

平成30年 5月18日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19680

研究課題名(和文)オートファジーが胎児成長に及ぼす効果とその機序の解明

研究課題名(英文)The effect of autophagy on the fetal growth

研究代表者

高谷 具純 (Takatani, Tomozumi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10608821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：野生型のマウス及びATG5ノックアウトマウスより樹立された胎児線維芽細胞を用いて、無血清刺激または無血清および低酸素刺激を与えたところ、オートファジーの欠失により、インスリン様成長因子シグナルが亢進することが認められ、オートファジーと成長因子では何らかのクロストークが存在することが示唆された。しかしながら浸透圧ポンプによるトロンボキサンA₂類似体投与による、子宮内発育不全モデルでの検討では成長に与えるオートファジーの効果については明らかにならなかった。今後適切なモデルによる検証が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To reveal the effect of autophagy on the fetal growth, we stimulated wild type (WT) and ATG5 knock-out (ATG5KO) mouse embryonic fibroblast (MEF) cells with serum-free stimulation only or serum-free and hypoxia stimulation. With serum-free stimulation, ATG5KO MEF cells showed increased AKT phosphorylation both before and after 10nM IGF-1 stimulation compared with WT MEF cells. We also found AKT phosphorylation in ATG5KO MEF cells was increased with serum-free and hypoxia stimulation compared with WT MEF cells. These data suggest that there might be a cross-talk between autophagy and insulin-like growth factor signaling. Next, we investigated the effect in vivo, using IUGR model mouse induced by thromboxane A₂ analog. However, we did not see the difference between WT and ATG5KO mouse. Further studies would be required to verify the effect of autophagy on intrauterine growth retardation.

研究分野：小児科

キーワード：オートファジー インスリン様成長因子

1. 研究開始当初の背景

子宮内発育不全は全妊娠の5%を占め、その一部は出生後も低身長をきたすことが知られている。原因についていくつか考えられているが、一つには胎盤機能の低下が胎内ストレスを引き起こし、成長因子シグナルを低下させる可能性が考えられている。しかしながらその詳細は未解明な点が多い。

細胞には飢餓などのストレスにより自身の一部を分解し栄養素にして生存するオートファジーと呼ばれる機構がある。近年その研究が進み、オートファジーは癌や神経変性疾患などの病態に深くかかわっていることが明らかにされている。しかしながら、胎児や新生児期の骨成長における役割や、子宮内発育不全及び出生後の低身長においてオートファジーがどのように寄与するかは未解明である。成長因子シグナルの破たんは子宮内発育不全や持続する低身長をきたすことが知られており、胎内ストレスによって誘導されるオートファジーが、成長因子シグナルとの相互作用経路を介して、胎児や新生児の発育に一定の役割を果たすことが予想される。

2. 研究の目的

上記研究背景をふまえて、本研究では、オートファジーと胎児、新生児期の成長との関連、特に成長因子との相互作用を明らかにすることを目的とした。子宮内発育不全および出生後の低身長に対して、オートファジーが成長因子にどのように影響を与えるかを明らかにし、オートファジーを介した新規治療法開発、臨床応用の開発につながる基盤を作ることとする。

3. 研究の方法

上記目的を達成するため、1) 子宮内発育不全モデルマウスを作成し、胎内および出生後にオートファジーがどのように影響を与えているかを明らかにし、2) オートファ

ジー欠損細胞を用いて成長因子シグナルがどのように変化しているかを調べた。ストレスとして、無血清刺激、無血清および低酸素刺激(1%)を加えたのち、IGF-1 10nMで刺激しAKTのリン酸化を評価した。

4. 研究成果

当初オートファジー誘導を起こす薬剤で成長因子の反応に変化が見られたが、安定性に欠けたため、細胞によるシグナル解析を野生型のマウス及びATG5ノックアウトマウスより樹立された胎児線維芽細胞を用いて行った。無血清刺激または無血清および低酸素刺激を(1%)同時に行い、インスリン様成長因子によって制御されるAKTのリン酸化状態を評価した。その結果、無血清刺激における野生型およびATG5ノックアウト細胞でのAKTのリン酸化状態は、ATG5ノックアウト細胞では基底状態から亢進していることが認められた(図1)。

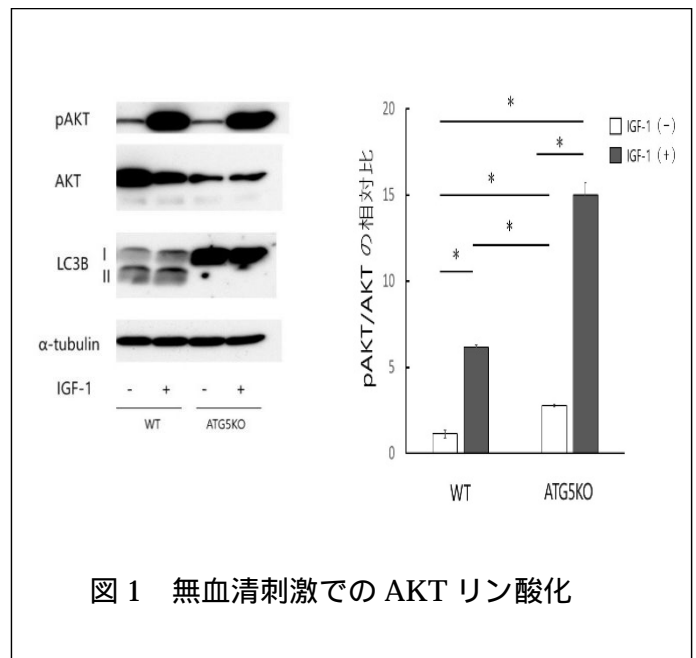
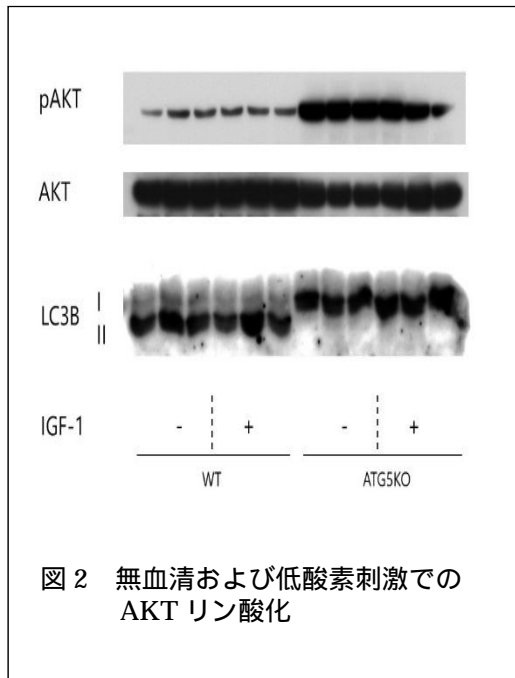
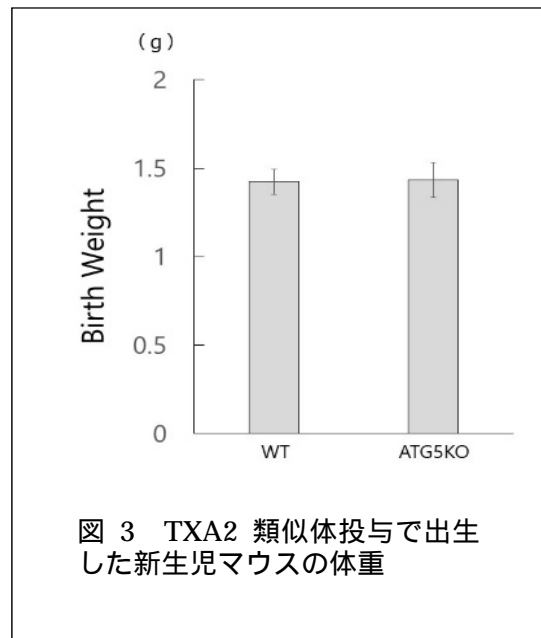


図1 無血清刺激でのAKTリン酸化



さらに子宮への血流低下による子宮内ストレス亢進時には、低還流に伴う栄養状態の低下に加え低酸素も引き起こされることから、無血清及び低酸素刺激を、野生型および ATG5 ノックアウト細胞に加えた後、IGF-1 により刺激してその反応を AKT のリン酸化状態にて評価した。その結果、両細胞とも IGF-1 への反応はほぼ消失していたが、ATG5 ノックアウト細胞では野生型に比べ AKT のリン酸化が亢進していることが認められた (図 2)。

生体での作用を確認するため子宮内発育不全モデルの確立について検討したが、野生型マウスで両側子宮動脈結紮モデルを作成し測定を試みたが、胎児についての安定的な結果が得られず、本モデル以外の子宮内発育不全モデルが必要と考えられたため、現在までに報告されているモデルを検証し、その中で浸透圧ポンプ植え込みによるトロンボキササン A2 類似体持続投与により、子宮内発育不全を誘導するのが最も安定していると考えられたため、同モデルでの検証を進めた。野生型同士と ATG5 ヘテロノックアウトマウス同士を交配し、E12.5 の時点で母体に浸透圧ポンプを後腹膜腹腔に留



置し、トロンボキササン A2 類似体の浸透圧ポンプによる持続投与を行った。得られた新生児マウスを P0 の時点で計測した。しかしながら、野生型マウスと ATG5 ノックアウトマウスで新生児の差は明らかではなかった (図 3)。

以上の結果からオートファジーの欠失により成長因子シグナルの亢進が引き起こされ、オートファジーと成長因子では何らかのクロストークが存在することが示唆されたが、生体での効果については明らかにならなかった。In vitro の実験においても子宮内発育不全にかかわる低栄養刺激や低栄養および低酸素刺激では IGF-1 投与による成長因子シグナルの反応に違いがあることから、モデルマウスによる検証では、子宮への血流低下の程度や、栄養制限の方法を組み合わせるなど、より細かな条件設定を行って実験する必要があると考えられ、今後適切なモデルによる検証が必要と考えられた。

5 . 主な発表論文等

- [雑誌論文](計 0 件)
- [学会発表](計 0 件)
- [図書](計 0 件)
- [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高谷具純 (TAKATANI tomozumi)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10608821