上清中のエクソソームから検出できた。また、SGA-NCG ラットの血清由来エクソソーム内の miR-322 は対照ラットのそれよりも多かった。

(3) SGA-NCG ラットの肝での miR-322 の発現量が亢進する機序として、miR-322 の 5' 非翻訳領域の DNA のメチル化の低下が関与する可能性が示された。さらに、雌雄の SGA-NCG ラットを交配し、妊娠中に自由摂餌下で飼育しても追いつき成長を示さない短体長低体重ラット仔が生じること、これらの仔も肝での miR-322 の発現量の亢進と GHR の発現量の低下、血中 IGF-1 濃度の低下が見られることを明らかにした。以上より、妊娠中の低栄養摂取は仔の肝での DNA のメチル化を変化させ、miR-322 の発現の亢進が生じ、その結果、GHR の発現の低下による IGF-1 の分泌量低下が生じ短体長を呈する可能性と、これらの遺伝子の発現量の変化は次世代まで遺伝することが示された。



(2) 研究分担者

根本 崇宏 (NEMOTO TAKAHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40366654

大畠 久幸 (OHATA HISAYUKI)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：80256924

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 根本 崇宏、芝崎 保 低出生体重ラット仔でみられる内分泌学的異常. 第 86 回 日本内分泌学会学術集会 2013 年 4 月
- ② 根本 崇宏、芝崎 保 離乳時までに追いつき成長を示さなかった妊娠中のカロリー制限母ラットからの出生仔における成長ホルモン受容体発現低下の機序. 第 85 回 日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝崎 保 (SHIBASAKI TAMOTSU)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00147399