

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 25 年 5 月 16 日現在

機関番号： 32622

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2010～2012

課題番号： 22591207

研究課題名（和文） ストレス脆弱性への胎生期環境の分子基盤

研究課題名（英文） Effect of prenatal environment on stress response in offspring

研究代表者

小川 哲郎（Ogawa Tetsuo）

昭和大学・医学部・講師

研究者番号： 60384210

研究成果の概要（和文）：マウス胎児に低栄養を負荷し肝臓の遺伝子発現を解析することで成人期疾患の胎児期起源説に関与する遺伝子を検索した。カロリー制限の成人と胎児での効果が逆なことに注目することで *trib1* などの心筋梗塞と関係の深い遺伝子が検索された。また、免疫系とストレスホルモンシグナルに関する多くの遺伝子の発現と *promoter* の DNA メチル化に変化を認めた。今回見出された遺伝子群は生活習慣病のリスクや胎児期栄養環境の予測に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： Prenatal undernutrition has been associated with increased risks of adult diseases. We treated pregnant mice with 50% food restriction, and performed global gene expression and promoter DNA methylation profiling on the fetal livers. We successfully found genes such as *trib1* which has been associated with heart diseases, and many genes related to the immune system, and glucocorticoid signaling. These searched genes may be useful to predict nutritional environment during fetal period, and risks of adult diseases due to fetal environments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：DOHaD・子宮内環境・低栄養・生活習慣病・胎児期低栄養・DNA マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

欧米を中心に母体の低栄養による低出生体重と成人期における生活習慣病のリスク

との関連が報告され、動物実験においても妊娠動物の給餌制限負荷により出生児の成熟期におけるインスリン抵抗性、高血圧、肥満

等の誘発や寿命の短縮が報告され、これらは DOHaD (developmental origins of health and disease) 説として論じられるようになった。日本は低出生体重児の出生率が高い国であり、恐らく女性の痩せ志向の高さからくる低栄養が子の出生時の低体重につながり、これがさらに生活習慣病予備軍の増加に関与していることが推察された。従って、胎児期低栄養と生活習慣病のリスクとを結びつけるメカニズムの解明、さらにはこの解明に基づく生活習慣病の予防法の確立が急務であると考えられた。メカニズムの解明を目指したそれまでの動物実験の多くは胎児期の低栄養負荷に対し成熟期を対象としている。しかし、このような実験系は長期にわたることから胎児期の影響以外の要因を新生児期以降にひろってしまうリスクも高いことが懸念された。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠マウスに低栄養環境を負荷し、出生前日の胎児から肝臓を摘出し、網羅的な遺伝子発現解析を行い、胎児の肝臓で低栄養環境により発現が変化する遺伝子群の検索を行った。摘出の前日に絶食処置を施した胎児の解析も加えることにより低栄養で一過性に变化する遺伝子の把握も行った。解析ではカロリー制限の成人および胎児に対する効果が逆であることに注目し、胎児期と成熟期（母動物の組織で解析）とで逆方向に発現が変化する遺伝子の検索も行った。また、胎児期での発現の変化が出生後も持続する可能性を予測するため promoter array を用いた網羅的 DNA メチル化解析を行った。莫大な数の遺伝子の解析をスムーズにするため各遺伝子の機能に関するデータベースを利用し、133 のカテゴリーとサブカテゴリーに遺伝子を振り分ける独自の解析ソフトを作製し、検索された遺伝子がどのような機

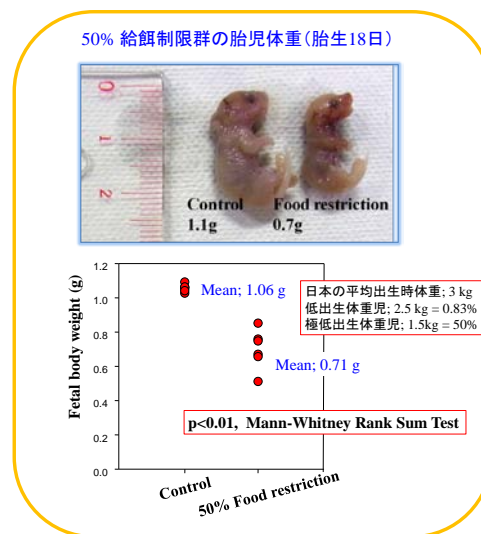
能に関与するかものであるかを検討した。

3. 研究の方法

C57BL/6 系マウスの妊娠 10 日から 17 日まで 50% の給餌制限を負荷し、妊娠 18 日に胎児を摘出し体重を測定後、肝臓を摘出し保存した。また別の妊娠マウスには妊娠 17 日に絶食を行い翌 18 日に胎児組織を摘出した。一部の肝臓にはホルマリン固定を行い病理組織標本を作製し観察を行った。胎児組織から mRNA を抽出し、Dye-Swap 法にて DNA マイクロアレイ解析を行った。さらに、メチル化 CpG 結合タンパクによる沈降を行ったサンプルと無処置のものをハイブリットすることにより promoter 領域の網羅的メチル化解析を行った。遺伝子発現及び DNA メチル化度に関して 1.5 倍以上あるいは 0.75 倍以下に変動した遺伝子をリスト化し、独自に作製した解析ソフトを用い如何なる生物学的機能に影響が及んでいるかを検討した。また、一部の遺伝子に関しては RT-PCR を行い、発現変化の確認を行った。

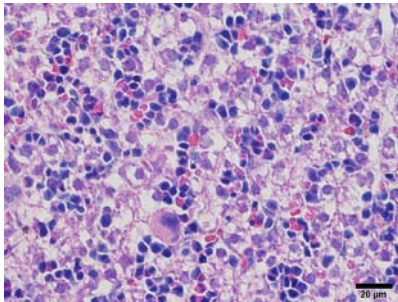
4. 研究成果

50% 給餌制限により胎児体重は約 30% 減少し、これは臨床における低出生体重児から極低出生体重児のモデルであることが明らかとなった。

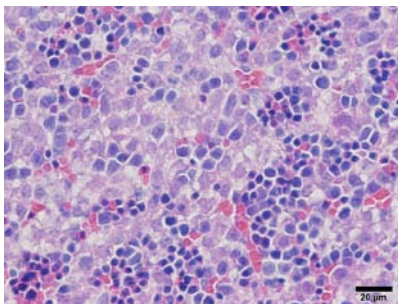


胎児肝臓の病理観察では 50%給餌制限に曝露された胎児の肝臓では、細胞質の空胞形成（グリコーゲン野）の減少が認められた。絶食処置を受けた胎児の肝臓ではこの所見は認められなかった。給餌制限及び絶食処置いずれも胎児の肝臓にも細胞死の誘発は認められなかった。

胎児肝臓の病理組織



Control

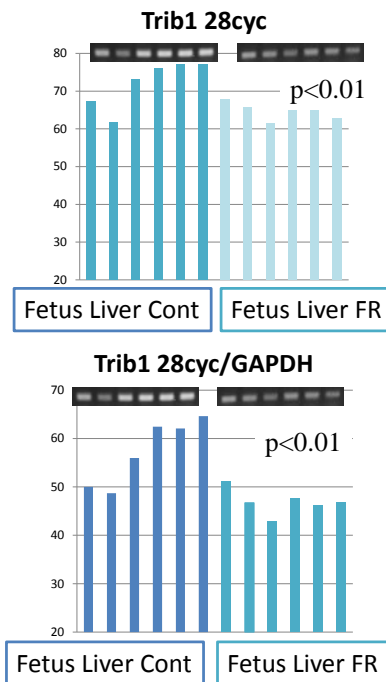


Food restriction

胎児および母動物の肝臓で発現が逆方向に変化する遺伝子の検索から、コレステロール代謝および心筋梗塞のリスクと関係が深い *trib1* 遺伝子の発現低下が認められた。これは RT-PCR においても確認された。

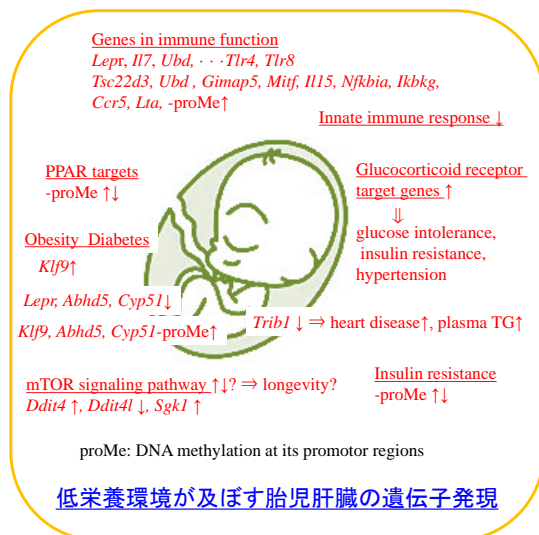
Gene name	Average fold	
	Mother FR	Fetus FR
<i>Trib1</i>	1.67	0.61

Trib1 RT-PCR



さらに *trib1* 遺伝子の promoter 領域での DNA メチル化の増加が確認された。また、欠損により表現型として肥満・糖尿病が現れることが知られている *lepr* (レプチン受容体) の発現低下が見出された。

さらなる解析から、多くの免疫系に関与する遺伝子の発現と promoter 領域での DNA メチル化の変化が明らかになった。また、ストレスホルモン (グルココルチコイド) シグナルに関する遺伝子発現と DNA メチル化にも変化が認められた。これは低栄養による胎盤でのストレスホルモン分解能が低下し母体のストレスホルモンが胎児に影響を及ぼすとするこれまでの DOHaD におけるストレスホルモンの重要性を指摘する報告を支持する結果であった。



本研究で得られた DOHaD 責任候補遺伝子群により生活習慣病のリスクといった胎生期の環境に基づいた脆弱性の予測が可能になると考えられる。

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 8 件)

- ① Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Ogawa T, Aiuchi T, Tsuruyama T, Tamaki K, Shioda S. Transcriptomics and proteomics analyses of the PACAP38 influenced ischemic brain in permanent middle cerebral artery occlusion model mice. *J Neuroinflammation*. 9:256, 2012. doi: 10.1186/1742-2094-9-256.
- ② Muneoka K, Funahashi H, Ogawa T, Whitaker-Azmitia PM, Shioda S. Shared features of S100B immunohistochemistry and cytochrome oxidase histochemistry in the ventroposterior thalamus and lateral habenula in neonatal rats. *Int. J. Dev. Neurosci*. 30:499-505, 2012. doi: 10.1016/j.npep.2012.09.007.
- ③ Ogawa T, Kuwagata M, Muneoka K, Wakai C, Senuma M, Kubo H, Shioda S. Abnormal brain function of the rat neonate in a prenatal 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-induced developmental disorder model. *Int. J. Dev. Neurosci*. 30:507-15, 2012. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2012.05.002.
- ④ Kuwagata M, Ogawa T, Shioda S. Hyperactivity induced by prenatal BrdU exposure across several experimental conditions. *Congenit. Anom. Kyoto* 51:177-182, 2011. doi: 10.1111/j.1741-4520.2011.00331.x.

⑤ Kuwagata M, Muneoka K, Ogawa T, Shioda S. Effects of the genotoxic agent 5-bromo-2'-deoxyuridine with or without pre-pubertal gonadectomy on brain monoamines and their metabolites in female rats. *Brain Res Bull*. 85:207-211, 2011. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.03.005.

⑥ Ogawa T, Rakwal R, Shibato J, Sawa C, Saito T, Murayama A, Kuwagata M, Kageyama H, Yagi M, Satoh K, Shioda S. Seeking Gene Candidates Responsible for Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Congenit. Anom. Kyoto* 51: 110-125, 2011. doi: 10.1111/j.1741-4520.2011.00315.x.

⑦ Ogawa T, Wakai C, Saito T, Murayama A, Mimura Y, Youfu S, Nakamachi T, Kuwagata M, Satoh K, Shioda S. Distribution of the longevity gene product, SIRT1, in developing mouse organs. *Congenit. Anom. Kyoto* 51:70-79, 2011. doi: 10.1111/j.1741-4520.2010.00304.x.

⑧ Muneoka K, Kuwagata M, Ogawa T, Shioda S. Sex-specific effects of early neonatal progesterone treatment on dopamine and serotonin metabolism in rat striatum and frontal cortex. *Life Sci*. 87:738-742, 2010. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.016.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小川哲郎 バルプロ酸の胎生期曝露により実験動物に誘発される発達神経毒性 第 52 回日本先天異常学会 (東京、2012. 7. 7)
- ② Ogawa T Searching gene candidates responsible for mental disorders in the fetal mouse undernutrition model. 27th International Neurotoxicology Conference (Research Triangle Park, NC, 2011, 12.1)
- ③ Ogawa T Effect of nucleoprotein (NP) diet on expression of gene candidates for developmental origins of health and disease (DOHaD). Developmental origins of health and disease 7th world congress (Portland, 2011, 9.20)
- ④ Ogawa T Global gene expression profiling analysis of food deprived maternal and fetal mice livers. 50th Society of Toxicology, (Washington DC, 2011.3.8)
- ⑤ Kuwagata M, Ogawa T. Unraveling the effects of development on the olfactory system in a BrdU-induced developmental disorder model rat. 50th Society of Toxicology, (Washington DC, 2011.3.8)

[図書] (計 1 件)

- ① Masuo Y, Hirano M, Shibato J, Nam H W, Fournier I, Mériaux C, Wisztorski M, Salzet M, Soya H, Agrawal GK, Ogawa T, Shioda S, Rakwal R *Brain Proteomics: Sample*

Preparation Techniques for the Analysis of Rat
Brain Samples Using Mass Spectrometry
In Sample Preparation in Biological Mass
Spectrometry pp.171-195, 2011 Springer

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 哲郎 (Ogawa Tetsuo)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号：60384210

(2) 研究分担者

塩田 清二 (Shioda Seiji)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：80102375

影山 晴秋 (Kageyama Hruaki)
桐生大学・医療保健学部・准教授
研究者番号：00433839

(3) 連携研究者

()

研究者番号：