

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500632

研究課題名 (和文) 胎児期低栄養による成人病発症への幹細胞機能異常の関与

研究課題名 (英文) Etiology of Adult Disease: Stem Cell Defect Caused by Poor Nutrition in the Womb

研究代表者

入部 雄司 (IRIBE YUJI)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：20348618

研究成果の概要(和文):今回、デキサメタゾンおよびラパマイシンを妊娠ラット母体に投与することにより、胎盤機能を低下させ子宮内胎児発育遅延(IUGR)モデルを作成した。仔ラット成長後の骨髄細胞における遺伝子発現解析により、骨髄前駆細胞の維持や遊走に関与すると考えられているプロテアーゼ類およびその関連遺伝子が有意に変動していた。生活習慣病、特に心臓血管疾患では血管内皮機能の障害がその病態の一つと考えられているが、血管内皮を修復、維持する細胞源である骨髄細胞の機能が胎児期の低栄養により成長後も影響を受けていることが示された。

研究成果の概要(英文):In this study, we have investigated the influence of malnutrition during fetal period on stem cell properties of adulthood. Two models of rat intrauterine growth retardation (IUGR), dexamethasone or rapamycin exposure were analysed for gene expression profile of offspring's bone marrow using microarray technology. As a result, protease gene expression, such as cathepsin K and granzyme B, which are indispensable for bone marrow cell migration, were altered significantly in both of IUGR models in common. This result indicates that malnutrition during fetal period may affect the function of stem cell niche in the adulthood bone marrow.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:総合領域

科研費の分科・細目:健康・スポーツ科学

キーワード:生活習慣病、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

出産時の児体重は、その後の児の発育状況や

健康に大きな影響を与えることが明らかとなっている。英国Southampton大学のDavid Barkerは、

胎児期低栄養の子宮内環境で生活習慣病素因が形成され、負の生活習慣が負荷されることで生活習慣病が発症すると言う「成人病(生活習慣病)胎児期発症説」を提唱した(Barker DJ, Osmond C, *Lancet*, 1986; 1:1077-8)。また彼らは英国 Hertfordshire 地方において約15700名を対象とした大規模な後向きコホート研究を行ない、出生体重と冠動脈疾患の大規模調査で、出生体重が低い程、冠動脈疾患による死亡率が高いことを報告した(Osmond C et al. *BMJ*, 1993 ; 307: 1519-24)。

一方、日本は先進国のなかで、平均出生体重が減少し、低出生体重児の出生頻度が増加している唯一の国と言われている。若年女性に見られる“やせ願望”とも言える過度の栄養制限による食習慣の乱れや不適切な栄養摂取が妊娠期間中にも実行されることが原因のひとつと考えられている。このことは近年の我が国における生活習慣病増加の原因が胎児期の低栄養を素因としている可能性が高いと考えられる。

胎生期の器官形成だけでなく成体における組織機能維持に幹細胞が関わっていることは広く知られている。成人の体内でも骨髄、小腸上皮、皮膚などで組織幹細胞として働いている。また最近、心臓や腎臓、神経などの終末分化を終えたと考えられてきた臓器にも組織幹細胞の存在が示唆されている(Beltrami, AP et al., *Cell* , 2003 ; 114:763 - 66, Anglani F, et al., *J Cell Mol Med*, 2004 ; 8: 474 - 87)。これらの幹細胞は組織障害に応じて、組織修復に関与していると考えられている。また骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) が末梢血中に0.01%存在し、血管内皮障害の修復や、動脈硬化への進展を防いでいる。そこで、「生活習慣病胎児期発症説」の新たな可能性として、胎児期の低栄養が組織幹細胞やEPC機能に変化を起こすことにより、成体になったときにこれらの修復担当細胞の機能失調が起きて、組織障害時の修復要求に対応できなくなると考えた。そ

こで、われわれは胎児期の低栄養による幹細胞における変化が生活習慣病発症の一因になるという仮説を提唱した。

2. 研究の目的

胎児期低栄養による生活習慣病発症の機序としては、動物実験などから p53 遺伝子の低メチル化による過剰発現に伴うアポトーシスの亢進(腎臓ネフロン数、膵臓 β 細胞の減少)や、メチオニン、葉酸欠乏による血中ホモシスチン濃度の増加による血管内皮細胞機能障害が報告されている(Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J, *Kidney Int.*, 2001; 59: 238 -45)。しかし、これらの臓器や細胞の器質的障害だけでは「生活習慣病胎児期発症説」のすべてを説明できていない。

そのため、我々は、胎児期低栄養による生活習慣病素因獲得の分子機序を同定するため、組織修復に関わる幹細胞、前駆細胞の中でも血管内皮機能の維持に重要な骨髄由来細胞における胎児期低栄養による影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胎児期低栄養動物モデルの検討

① 子宮内胎児発育遅延(IUGR)モデルラットの作成

IUGR 動物モデルとして妊娠動物の食餌制限、デキサメタゾン持続投与等が知られている。今回我々は、妊娠ラットへのデキサメタゾン投与モデルに加え、胎盤機能を抑制することが知られているラパマイシン持続投与においても検討を行った。

妊娠12日(母)ラットを以下のように3群に分け、浸透圧ポンプ(200 μ L/時)により生理食塩水、デキサメタゾン (200 μ g/kg/日)、ラパマイシン (50 μ g/kg/日)をそれぞれの群に1週間投与した。浸透圧ポンプはラット背部皮下にイソフルレン吸入麻酔下に挿入した。

②仔ラット体重測定

生後2ヶ月までのラット体重を定期的に測定した。

(2) 高塩食負荷

出生後4週からそれぞれ3群の仔ラットを更に2群に分け、正常食、高食塩食(8%NaCl食:内皮細胞傷害モデル)をそれぞれの群に1ヶ月間与え続けた。

(3) 骨髄細胞の遺伝子網羅的解析

2ヶ月齢ラットの骨髄細胞(バルク)を採取しトータル RNA を抽出した。GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array (Affymetrix 社)により網羅的遺伝子発現解析を行った。

データ解析は GeneSpring GX ソフトウェア (Agilent 社)にて行った。骨髄採取のためのラットは、各群からオス、メスにかかわらず無作為に n=3で選択した。非 IUGR・正常食群と比較し1.5倍以上の発現変化(増/減)のある遺伝子を抽出した。

4. 研究の成果

(1) 胎児期低栄養動物モデル

表1 仔ラットの体重変化(グラム)

日齢	コントロール	デキサメタゾン	ラパマイシン
0	6.23 ± 0.42 (n=25)	4.57 ± 0.46 * (n=24)	5.93 ± 0.27 * (n=14)
4	12.18 ± 0.85 (n=24)	6.90 ± 1.89 * (n=13)	11.37 ± 0.49 * (n=14)
9	21.75 ± 1.35 (n=24)	13.93 ± 3.21 * (n=11)	19.75 ± 0.83 * (n=14)
15	35.37 ± 1.98 (n=24)	24.22 ± 3.86 * (n=11)	31.25 ± 1.14 * (n=14)
20	54.37 ± 3.07 (n=24)	36.20 ± 4.62 * (n=11)	48.58 ± 2.69 * (n=14)
27	98.04 ± 7.23 (n=20)	68.94 ± 9.36 * (n=10)	87.45 ± 8.66 * (n=12)
35	163.51 ± 17.64 (n=20)	109.73 ± 36.90 * (n=10)	155.43 ± 19.25 (n=12)
40	208.95 ± 28.94 (n=20)	162.31 ± 18.95 * (n=10)	200.47 ± 31.37 (n=12)
45	241.42 ± 43.41 (n=20)	188.53 ± 24.93 * (n=10)	236.12 ± 45.33 (n=12)
50	273.36 ± 57.51 (n=20)	211.02 ± 24.93 * (n=10)	268.18 ± 45.33 (n=12)
58	331.08 ± 81.54 (n=20)	260.60 ± 51.76 * (n=10)	319.67 ± 78.13 (n=12)

平均±SD, *p<.05, 離乳日(日齢25)以降 オス/メス同数で測定

今回の検討においては、デキサメタゾン投与群において出生後、半数以上の仔ラットが死亡した。投与濃度がやや高かったことが伺える。そのため、表1に示すように IUGR 群の体重が出生後しばらくして非 IUGR 群に追いつく catch-up 現象はデキサメタゾン群においては認められなかった。一方、ラパマイシン群では約 1 ヶ月齢で catch-up 現象を認めた。

(2) 胎児期デキサメタゾン、ラパマイシンの

仔ラット成長後における遺伝子発現への影響

表2-1 デキサメタゾン投与(母体)による

2ヶ月齢仔ラット骨髄の遺伝子発現変化(発現増加遺伝子)

genbank	genesymbol	Fold induction
BC078793	Ctsk	2.23
U67911	Mcpt8	2.15
	Cd3g	2.02
	RGD1561932_predicted	1.81
	Chrdl2_predicted	1.71
	RGD1309085_predicted	1.68
K00160		1.61
	Stfa21l	1.60
X78896		1.59
	RGD1563110_predicted	1.58
BC089917	Atp6v0d2	1.57
BC082003	LOC499980	1.55
M83745	Pcsk1	1.51
	RGD1563278_predicted	1.50
AY359280	Lilrb4	1.50

表2-2 デキサメタゾン投与(母体)による

2ヶ月齢仔ラット骨髄の遺伝子発現変化(発現減少遺伝子)

genbank	genesymbol	Fold reduction
BC089053	Lcn2	3.18
	LOC686289 LOC690285	3.06
BC127475	Gzmb	2.30
	Ptpns1l3_predicted	2.25
BC092580	RGD1359202	2.18
	Lgals5	2.09
U67915	Mcpt1	2.07
BC061740	Ceacam1	1.97
	RGD1564936_predicted	1.92
BC058476	Lgals1	1.83
	Cldn10_predicted	1.73
	LOC692042 LOC678805	1.72
	Rpl12_predicted	1.69
	Adamts13_predicted	1.66
	Mcpt2	1.66
AF309948	C7	1.65
BC103477	Ubc	1.59
BC086337	MGC105649	1.58
	LOC294844	1.55
J00771	RGD1565230_predicted	1.55
	Vars2	1.54
	Mcpt1l3	1.51
D86041	ATP8 COX3	1.50

表 3-1 ラパマイシン投与(母体)による
2ヶ月齢仔ラット骨髄の遺伝子発現変化 (発現増加遺伝子)

genbank	genesymbol	Fold induction
BC086979	Oas1a	4.46
BC079101	Usp18	3.43
	LOC689244 LOC288419	3.27
	G1p2_predicted	3.14
BC104686	Irf7	3.14
BC160819	Oas1i	3.00
	Ifit1	2.98
AF068268	Oas1b	2.70
	Dsg3	2.54
AF168795	Slfn3	2.48
BC079079	Ifit3	2.44
AY227756	Oas1l	2.36
AY237116	Oas2	2.31
M58590	Klkb1	2.30
	LOC688296	2.26
	RGD1562462_predicted	2.25
BC085921	Herc6	2.19
	RGD1564265_predicted	2.12
	RGD1563091_predicted	2.09
EF158003	Fcgr3a	2.05
BC098733	LOC362795	2.03
BC099784	Mx1	2.01
BC061992	Cldn1	1.98
BC060548	Ifi271	1.98
BC093399	Ly49i9	1.97
	LOC689299	1.91
BC162039	Pcp4l1	1.86
	Rtp4_predicted	1.85
BC099808	Mx2	1.84
	LOC679206	1.84
U56863	Klra5	1.82
	Dhx58	1.82
BC088420	Ifi44	1.80
	RGD1566132_predicted	1.79
U67911	Mcpt8	1.79
BC083845	Errf1	1.78
BC078756	Cer5	1.77
	Lad1_predicted	1.77
	LOC688592 LOC503327 LOC365506	1.73
BC088433	Phf11	1.72
AY359280	Lilrb4	1.70
BC098830	Clec4a1	1.69
AY230746	Oas2	1.67
BC079165	Ly6e	1.67
	Serp1b11_predicted	1.65
	LOC363695	1.65
	RGD1562647_predicted	1.64
BC084685	Syt15	1.64
AY649840 AY	Ly49s7	1.64
	RGD1564998_predicted	1.63
	Chrdl2_predicted	1.63
BC087678	Tor3a	1.62
	Parp14	1.61
U27562	Sparcl1	1.61

表 3-2 ラパマイシン投与(母体)による
2ヶ月齢仔ラット骨髄の遺伝子発現変化 (発現減少遺伝子)

genbank	genesymbol	Fold reduction
	RGD1564936_predicted	4.45
D86041	ATP8 COX3	3.64
	RGD1564318_predicted	3.41
	Ptpps1l3_predicted	2.38
BC092592	Igha_mapped	2.38
U30831	Syt17	2.28
BC127475	Gzmb	2.14
BC160870	Igha_mapped	1.80
BC098746		1.75
AY158661	LOC366772	1.72
BC078853	Prps1	1.66
BC059149	Ldhd	1.65
	RGD1560900_predicted	1.61
BC092584	Ighg	1.60
BC092586 AY158661	RGD1359202 LOC366772	1.58
	Dusp10_predicted	1.58
	Ly6g6f	1.57
	Slc25a45	1.56
BC081893	Armcx6	1.55
BC081985	LOC361990	1.55
BC081872	Ca5b	1.55
	Syde2	1.55
BC098746		1.54
	LOC690331	1.54
BC107452 BC091272	Igh-1a IgG-2a	1.53
BC082003	LOC499980	1.52
	Fis1	1.52
BC099125	Neil1	1.52
	Senp17	1.52
AY539935	Rnf135	1.51
	RGD1564151_predicted	1.51
BC127500	Rab3ip	1.51
U65916	Ank2	1.50
BC086533	Cfl1	1.50

デキサメタゾンおよびラパマイシンによる IUGR モデルにおいて成長後の骨髄細胞遺伝子発現プロファイルで共通して認められたことはセリンプロテアーゼ (Mcpt8、Gzmb) やシステインプロテアーゼ (Ctsk) の有意な変化であった。

(3) 高食塩食による骨髄細胞の遺伝子変化

表 4 高塩食による2ヶ月齢仔ラット骨髄の遺伝子発現変化 (発現増加遺伝子)

genbank	genesymbol	Fold induction
X78896		2.51
	Serp1b11_predicted	2.24
BC158674	similar to Ly6-C antigen gene	1.93
M25804	Nr1d1	1.86
X78894		1.77
X55180		1.67
	similar to Ly6-B antigen gene	1.67
	similar GDD1	1.65
	RGD1561932_predicted	1.60
BC061992	Cldn1	1.59
AJ007291	Park7	1.56
	Myl1	1.55
BC161973	Fbln1_predicted	1.52
BC070502	Rab9	1.50

我々は当初、IUGR モデルに高食塩食を負荷することにより、血管内皮にストレスを誘導できると考えた。しかしながら、今回の検討では IUGR ラット骨髄細胞における高食塩食負荷において、非 IUGR 群と比較して有意な遺伝子変化は認められなかった。表 4 に非 IUGR ラット骨髄細胞における高食塩食による発現増加遺伝子を示す。

「考察」

IUGR モデルの成長後の骨髄細胞遺伝子発現プロファイルにおいてプロテアーゼ遺伝子の有意な発現変化が認められた。特にカテプシン K (Ctsk) は骨髄ニッチにおける幹細胞の係留をはずし遊走を促進させる酵素である。また、グランザイム B (Gzmb) は T 細胞や NK 細胞等の細胞傷害活性を有する細胞が分泌する酵素であるが、近年この酵素もカテプシン K 同様、骨髄ニッチにおいて幹細胞遊走に関与することが示されている。骨髄幹細胞、特に血管内皮前駆細胞は必要時に血管内皮修復のため骨髄から遊走する。一方、骨髄ニッチは幹細胞を係留し、その幹細胞性を涵養している。そのため、カテプシン K 等の酵素活性は組織修復には必要だが、その活性異常は幹細胞維持には負にも作用すると考えられる。今回、IUGR モデルにおける成長後骨髄においてカテプシン K 遺伝子の発現増加とグランザイム B 遺伝子の発現減少が認められたが、今後はこれらの遺伝子発現変化と生活習慣病病態との因果関係を解明したい。

一方、前述のように、IUGR モデルに対する高食塩食負荷では血管内皮ストレスを誘導できなかつた。今後は食塩感受性ラット等を用いた IUGR モデルを作成し、胎児低栄養と内皮障害誘導時の遺伝子発現解析および病態との更なる因果関係を検討したい。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入部 雄司 (IRIBE YUJI)
日本大学・医学部・研究員
研究者番号：20348618

(2) 研究分担者

福田 昇 (Fukuda Noboru)
日本大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号：40267050

松本 太郎 (Matsumoto Taro)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：50366580

野呂 知加子 (Noro Chikako)
日本大学・生産工学部・准教授
研究者番号：80311356

(3) 連携研究者

なし