

平成30年6月6日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18956

研究課題名(和文) ACTHが臓器の組織形成に与える影響と成長後の疾病発症との関連

研究課題名(英文) The effect of ACTH on histology of organs and pathogenesis of non-communicable diseases

研究代表者

小川 典子(Ogawa, Noriko)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：90598111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの発生における組織形成には個体差が存在し、その差が成長後の疾病発症に関与する可能性がある。今回多岐にわたり生体に影響するACTHの生活習慣病発症への影響を検討した。

胎生17.5日にJcl/ICRマウス母獣を開腹し、胎仔皮下に下垂体ACTH産生腫瘍細胞株AtT20を注入して閉腹後発生を継続させ、仔マウスを出生させた。出生時・生後3週齢・12週齢での体重及び、12週齢での血圧はControl群・ACTH群の間に有意差はなかったが、生後12週齢で施行したオープンフィールド試験にて、オスACTH群でフィールド中央部の運動量がControl群と比べ有意に低く、不安行動が認められた。

研究成果の概要(英文)：In human development, histogenesis generates wide individual variation in organ size/total function. The variation in organs may be associated in diseases in later life. We examined the effect of ACTH that variously affects living individual on the onset of non-communicable diseases.

The abdominal wall of the pregnant Jcl/ICR mice at E17.5 was incised. AtT20 cells were injected into the dorsal subcutaneous tissue of the embryos. After injection, the abdominal wall was closed and let the embryos develop until birth. We obtained offspring that lived for 12 weeks without showing Cushing syndrome. There was no significant difference between the control and ACTH groups in the body weight at birth, 3 weeks, and 12 weeks of age. Blood pressure at 12 weeks of age showed no significant difference. The male ACTH group had a significant lower movement in the central part of the field in the open field test, suggesting enhanced anxiety.

研究分野：発生生物学

キーワード：ACTH 胎生期 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

ヒトの発生において胎生第8週末までに殆どの主要な器官の概形が形成され(器官形成期)第9週以降から生後しばらくまで、臓器特異的な細胞分化と構築化による組織形成が続く。この組織形成には個体差が存在する。以前「京都コレクション」(<http://bird.cac.med.kyoto-u.ac.jp/>)と呼ばれる、京都大学に集められたヒト胚子・胎児標本の検討から、頭殿長が同じヒト胎児の臓器重量に2倍以上の差があることを見出した(Otani H. *Congenit Anom* 2010;50:205-211)。腎臓においてもネフロンの総数が個体によって2倍以上異なることが示されている(Merlet-Bénichou C. *Lab Invest* 1999;79:515-527)。そしてこのネフロン数は出生体重が低いと少なく(Mamalich R. *Kidney Inter* 2000;58:770-773)。低出生体重児が末期腎不全に至る危険性が高いことが報告されている(White SL. *Am J Kidney Dis* 2009;54:248-261)。これらの報告から、組織形成の個体差に基づく臓器の大きさ(ネフロンなど機能構造的ユニットの総数の差)が、成人期の疾病発症に対する予備能として重要であり(Otani H. *Congenit Anom* 2010;50:205-211)従って、組織形成期に臓器の成長を促進することができれば、予備能が高く、生活習慣病などの疾病に強い個体を得ることができる。と考える。

2. 研究の目的

臓器の組織形成に影響を与える因子として、内分泌ホルモンのうち、ストレス応答や免疫・代謝・循環調節など多岐にわたって生体に影響しているACTHに着目し、マウス胎仔の皮下に下垂体ACTH産生腫瘍細胞株AtT20細胞を生着させ、ACTHが全身の諸臓器の組織形成にどのような影響を与え、成長後の生活習慣病発症に関連するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

Jcl/ICRマウスの交尾翌日の正午を胎生(E)0.5とし、E17.5に母獣を開腹、子宮壁ごとに、双角子宮の一方の胎仔の背側皮下に、直視下でカーボンを混合したマウス下垂体ACTH産生腫瘍細胞株AtT20細胞 5×10^5 cellsを100 μ mガラスピペットにて注入した。他方の子宮角の胎仔皮下にはControlとして

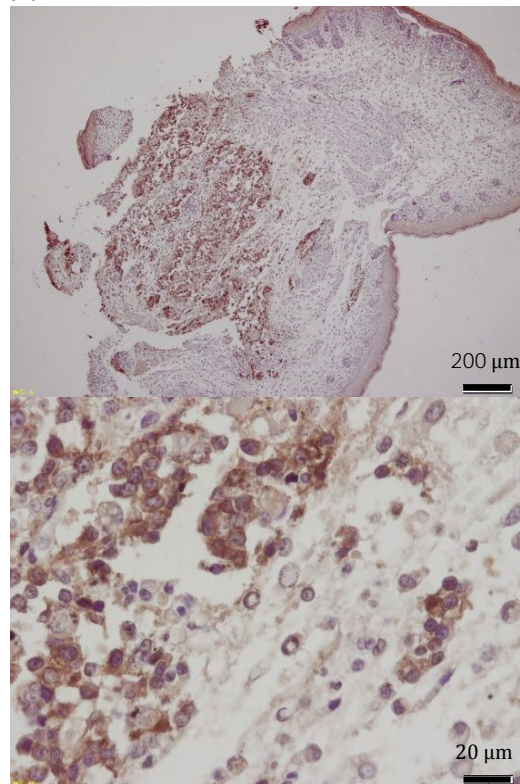
カーボンのみを注入した。閉腹後発生を継続させ、自然分娩にて新生仔を得た。

生後3週齢で尾静脈から採取した血液にてACTH濃度を測定し、Control群及びACTH群に分けた後、それぞれを更に普通食群(C)、45%高脂肪食群(HF)の計4群に分け、生後12週齢までの体重変化と12週齢での血圧を尾の加圧により測定した。また、行動異常を検討するため12週齢でControl群及びACTH群のオープンフィールド試験を行った。

4. 研究成果

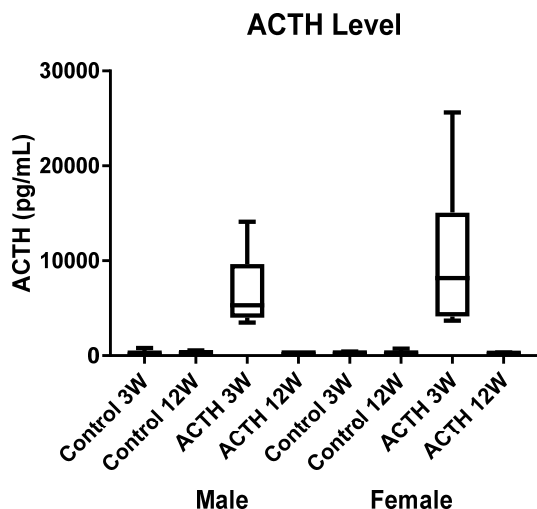
研究当初はE14.5にAtT20細胞株を注入し、出生した仔マウスは背側皮下にAtT20細胞株が結節を形成して生着し(図1 E17.5注入群の皮下結節ACTH免疫染色)注入群のACTH濃度はControl群の50倍以上と高値であったが、全例生後7日以内に死亡した。そのため、AtT20細胞の注入量及び注入時期を調整し、最終的にE17.5に注入し、ACTH濃度が3週齢でControl群の30~50倍のAtT細胞注入群(ACTH群)の仔マウスを得て、生後12週齢の成獣期まで生存させた。12週齢のACTH群はCushing徴候を示さなかった。

図1



ACTH 濃度は 3 週齢では Control 群オス 236.21 ± 212.44 pg/mL、メス 217.84 ± 107.33 pg/mL、ACTH 群オス 6877.21 ± 3685.02 pg/mL、メス 10307.31 ± 7227.04 pg/mL であった。12 週齢では Control 群オス 251.24 ± 148.85 pg/mL、メス 239.83 ± 192.40 pg/mL、ACTH 群オス 155.34 ± 49.20 pg/mL、メス 185.66 ± 112.98 pg/mL であり、3 週齢の ACTH 群の ACTH 濃度は Control と比べオスは約 30 倍、メスは約 50 倍と高値のマウスが得られたが、12 週齢では全例 Control 群と同レベルまで低下していた (図 2)。免疫システムなどにより注入した AtT20 細胞が消失したと考えられ、そのため Cushing 徴候を示さず成獣期まで生存し得たと考える。

図 2



体重変化について、12 週齢まで生存し得たマウスの、出生時オス Control 群 1.50 ± 0.09 g (n=12) ACTH 群 1.50 ± 0.07 g (n=8) メス Control 群 1.45 ± 0.02 g (n=9) ACTH 群 1.54 ± 0.11 g (n=10) (図 3) 離乳期である 3 週齢オス Control 群 14.72 ± 0.86 g (n=12) ACTH 群 12.14 ± 2.98 g (n=8) メス Control 群 13.02 ± 0.73 g (n=9) ACTH 群 13.66 ± 1.33 g (n=10) (図 4) と出生時及び 3 週齢では Control 群及び ACTH 群の間に有意差は認められなかった。

3 週齢から普通食 (C) 又は高脂肪食 (HF) を与えたマウスの 12 週齢の体重は、オス Control-C 群 41.69 ± 1.62 g 3 週齢からの増加率 2.8 ± 0.1 倍 (n=8) Control-HF 群 47.60 ± 9.89 g 3.7 ± 0.7 倍 (n=4) ACTH-C 群 38.52

± 4.39 g 3.3 ± 0.6 倍 (n=5) ACTH-HF 群 41.63 ± 4.65 g 3.4 ± 0.4 倍 (n=3) メス Control-C 群 32.28 ± 1.64 g 2.5 ± 0.1 倍 (n=5) Control-HF 群 32.23 ± 3.66 g 2.5 ± 0.2 倍 (n=4) ACTH-C 群 30.78 ± 2.10 g 2.3 ± 0.2 倍 (n=5) ACTH-HF 群 35.22 ± 6.26 g 2.6 ± 0.6 倍 (n=5) であった (図 5・図 6)。オスでは Control 群では HF 食により体重増加が認められたが ACTH 群では有意な体重増加が認められなかった。但し、メスでは Control 群の HF 群でも C 群と同程度の体重増加であり、n 数が少ないことや、ケージ内の匹数の影響が考えられ再検討が必要である。

図 3

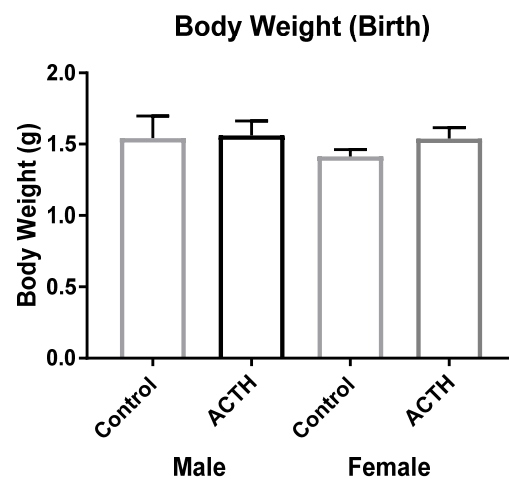


図 4

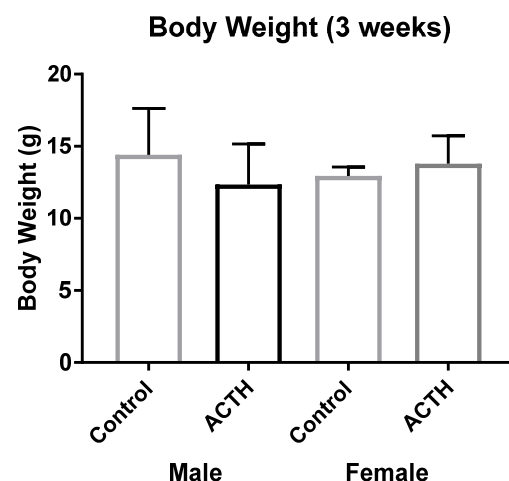


図 5

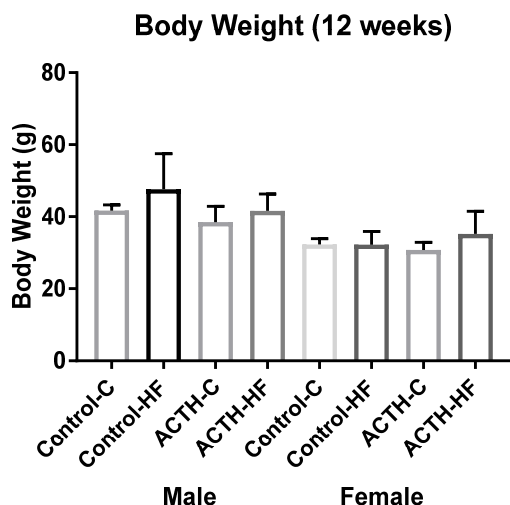
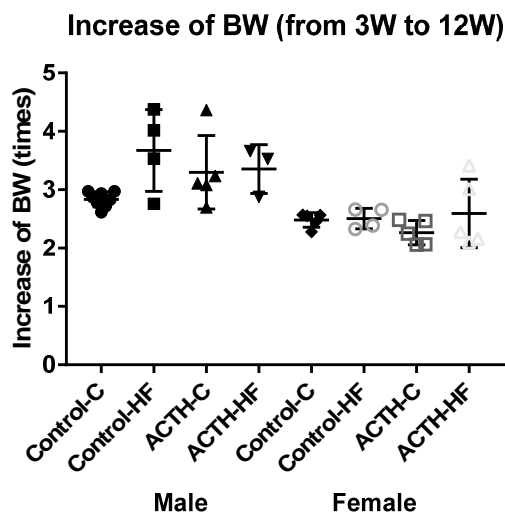


図 6

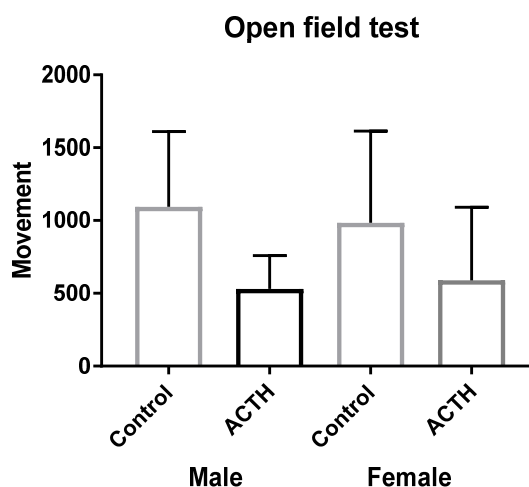


12 週齢での血圧は収縮期オス Control-C 群 114.5 ± 8.4 mmHg (n=9) Control-HF 群 115.6 ± 30.7 mmHg (n=4) ACTH-C 群 117.7 ± 20.9 mmHg (n=5) ACTH-H 群 118.6 ± 28.3 mmHg (n=4) メス Control-C 群 118.8 ± 19.7 mmHg (n=6) Control-HF 群 94.5 ± 16.4 mmHg (n=4) ACTH-C 群 117.0 ± 24.9 mmHg (n=5) ACTH-H 群 125.2 ± 9.0 mmHg (n=5) 拡張期オス Control-C 群 73.4 ± 16.1 mmHg (n=9) Control-HF 群 68.4 ± 28.3 mmHg (n=4) ACTH-C 群 80.2 ± 16.8 mmHg (n=5) ACTH-H 群 80.1 ± 8.3 mmHg (n=4) メス Control-C 群 74.7 ± 16.0 mmHg (n=6) Control-HF 群 67.0 ± 19.7 mmHg (n=4) ACTH-C 群 79.2 ± 22.9 mmHg (n=5) ACTH-H 群 88.0 ± 9.5 mmHg

(n=5) であり、いずれも有意差は認められなかった。

12 週齢で Control 群及び ACTH 群に行ったオープンフィールド試験では、フィールド中央部の運動量がオス Control 群 1094.33 ± 515.89 (n=9) ACTH 群 531.20 ± 228.61 (n=5) メス Control 群 984.88 ± 629.0 (n=8) ACTH 群 588.50 ± 501.54 (n=4) (図 7) 辺縁部の運動量がオス Control 群 3592.44 ± 841.37 (n=9) ACTH 群 3955.20 ± 820.16 (n=5) メス Control 群 4302.0 ± 1246.49 (n=8) ACTH 群 4318.25 ± 703.54 (n=4) であった。オス ACTH 群の中央部の運動量が Control 群と比べ有意に低く (P = 0.072) 不安行動が認められた。

図 7



今後は不安行動誘因の原因となりうる海馬・扁桃体・視床下部下垂体の組織変化や代謝性変化を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kaneda R, Saeki Y, Getachew D, Matsumoto A, Furuya M, Ogawa N, Motoya T, Rafiq AM, Jahan E, Udagawa J, Hashimoto R, Otani H. Interkinetic nuclear migration in the tracheal and esophageal epithelia of the mouse embryo: Possible implications for tracheo-esophageal anomalies. *Congenit Anom (Kyoto)*. 58(2):62-70, 2018 DOI: 10.1111/cga.12241

Nitta T, Ogawa N, Getachew D, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H. Spatiotemporal difference in the mode

of interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic intestinal epithelium. *Shimane J Med Sci* 33:79-85, 2017

Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H. Interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic ureteric epithelium: Possible implication for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Congenit Anom* 56(3):127-134, 2016 DOI: 10.1111/cga.12150

〔学会発表〕(計5件)

Otani H, Nitta T, Ogawa N, Kaneda R, Saeki Y, Rafiq AM, Jahan E, Regassa DG, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Hatta T. Interkinetic nuclear migration in the developing esophageal, tracheal, and intestinal epithelia. 第122回日本解剖学会全国学術集会、2017年

大谷 浩、松本暁洋、小川典子、Ashiq M. Rafiq、Dereje Getachew. 上皮幹細胞の増殖分化調節機構 interkinetic nuclear migration の上皮管腔臓器の器官・組織形成における役割. 日本解剖学会第72回中国・四国支部学術集会、2017年

Otani H, Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Kaneda R, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Hatta T. Interkinetic nuclear migration in the developing endoderm- and mesoderm-origin epithelial tubular structures. 第121回日本解剖学会全国学術集会、2016年

新田哲哉、小川典子、倉本純子、元矢知志、佐藤文夫、古屋智英、Rafiq Ashiq Mahmood、Jahan Esrat、松本暁洋、宇田川 潤、大谷 浩. マウス胎仔腸管の上皮細胞数と Interkinetic nuclear migration に関する研究. 第56回日本先天異常学会学術集会、2016年

松本暁洋、古屋智英、小川典子、佐藤文夫、橋本龍樹、八田稔久、大谷 浩. マウス胎仔脳組織形成における顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子の作用の解析. 第56回日本先天異常学会学術集会、2016年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小川 典子 (Ogawa, NORIKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：90598111