

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10182

研究課題名（和文）オートファジーが出生直後の飢餓対応に果たす役割の検討

研究課題名（英文）The role of autophagy in starvation response immediately after birth

研究代表者

関口 和人（Sekiguchi, Kazuhito）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40437926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：新生児は出生時に経胎盤の栄養供給が突然遮断され、哺乳が可能になるまでの間に厳しい飢餓に直面する。我々は特に肝臓に着目し、肝臓特異的オートファジー欠損マウスにおける出生直後飢餓時の血清栄養関連代謝物の構成を分析した。出生直後の飢餓期における肝臓のオートファジー欠乏は、出生直後の飢餓期における生命維持に必須ではないものの、新生児肝臓オートファジーが血清代謝物構成に変化をもたらすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類においてすべからく訪れる新生児飢餓期において、肝臓オートファジーはエネルギー維持に重要な役割を担うことが示唆された。今後、低栄養が新生児に与える諸病態とオートファジーの関連が明らかになれば、新生児の栄養管理の改善、新たな治療法開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Newborn babies face severe starvation before birth, when the placenta's nutritional supply is suddenly cut off. We focused on the liver and analyzed the serum nutrition-related metabolites in liver-specific autophagy-deficient mice during postnatal starvation.

Although liver autophagy deficiency during the postnatal starvation period is not essential for life support during the postnatal starvation period, it was revealed that neonatal liver autophagy causes changes in serum metabolite composition.

研究分野：小児科学

キーワード：オートファジー 飢餓 新生児 肝臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳動物は出生時に胎盤からの栄養供給が突然遮断され飢餓に晒される。出生に莫大なエネルギーを要するにも関わらず、ほとんどの児は初回哺乳までの数時間を問題なく過ごすことができる。その出生直後-初回哺乳間のエネルギー供給源として、オートファジーが注目されている。オートファジー(自食作用)は生理的な飢餓応答であり、細胞は自らの細胞質の蛋白成分を分解することでアミノ酸などの栄養素を捻出し、飢餓環境下を生き延びようとする。その一方で、オートファジーは細胞質やオルガネラをまとめて分解できる(バルク分解)という特異な能力を持つことから、個体発生や分化にも深く関与していると考えられている。

(2) ヒト臍帯組織を用いた出生児のオートファジー活性と臨床所見を対比する先行研究では、出生児の在胎週数、総蛋白、血糖とオートファジー活性を反映する LC3-II や p62 との間に正の相関が見出され、早産児ではオートファジーが十分に機能せず、蛋白合成や血糖維持に問題が生じている可能性を示唆した(平成 25-28 年度科研若手(B) 課題番号 25860914)¹

(3) 肝臓は飢餓対応においてグリコーゲン分解、糖新生、酸化などを通じて大きな役割を担う。

2. 研究の目的

(1) 肝臓特異的にオートファジーを阻害した新生仔マウス(オートファジー阻害群)と対照群の新生仔マウスにおいて、出生直後の栄養遮断下の生存期間を比較することで、出生直後の栄養遮断期間におけるオートファジーの必要性を明らかにする。

(2) 肝臓特異的にオートファジーを阻害した新生仔マウス(オートファジー阻害群)と対照群の新生仔マウスにおいて、出生直後の栄養遮断下の血液中栄養指標(糖、総蛋白、脂質等)を評価し、肝臓オートファジーが出生直後の血清代謝物構成に変化を与えるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肝臓特異的オートファジーノックアウト新生仔マウスの作成

動物の取り扱いと実験はすべて大分大学の動物倫理委員会のガイドラインに従って行われた。すべての実験プロトコルは、大分大学の遺伝子組換え安全委員会と動物倫理委員会に承認された。肝臓特異的オートファジー欠損マウスは、Cre-loxP システムを使用して生成した。我々は国立大学法人東京大学、水島昇先生の許諾を得て理化学研究所を経由して供給された Atg5-floxed (Atg5f/f) マウス (RBRC02975, Riken BioResource Research Center, Tsukuba, Ibaraki, Japan)²、および、Jackson 社から導入したトランスジェニック Albumin-Cre (Alb-Cre) マウス (003574, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)を使用した。ATG5flox マウスメスとホモ接合 AlbCre マウスオスを交配し第一世代を得た。第一世代メスを Atg5flox オスに戻し交配した。新生児は妊娠した第一世代メスを妊娠 18.5 日に帝王切開して得られた。4 種類の遺伝子型の新生児(肝臓特異的オートファジーノックアウトマウス、対照群(F1)ホモ接合 Atg5-floxed マウス、ヘテロ接合 ATG5-floxed マウス)が第 2 世代として誕生し、サンプリングに供した。

(2) 生存時間の観察及び、絶食 12 時間での標本採取

蘇生に成功した新生仔は出生時体重を 30 分齢で測定し、給餌せずに恒温槽でモニターした。22 時間を上限として生存時間を観察した。標本は飢餓負荷 12 時間(生後 12 時間)マウスで実施した。断頭により血液サンプルを採取した。4°C で 1~2 時間保存した後、血液サンプルを 5,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を 5,000rpm で 5 分間再灌流し、血清を得た。血清は-80 で保存した。生体組織は、4°C で開腹して摘出した。肝臓組織は 4%パラホルムアルデヒドで保存した。

(3) オートファジー活性の評価

オートファジー活性は肝臓組織の免疫染色で確認した。一次抗体として Atg5、p62、LC3B、-アクチンに対する抗体を一次抗体として使用した。視野当たりのドット数を計測した。

(4) 血清代謝物評価

代謝物評価は血清を誘導体化した後、GC-MS/MS を用いて実施した。内部標準としては 2-イソプロピルリンゴ酸を使用した。代謝物の測定は、Smart Metabolites Database Ver.2(島津製作所、京都、日本)を用いて実施した。ピーク同定は自動的に実行され、保持時間に基づいて手動でも確認した。

(5) 多変量解析

得られた各代謝物のピーク量は SIMCA バージョン 13.3(Umetrics、Umea、スウェーデン)で多変量解析した。直交部分最小二乗判別分析法(OPLS-DA)を用いて、肝臓特異的オートファ

ジー欠損新生仔群と対照群の代謝物構成が区別可能かどうかを判定した。

4. 研究成果

(1) 肝臓オートファジー欠損は出生体重と死亡率に有意差をもたらさない

肝臓特異的オートファジー欠損マウスの出生時体重 (1.179 ± 0.1645 [平均値 \pm SD]、 $n = 48$) は対照群 (1.201 ± 0.1352 [平均値 \pm SD]、 $n = 53$) とそれぞれ有意差を認めなかった。欠損マウスと対照群で生存率に有意差は無く、ほとんどが絶食環境において生後12時間までは生存し、以降、生存率が低下した(図1)。

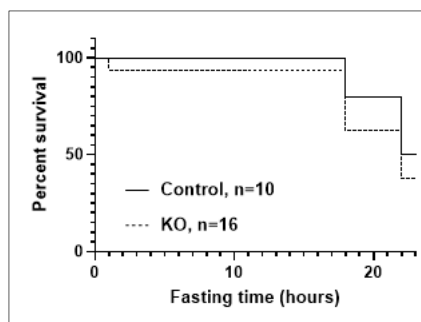


図1. 生存率曲線

(2) 飢餓負荷で肝臓特異的オートファジー欠損新生仔のオートファジー活性は低かった

オートファジー活性亢進を示唆する LC3B ドット増加は対照群で多い傾向、p62 ドット減少は対照群で顕著であった。肝臓特異的オートファジー欠損マウスは新生児であってもオートファジー活性に障害があることが確認された(図2)。

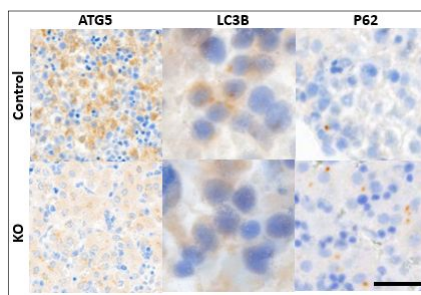


図2. 免疫染色

(3) 血清メタボロームは肝臓特異的オートファジー欠損新生仔と対照群で区別された

肝臓特異的オートファジー欠損新生仔と対照群の各血清代謝物検出量分布を多変量解析して得られた OPLS-DA モデルは、KO マウスの代謝プロファイルが対照マウスと分離されていることを示した(図3)。

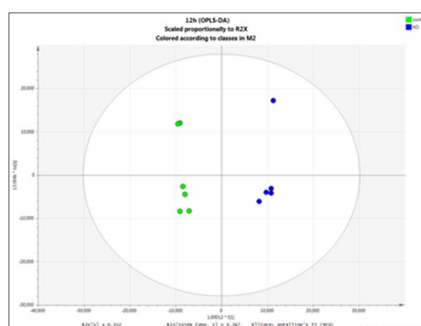


図3. OPLS-DA

結論として、出生直後の飢餓期における肝臓のオートファジー欠乏は、出生直後の飢餓期における生命維持に必須ではないものの、新生児肝臓オートファジーが血清代謝物構成に変化をもたらすことが明らかになった。肝臓のオートファジーは、出生直後の代謝恒常性の維持にある程度貢献し、その欠乏による血清代謝物構成の変化は、胎児および出生後の成長障害や神経障害をもたらす可能性もある。新生児の飢餓対応におけるオートファジーの役割を解明するためのさらなる研究の発展が望まれる。

謝辞

トランスジェニックマウスを提供くださった東京大学、水島昇先生に深謝いたします。

引用文献

1. Sekiguchi K, Miyahara H, Inoue M, Maeda T, Ihara K. The autophagy reaction in the human umbilical cord: a potential marker for estimating fetal nutrition and neonatal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 1-5 (2020).
2. Hara T, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889 (2006).

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮原 弘明 (Miyahara Hiroaki) (00457615)	愛知医科大学・付置研究所・講師 (33920)	
研究分担者	花田 俊勝 (Hanada Toshikatsu) (10363350)	大分大学・医学部・教授 (17501)	