様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 １７ 日現在

機関番号：３２６６６

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：２３７９１２３８

研究課題名（和文）出生時低体重児にみられるストレスに対する脆弱性への非翻訳ＲＮＡ発現異常の関与

研究課題名（英文）Pituitary miR-449a modulates CRF type 1 receptor expression and thereby mediates hypothalamic-pituitary-adrenal axis abnormality in offspring from malnourished rat dams

研究代表者

根本　崇宏（Nemoto, Takahiro）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：４０３６６６５４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,200,000円、（間接経費）　960,000円

研究成果の概要（和文）：出生時低体重は、成長後の代謝性疾患のみならず学習障害などの精神疾患の発症リスクも上昇させる。近年の研究では妊娠中の栄養摂取不足は児の視床下部ー下垂体ー副腎軸の調節機構を障害するとの報告もあり、ストレスに対し脆弱性を示すと報告されている。我々はラットを用いた妊娠中の低摂取カロリー摂取により、短体長低体重ラット仔が生じること、これらの仔ラットへの拘束ストレスの負荷で血中コルチコステロン濃度が高値持続すること、下垂体でCRH受容体の下方制御が生じないこと、その機序にmicroRNAの発現調節の異常が関与する事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Low birth weight is related to increase incidence of psychopathologies later in life. Recent studies suggest that maternal malnutrition affects fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis although the mechanism is unknown. We demonstrated that low birth weight offspring (LBW) delivered from malnourished dams showed prolonged HPA axis activation compared with that of control offspring (NBW) and impaired downregulation of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor type 1 (CRHR1) in the anterior pituitary (AP) in immobilization. Immobilization increased expression of AP miR-449a, which has a sequences predicted to bind to the CRHR1 3'UTR in NBW, but not in LBW. Overexpression of miR-449a decreased CRHR1 expression and CRHR1 3'UTR activity in vitro. These results indicated that impairment of miR-449a expression causes the dysregulation of AP CRHR1 expression, resulting in prolonged HPA axis activation in stress in LBW.

研究分野：新生児医学

科研費の分科・細目：胎児医学

キーワード：低栄養　ストレス　下垂体　microRNA　HPA軸

１．研究開始当初の背景

低出生体重児の出産要因には妊婦の喫煙や飲酒が挙げられているが、摂取カロリー制限や偏食も低出生体重児のリスクファクターであると考えられている。近年、難産や妊娠中毒症の危険性を抑えるために妊娠時の体重増加を抑えるようにとの指導や体型を気にすることで体重増加を抑えた妊婦が増加している。胎児の発育や各器官の機能分化のための栄養素は全て母体の食事に依存しており、適切な時期に適切な栄養素が供給されないと子宮内発育遅延 (IUGR) により低出生体重児を生じることが明らかになっている。IUGR による低出生体重児では成人期の虚血性心疾患による死亡率が高いことやメタボリックシンドロームのリスクが高いことだけでなく、統合失調症などの精神発育異常あるいは鬱が出現するリスクも高い (Early Hum Dev. 70: 3-14, 2002)。ストレスは視床下部−下垂体−副腎 (HPA) 軸を活性化する。ストレス反応において HPA 軸は視床下部のコルチコトロピン放出因子 (CRF) 分泌の増加−下垂体の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌の増加−副腎皮質のグルココルチコイドの放出だけでなく、フィードバックによる調節が重要な役割を果たしている。ストレスによる鬱の発症では、フィードバック調節の異常により HPA 軸が過剰に亢進した状態が原因の一つと考えられている。

２．研究の目的

申請者はこれまで下記に示す研究成果から母体のカロリー摂取不足で胎児に栄養が十分に供給されないと、発生・分化途中の胎児組織でエピジェネティックな変異による種々のストレス関連遺伝子発現の異常で、フィードバック調節の破綻をもたらし、HPA 軸の過剰な亢進で鬱が生じるのではないかとの仮説を立てた。この仮説を証明するためにラットを用いて母体カロリー摂取制限により出生した仔での HPA 軸の亢進の延長の機序を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

IUGR による低出生体重仔ラットでみられた拘束ストレスに対する HPA 軸の反応性が延長する機序を明らかにするために、miR-499a による CRF-R1 発現調節機構、グルココルチコイドによる GR と miR-499a 発現調節への Gas5 の関与、IUGR ラットにおける Gas 5 発現異常へのエピジェネティックな変異の関与の有無を解明する。

CRF-R1 や GR の発現調節における miR-499a や Gas 5 の役割を明らかにする。また、血中の miRNA や ncRNA の検出系を確立し、末梢血を用いた早期診断法確立の可能性を探る。さらに、IUGR ラットの下垂体でのヒストンタンパク質の修飾の変化の解析と DNA メチル化の解析によりエピジェネティックな変異による Gas 5 の発現が亢進する機序を明らかにする。

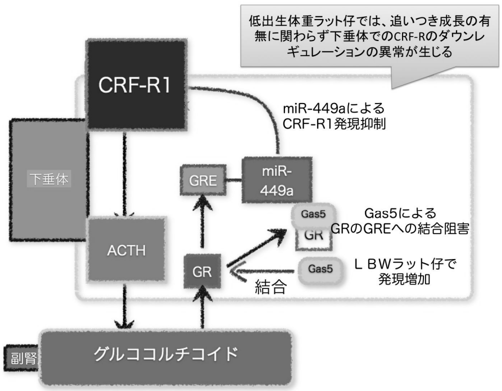
４．研究成果

妊娠中に摂取カロリーを制限した母ラットからの出生仔へのストレス負荷では血中コルチコステロン濃度の高値維持がみられ、その機序に下垂体での miR-449a の発現調節異常による CRF 1 型受容体の下方制御の異常が生じることが原因である可能性を示してきた。さらに、miR-449a の発現異常には非翻訳 RNA (ncRNA) でグルココルチコイド受容体のデコイとして働くとの報告がある Gas5 の発現量の亢進が関与する可能性を示した。低出生体重ラット仔の下垂体で Gas5 の発現異常が見られたか機序として、Gas5 をコードする DNA のプロモーター領域におけるメチル化の解析を行った。Gas5 のコード領域 5 上流に 13 個の DNA のメチル化サイト (CpG 配列) を

DNA データベースで見出し、それらのメチル化の程度をバイサルフェートシークエンス法で比較したが対照ラットとの間に差はみられなかった。最近、Gas5 には独自の ncRNA 分解系が存在することが報告されたことから、出生時低体重ラット仔の下垂体では Gas5 の合成が進んでいるのではなく、分解が遅延しているために細胞内の Gas5 の量が増加している可能性が考えられる。

雌雄の出生時低体重ラットを飼育・交配し、次世代のラット仔を得て、それらのラットに拘束ストレスを負荷すると、血中コルチコステロン濃度の高値維持が観察された。これらのことから Gas5 以外の遺伝子あるいは遺伝子群でエピジェネティックな変化が生じ、その変化が次世代に受け継がれた可能性が考えられる。

出生時低体重ラット仔の多くは離乳時までに対照ラットの平均身長および平均体重の-2SD 以内までに追いつき成長するが、その一部は追いつき成長せず短体長低体重となる。そこで、追いつき成長したラット仔（LBW-CG, low birth weight and catch-up growth）に加え、追いつき成長せず短体長低体重を呈するラット仔（LBW-NCG, low birth weight and non-catch-up growth）での検討を行った。BW-NCG ラットは、血中コルチコステロン濃度の基礎値は対照ラットとの間に差はみられなかったが、ストレス負荷 120 分後に対照ラットは頂値に比べ低下していたのに対し、高い値を維持したままであった。また、この値は LBW-CG と比べても有意に高かった。LBW-NCG ラットでは拘束ストレス負荷後の下垂体における miR-449a の発現に増加がみられず、CRF 1 型受容体のダウンレギュレーションの異常がみられた。これらの結果から、出生時低体重ラットでは何らかの機序により miR-449a の発現調節に異常が生じ、ストレ



ス負荷後の血中コルチコステロンの長期高値持続が観察された。コルチコステロンはセロトニンなどのモノアミン受容体の発現調節に関与する事、コルチコステロンの高値持続はグルココルチコイド抵抗性を招き、グルココルチコイド応答遺伝子発現に異常を生じることが明らかにされている。LBW-NCG ラットの下垂体ではグルココルチコイド受容体発現を調節する microRNA である miR-101a や miR-142-3p の発現調節にも異常が見られていることから、出生時低体重ラットではストレスに対し脆弱で、ストレス負荷による鬱やその他の神経性疾患発症リスクが高くなっている可能性が高い。さらには、追いつき成長しない短体長低体重ラットである LBW-NCG ではよりリスクが高い可能性が示された。以上より、妊娠中の低栄養摂取は児の発育に影響を与える可能性を示唆する結果である。

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 1 件）

1. Nemoto T, Mano A, Shibasaki T. miR-449a contributes to glucocorticoid-induced CRF-R1 downregulation in the pituitary during stress. Mol Endocrinol. 27: 1593-1602, 2013.

〔学会発表〕（計 6 件）
[国際学会]

1. Nemoto T, Shibasaki T. Pituitary

miR-449a is involved in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis abnormality in offspring from malnourished dams via CRF type 1 receptor expression modulation. International Symposium on regulatory peptide 2012 年 8 月, Copenhagen, Denmark

2. Nemoto T, Shibasaki T. miR-449a is involved in glucocorticoid-induced downregulation of CRF type 1 receptor expression. The Endocrine Society 94th Annual Meeting 2012 年 6 月, Houston, Texas, USA

[シンポジウム]

3. 根本 崇宏、芝﨑　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 日本内分泌学会総会　2013 年 4 月

4. 根本 崇宏, 芝﨑　保　低出生体重ラット仔のストレス時の HPA 軸反応の異常：下垂体 miR-449a の CRF 1 型受容体下方制御への関与. 第 23 回 間脳・下垂体・副腎系研究会　2012 年 3 月

[一般演題]

5. 根本 崇宏, 芝﨑　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. 根本 崇宏, 芝﨑　保　出生児低体重ラット仔におけるストレスによる HPA 軸活性化の異常の解析. 第 38 回 日本神経内分泌学会学術集会　2011 年 11 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://college.nms.ac.jp/page/328.html

６．研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

(3)連携研究者