

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870008

研究課題名(和文)胎盤性セロトニンが骨格筋脂肪代謝能に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文)Effect of placental serotonin exposure on lipid metabolism of skeletal muscles

研究代表者

金野 俊洋 (KONNO, Toshihiro)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：60568260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋はエネルギー源として脂肪を利用する赤色筋線維と糖を利用する白色筋線維から構成され、赤色・白色筋線維の組成は骨格筋の代謝特性を決定づける。筋線維の分化には神経支配が重要であるが、マウスにおいては胎盤で作られるセロトニンが胎仔期のセロトニン神経発達に影響する。本研究ではセロトニン合成阻害剤をマウスの胎盤に投与し、出生後のマウスの増体量および骨格筋筋線維構成を検討したが、生後12週齢までの増体量と骨格筋の筋線維型構成に胎盤性セロトニン合成阻害の影響は見られず、胎仔期の胎盤性セロトニン暴露が骨格筋の代謝特性に及ぼす影響は極めて限定的であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscles are composed of muscle fibers, which are classified into red muscle fibers and white muscle fibers, depending upon their energy metabolisms. The red muscle fibers utilize fat as an energy source, while the white muscle fibers utilize glucose. The composition of muscle fiber types determines the muscle's metabolic property. Differentiation of immature fibers require proper innervation. In mice, placenta contributes to the fetal serotonin nerve development as an external source of serotonin. In this study, we investigated the effect of placental serotonin on the neonatal growth and the composition of muscle fiber types. The inhibition of placental serotonin synthesis did not affect on the neonatal growth. Also, the muscle fiber composition did not differ between pups from control and serotonin synthesis inhibition groups. Our results indicated that the placental serotonin had only limited effect in determination of metabolic property of skeletal muscles.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 動物生理・行動

キーワード：骨格筋 脂質代謝 胎盤 セロトニン

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は生体で最大のエネルギー消費器官であり、肝臓とともにエネルギー代謝の中心となる。骨格筋を構成する筋線維は、遅筋型ミオシン重鎖を有し好氣的代謝が活発な I 型と、速筋型ミオシン重鎖を有し嫌氣的代謝が活発な II 型とに大別される。I 型筋線維は脂肪代謝をエネルギー源とし抗疲労性である。II 型筋線維はさらに IIA 型と IIB 型に分類され、IIA 型筋線維は好氣的・嫌氣的代謝の両方を備え抗疲労性であるが、IIB 型筋線維は主に嫌氣的糖代謝をエネルギー源とし疲労しやすい。好氣的代謝能を有する I 型・IIA 型筋線維はミオグロビンが多く赤色を呈することから赤色筋線維に、IIB 型筋線維は白色筋線維に分類される。骨格筋の赤色・白色筋線維組成は食肉としての肉質に影響するのみならず、骨格筋の脂質・糖代謝に影響する代謝性疾患のリスク因子でもある。後期的代謝能を有する I 型および IIA 型筋線維は姿勢保持や歩行等に働くが、これらの運動には下降性セロトニン神経が関与することが知られている。したがって、発生過程においても、下降性セロトニン神経による運動ニューロンおよびシナプスの形成と、それによる筋線維束の収縮制御が筋線維の分化に関与すると考えられる。

セロトニンは、主に小腸と脳において合成される。マウスの発生過程においては E16 に腸クロム親和性細胞がセロトニン合成を開始し、胎仔血中セロトニンの主要な供給源となる。一方で、神経細胞のセロトニン神経への分化は発生過程の早い段階 (E10.5) で見られ、E14.5 には軸索が脳新皮質に到達する。セロトニン受容体はセロトニン神経の軸索が到達する以前より発現しており、この時期にセロトニン受容体シグナリングを阻害するとセロトニン神経が発達不全となり、成体の脳機能に影響する。これらの知見は、内因性のセロトニン合成が開始される以前からセロトニン受容体シグナリングが機能していることを示し、発生初期過程における外因性セロトニンの存在と脳の発達における重要性が示唆されてきた。近年、胎盤により合成されるセロトニンが胎仔に供給され、発生過程での脳の発達に関与することが示された。この胎仔期における胎盤由来セロトニン暴露は出生後の脳機能に影響し得るのみならず、セロトニン神経支配を通じて骨格筋の代謝特性に影響することが考えられる。

## 2. 研究の目的

胎盤におけるセロトニン合成の阻害はセロトニン神経の正常な発達を妨げ、成体の脳機能に影響する。発生過程における骨格筋線維の分化には運動ニューロンによる筋束支配が重要であり、セロトニン神経の発達異常は、セロトニン神経による運動ニューロン形成とそれによる筋束支配を通じて骨格筋線維の分化に影響する可能性がある。セロトニ

ン神経により支配される姿勢保持や歩行等の骨格筋活動には I 型および IIA 型筋線維が作用する。I 型および IIA 型筋線維は脂肪代謝能が高く、発生過程において決定される骨格筋の筋線維型構成は、食肉としての肉質に影響し、また、成体における代謝に影響し得る代謝性疾患のリスク因子である。

そこで本研究では、胎盤特異的なセロトニン合成阻害マウスモデルを確立し、出生時および成体における骨格筋の筋線維型構成への影響を調べ、胎盤由来セロトニンが生後のグルコースおよび脂肪代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 胎盤性セロトニン合成阻害マウスの確立: セロトニンはトリプトファンヒドロキシラーゼ (TPH) によるトリプトファンへのヒドロキシル基付加により合成される。ヒトやマウスでは TPH1 と TPH2 の 2 種の TPH アイソフォームが存在し、成体における末梢でのセロトニン合成は主に TPH2 に依存するが、胎盤においては TPH1 のみが発現する。本研究では 8 週齢の ICR マウスを用い、妊娠 13.5、14.5、15.5、16.5 および 17.5 日齢の胎盤を採取し、胎盤迷路層から抽出した RNA を用いて *Tph1* の発現を RT-PCR および realtime RT-PCR 法にて検証した。TPH によるセロトニン合成は p-クロロフェニルアラニンにより阻害することができる。そこで、妊娠 13.5 日齢の ICR マウスを用い、アバチン麻酔下で胎盤迷路層に p-クロロフェニルアラニンを直接投与することで TPH によるセロトニン合成を阻害した。対照区マウスには、胎盤迷路層に PBS を投与した。TPH 阻害区、対照区それぞれのマウスを妊娠 18.5 日齢時に屠殺し、胎盤重量および胎仔重量を測定したのち、胎盤の組織切片を作成した。胎盤組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色により観察し、TPH 阻害による胎盤形成への影響を検討した。

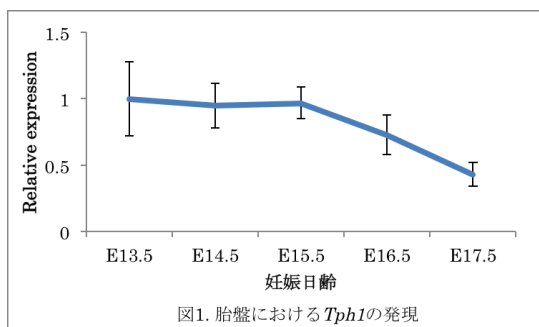
(2) 胎盤性セロトニンが仔の出生後の成長に及ぼす影響の検討: TPH 阻害区、対照区、および無処置区のマウスより出生したマウスを自由給餌下で飼育し、増体量および摂食量を測定した。また、給餌量を TPH 阻害区の摂食量に合わせたペアフィーディングを行い、増体量を測定した。増体量および摂食量の測定は 4 週齢から 12 週齢の間、経時的に行った。

(3) 胎盤性セロトニンが仔の骨格筋繊維型構成に及ぼす影響の検討: 骨格筋を構成する筋線維型構成を検証するため、TPH 阻害区、対照区、および無処置区より出生したマウスを 4 週齢および 12 週齢時に屠殺し、大腿四頭筋および腰最長筋を採取しドライアイス・ヘプタン法により凍結した後、新鮮凍結切片を作成した。また、大腿四頭筋を液体窒素にて凍結保存し、RIPA バッファーにてタンパク質を抽出した後、ウェスタンブロットング解

析に供した。筋線維型の同定はミオシン ATPase 活性による酵素組織化学的染色と NADH 脱水素酵素活性による染色により行った。また、腰最長筋より抽出したタンパク質を抗 fast-twitch myosin および抗 slow-twitch myosin を用いてウェスタンブロッティング法により半定量的に解析した。内在性コントロールには  $\beta$ -Tublin を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 胎盤性セロトニン合成阻害マウスの確立: 胎盤における *Tph1* の発現は RT-PCR 法により妊娠 13.5 日齢から 17.5 日齢のいずれのサンプルからも検出されたが、realtime RT-PCR 法による解析の結果、妊娠 16.5 日以降その発現は低下する傾向が見られた(図1)。



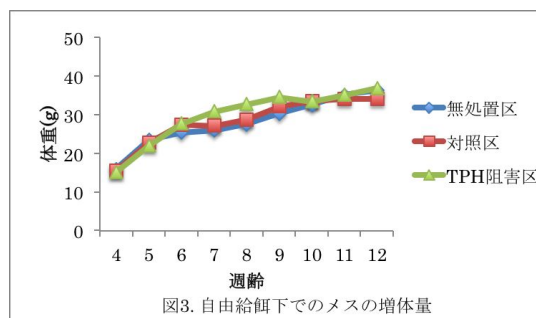
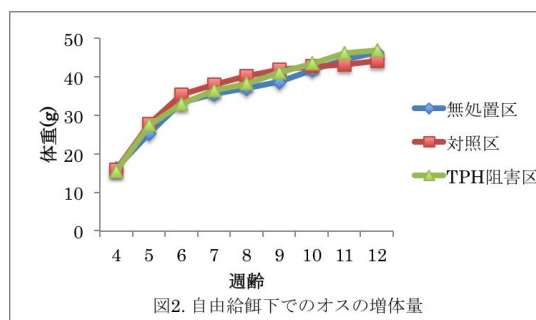
中枢におけるセロトニン神経の軸索は E14.5 日に大脳新皮質に到達することが知られており、この時期の胎盤由来セロトニン合成を阻害するため、妊娠 13.5 日齢の胎盤に p-クロロフェニルアラニンを直接投与した。TPH 阻害区、対照区、および無処置区の妊娠 18.5 日齢における胎仔重量および胎盤重量に違いは見られなかった(表1)。また、ヘマトキシリン・エオシン染色した妊娠 18.5 日齢の胎盤組織標本に TPH 阻害区、対照区、および無処置区の間で顕著な差異は認められず、本研究で用いた手法による p-クロロフェニルアラニン投与は基本的な胎盤形成および胎仔の成長に影響しないことが示された。

表1. 妊娠 18.5 日齢における胎仔および胎盤重量

	胎仔重量(mg)	胎盤重量(mg)
無処置区	1127.4 ± 46.3	92.5 ± 8.5
対照区	1087.6 ± 54.4	95.83 ± 12.1
TPH 阻害区	1108 ± 82.5	98.6 ± 11.4

(2) 胎盤性セロトニンが仔の出生後の成長に及ぼす影響の検討: TPH 阻害区、対照区、および無処置区のマウスより出生した新生仔は 3 週齢時に離乳し母親マウスとは別のケージにて飼育したが、3 週齢時には雌雄判別が困難なケースがあるため、4 週齢時に雌雄判別を行い、オスとメスを別のケージに入れ、自由給餌下で飼育、経時的に増大量と摂食量と測定した。オス、メスともに、PH 阻害区、対照区および無処置区で増体量に違いは見られなかったが(図2と3)、オス、メスともに TPH 阻害区より出生したマウスの摂食量が対

照区および無処置区より出生したマウスよりも少ない傾向が見られた。そこで、給餌量を TPH 阻害区の摂食量に合わせたペアフィードングを行い、4 週齢から 12 週齢まで経時的に体重を測定したが、区間での増体量の違いは見られなかった。



(3) 胎盤性セロトニンが仔の骨格筋繊維型構成に及ぼす影響の検討: TPH 阻害区、対照区および無処置区より出生したマウスの大腿四頭筋と腰最長筋を 3 週齢時および 12 週齢時に採取し、その筋線維型構成を検討した。大腿四頭筋と腰最長筋を構成する筋線維型構成は、連続凍結切片を用いて酸およびアルカリ前処理後のミオシン ATPase 反応により筋線維を I 型と II 型に分類し、さらに NADH 脱水素酵素活性の強度に基づいて II 型筋線維を IIA 型と IIB 型に分類した。大腿四頭筋は大腿直筋、外側広筋、内側広筋、および中間広筋の 4 頭からなり、部位によって筋線維型構成が異なるため、各部位毎に筋線維型構成を検討した。しかし、大腿四頭筋、腰最長筋ともに、その筋線維型構成に TPH 阻害区、対照区および無処置区の間で違いは見られなかった。骨格筋の機能的性質は筋を構成する筋線維型の数の比率と、筋線維の太さにより決定される。したがって、筋の収縮特性および代謝特性を検討する際には筋線維型の比率に加えて、各筋線維型の横断面積を考慮する必要がある。本研究では、筋機能を半定量的にする手法として抗 fast-twitch myosin および抗 slow-twitch myosin 抗体によるウェスタンブロッティングを用い、胎盤性セロトニンが 3 週齢および 12 週齢の腰最長筋を解析した。腰最長筋における fast-twitch および slow twitch myosin の発現量は TPH 阻害区、対照区および実験区の間で違いは見られず、胎盤によるセロトニン合成の阻害、およびそれによる胎仔期のセロトニン神経発達の遅延が出生後の骨格筋筋線維型構成に

及ぼす影響は極めて限定的であることが示唆された。本研究では胎盤におけるセロトニン合成を阻害することで胎仔期における胎盤性セロトニン暴露を阻害し、出生後 12 週齢までの増体量と骨格筋筋線維型構成を検討したが、セロトニン合成阻害が生後の増体量に及ぼす影響は少なくとも 12 週齢までは極めて限定的であり、また、骨格筋の代謝特性にも影響しないことが明らかになった。しかし、本研究においては活動によるエネルギー消費を評価しておらず、胎盤性セロトニンが出生後の健康に及ぼす影響をより正確に評価するためには個体の行動観察およびより長期にわたる増体量・摂食量のモニタリングが必要である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Konno T, Watanabe K.  
Morpho-functional relationship  
between muscular architecture and  
proportion of myofiber types in ovine  
antebrachial musculature. *Okajimas  
Folia Anat Jpn.* 査読有、  
2012;89(2):51-6.
- Konno T, Watanabe K. Distribution of  
myofiber types in the crural  
musculature of sheep. *Okajimas Folia  
Anat Jpn.* 査読有、2012;89(2):39-45.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

金野 俊洋 (KONNO, Toshihiro)  
琉球大学・農学部・准教授  
研究者番号：60568260

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：