

機関番号 : 37116

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20790779

研究課題名 (和文)

胎児期・出生後のストレスが脳内摂食調節機構に与える影響に関する研究

研究課題名 (英文)

Developmental changes of neuromedin U and galanin-like peptide gene expressions in the rat pituitary : an analysis by *in situ* hybridization histochemistry

研究代表者

久保和泰 (KUBO KAZUYASU)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号 : 00412643

研究成果の概要 (和文) :

下垂体後葉の GALP は出生当日から検出され新生児期に成人レベルまで到達した。対照的に視床下部弓状核の GALP は離乳期と思春期の期間間で著しく増加した。下垂体後葉の GALP は視床下部弓状核の GALP と異なり成人で行われている血漿浸透圧とホルモン調節に関与していることが示唆された。そして早期新生児にも比較的成熟した体液の浸透メカニズムに重要な役割を担っていると推察された。

下垂体前葉での NMU mRNA は出生当日から比較的高いレベルが検出された。出生した児の視床下部下垂体副腎軸の活性化と子宮内から子宮外への環境変化に伴うストレス応答によるものと考えられた。ストレスに対する低反応期間は出生後4日から14日と言われており NMU mRNA の発現が生後8日で減少する時期と一致している。その時期の視床下部下垂体副腎軸の抑制により一時的に NMU mRNA が低下したと推察された。生後14日目以降、下垂体前葉の NMU mRNA は徐々に増加しており、視床下部下垂体副腎軸の成熟に伴う生後発達に関連する可能性がある。

研究成果の概要 (英文) :

Development of GALP in the PP

The present study first demonstrated that the GALP mRNA in the PP exhibited from the day of birth and rose to adult level during neonatal period, while that in the ARC was expressed from late neonatal period and markedly increased between weaning and pubertal period. The regulatory mechanism of the GALP in the PP might be different from that in the ARC during postnatal development. The GALP system in the PP develops in a relatively mature, although that in the ARC is still immature in the neonatal period.

The GALP in the PP is important in the regulation of plasma osmolality and neurohypophysial hormones in the adult animals. Development of GALP in the PP may be associated with development of the osmoregulatory mechanism of the body fluid, which develops in a relatively mature even in the early neonates.

Development of NMU in the AP

We also first demonstrated that the NMU mRNA in the AP was detected at relatively high level at the day of birth. Birth is accompanied with the infant's HPA axis activation in response to stresses with the transition from intra-uterine to extra-uterine environment. This high level of NMU expression at the time of birth may have a role in the HPA axis activation to adapt the environmental changes.

During development, the HPA axis is normally suppressed between postnatal day 4 and 14, which is so-called "stress-hyporesponsive" period (SHRP). The decrease in the NMU mRNA expression at postnatal day 8 might be responsible to the inhibition of the HPA axis activity during SHRP. After postnatal day 14, the NMU mRNA in the AP gradually increased throughout postnatal development. It might be related with the maturation of HPA axis during postnatal development.

In conclusion, development of the NMU and GALP, which showed different patterns in each lobe in pituitary, may be associated with the specific functional significance in each peptide during postnatal development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：脳内摂食調節機構、ストレス、生活習慣病、視床下部

1. 研究開始当初の背景

生体がストレスを受けると、脳を介して血圧・心拍の変化や気分・行動の変容など様々な生体反応が引き起こされる。生体のストレス反応のうち、自律神経を介した生体反応や内分泌系の生体反応は、自律神経と内分泌系の統合中枢である視床下部を介して引き起こされていることが知られている。ストレスによる摂食に対する影響は、ストレスに対する生体反応が視床下部での摂食調節機構にも影響を及ぼすことが重要な要因である。近年、視床下部における摂食促進系や摂食抑制系が形成する摂食調節機構の複雑なネットワークの解明が進んでおり、新規の生理活性物質やその受容体の発見が相次いでいる。しかし出生後の摂食調節機構の発達様式やその調節因子に関しては未解明の領域である。

小児科領域において生活習慣の変化にともない糖尿病、肥満症、高脂血症などのいわゆる生活習慣病の増加が目玉される。生活習慣病の急速な増加の背景には、現代社会での生活習慣の変化がストレスとして作用し、子宮内あるいは新生児期のホルモン環境の変化として摂食行動やエネルギー代謝を調節する脳内機構の出生後発達に影響を与え、恒久的な異常を来たすことが考えられる。胎児期や新生児期に受けたストレスやホルモン環境の変化がその後の摂食調節機構の発達に対して恒久的な異常を引き起こすそのメカニズムの解明は、現代もっとも深刻で重要な課題である生活習慣病の小児期での予防、治療に大きく貢献すると考えられる。

視床下部は脳底部に位置する小さな部位であるが、生理機能の異なった多くの神経核が密集しており、ストレスによる様々な生体反応を引き起こす大変重要な部位である。ストレスが一過性の食欲低下・食欲亢進と慢性的な拒食・過食の原因もしくは誘因となることは経験的にもよく知られている。現代の様々な生活環境の中でのストレスが胎児期や新

生児期に与える影響を視床下部やその周辺領域の生理活性物質やその受容体を通して評価し、将来誘発される生活習慣病の予防に最も大切な時期を検討することで、社会的にも貢献できると考えている。

2. 研究の目的

GALP は最近、galanin 受容体の内因性リガンドとして発見され、視床下部弓状核と下垂体後葉に発現している。視床下部 GALP は摂食調節、エネルギー代謝に関与すると考えられる。下垂体の GALP は最近の研究で、下垂体後葉の GALP mRNA の増加は脱水による浸透圧刺激に誘発されることを示している。したがって、下垂体後葉の GALP は血漿浸透圧とホルモンの調節に関与するとされている。

Neuromedin U (NMU) は胃内に存在し摂食量を減らすと報告された、神経ペプチド、交感神経系をアクティブにしてエネルギー消費量を増やす。下垂体の NMU は下垂体前葉で発現する。NMU は、視床下部での CRH 合成をアクティブ化し、脳下垂体前葉、副腎で ACTH およびコルチコステロンの放出を刺激し、ストレス応答性を規制する視床下部下垂体副腎 (HPA) 軸の活動で重要な役割を持つことを示唆する。しかし、下垂体における GALP と NMU の生後発達過程における生理的役割知られていない。我々の今回の研究では、ラット下垂体の NMU と GALP の遺伝子発現を生後 1 日目から 60 日目の発達的变化を in situ ハイブリダイゼーションを使用して検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物

妊娠末期の SD ラットを 23-25°C のプラスチック製のケージ内に収容した。12 h 明るく (07 時 00 分-19: 00) 12 h 暗く (19 時 00 分-07: 00) して食べ物と水の制限は行わなかった。

(2) 発達

生後 1、8、14、21、40、60 日のラットを使用した (6 男女とも 6 検体ずつ)。

(3) in situ ハイブリダイゼーション
クリオスタットで 12 mm にスライスした脳切片をスライド上に置く。GALP と NMU を 35 S でラベリングするためにプロンプトは (TdT) と [35 s] dATP を使用してラベリングを行った。4% のホルムアルデヒドで 5 分固定し 0. 25% 酢酸と 0. 1 M トリエタノールアミンで 10 分脱水し、クロロホルムで脱脂される。37°C で一晩孵化した後、45 ml 交配バッファー Nescofilm (バンドー化学、大阪) coverslip の下で実施されました。1 H 1xSSC (150 mM NaCl、クエン酸ナトリウム 15 mM) 55 °C での 4 回洗浄、常温で 2 回洗浄、さらに 1 h 1x SSC 室温で洗い流された。2 週間暗室でフィルムに感査させた後、オートラジオグラフィ (Hyperfilm、アマシャム、ドル、英国) で GALP、NMU の発現を集積し、結果の画像をイメージング MCID (イメージング株式会社、オンタリオ州、カナダ) を使用して、コンピューターの定量分析を行った。平均濃度は、同時に集積された マイクロスケールとの比較 (アマシャム、ドル、イギリス) を測定した。

GALP のプロンプトシーケンス: 5' TTC TCA TAG TCT GGA GGC AGG TGG AAG GGT TCC CCA CTG CTA GTG-3' ラット GALP ヌクレオチド 607-651 に相補的な塩基、

5' AAG GCT ATG AGA AAC ACG GCC ACG TAG GCC GCG ATG AGA ACC CAC-3' ラットの GALP ヌクレオチド 703-747 に相補的な塩基

5' TGC TGA GCT TCC AGT TGC TCT GGT CGC TTC CAG TTC CGC ACC-3' ラット GALP ヌクレオチド 1327-1371 に相補的な塩基
以上 3 つのシーケンスから構成された。

NMU のプロンプトシーケンス: 5'-TTC TGG TGG TAA TCT TTG AGG CGA TAT TGG CGT ACC TCT GCA AGC-3'、ラット NMU ヌクレオチド 1327-1371 の相補的な塩基で構成された。

(4) 統計分析

標準偏差を用いて計算され、One-way Analysis of Variance (ANOVA) を使用して、データの分析を行なった。統計的有意差 P 値は < 0. 05 で設定された。

4. 研究成果

(1) 視床下部弓状核の生後発育における GALP は生後 1 日目では GALP mRNA の遺伝子発現を認めなかった。生後 8 日目から検出された。GALP mRNA は生後 14 日から 40 日の間で著しく増加した。

(2) 下垂体後葉の GALP mRNA

対照的に下垂体後葉の GALP 遺伝子発現は生後 1 日目から検出された。下垂体後葉の GALP mRNA は生後 1 日から 8 日の間で著しく増加し、8 日から 60 日までは有意な変化を認めなかった。

(3) 下垂体前葉の NMU mRNA の生後発育における変化は NMU 遺伝子発現において生後 1 日目で中程度のレベルで検出され、生後 8 日で減少する。生後 14 日から徐々に生後発育に沿って増加した。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kawagoe R, Yamamoto Y, Kubo K, Dobashi K, Asayama K, Shirahata A, Ueta Y. Postnatal development of galanin-like peptide mRNA expression in rat hypothalamus. *Regulatory Peptide* 145 133-140 2008 (査読 有)

2. Araki S, Dobashi K, Kubo K, Kawagoe R, Yamamoto Y, Kawada Y, Asayama K, Shirahata A, Prevalence of 'obesity disease' and 'metabolic syndrome' in obese pediatric outpatients at the University Hospital of Occupational and Environmental Health J UOEH 30 309-319 2008 (査読 有)

3. Araki S, Dobashi K, Kubo K, Kawagoe R, Yamamoto Y, Kawada Y, Asayama K, Shirahata A.

Plasma visfatin concentration as a surrogate marker for visceral fat accumulation in obese children *Obesity* 16 384-388 2008 (査読 有)

[学会発表] (計 26 件)

1. 石井雅宏、山本幸代、後藤元秀、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、下野昌幸、楠原浩一。新しい骨質マーカーとしての低分子カルボキシル化オステオカルシンの重症心身障害児(者)における検討。九州医師会医学学会総会。2010年11月13日。鹿児島(城山観光ホテル)

2. 後藤元秀、山本幸代、斎藤玲子、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、楠原浩一、土橋一重、神代万壽美、有馬透。高 TG 血症による急性膵炎を発症した二例。第 37 回日本小児栄養消化器肝臓学術総会。2010 年 10 月 9 日。高松(かがわ国際会議場)

3. 後藤元秀、河田泰定、山本幸代、石井雅宏、荒木俊介、川越倫子、久保和泰、楠原浩一、鳴海覚志、長谷川奉延。甲状腺受容体 β にヘテロ接合型遺伝子変異を認めた TSH 不適切分泌症候群 (SITSH) の 7 歳女児例。第 83 回日本小児内分泌学会。2010 年 10 月 7 日。大阪(大阪市中央公会堂)

4. 河田泰定、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、山本幸代、楠原浩一。腹腔鏡にて性腺摘出術を行った X/XY 混合性性腺異形成症の 2 例。第 83 回日本小児内分泌学会。2010 年 10 月 7 日。大阪(大阪市中央公会堂)

5. 石井雅宏、山本幸代、後藤元秀、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、下野昌幸、楠原浩一. 重症心身障害児(者)における新しい骨質マーカーとしての低分子カルボキシル化オステオカルシンの検討. 第83回日本小児内分泌学会. 2010年10月7日. 大阪(大阪市中央公会堂)
6. 河田泰定、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、山本幸代、楠原浩一、鳴海覚志、長谷川奉延. 早発乳房精査を契機に発見された甲状腺ホルモン不応症の一例. 第10回日本内分泌学会九州地方会. 2010年8月27日. 鹿児島(鹿児島大学鶴陵会館)
7. 後藤元秀、土橋一重、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、山本幸代、朝山光太郎、楠原浩一. 肥満小児における血中脳由来神経栄養因子の血中レベルとアディポサイトカインとの関連性. 第113回日本小児科学会学術総会. 2010年4月23日. 盛岡(盛岡市民文化ホール)
8. 斉藤玲子、山本幸代、後藤元秀、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、楠原浩一. 当科内分泌外来での幼児肥満における肥満症とメタボリックシンドローム(MS)の頻度と特徴. 日本小児科学会福岡地方会. 2010年4月10日. 福岡(九州大学百年記念講堂)
9. Kawada K, Araki S, Kawagoe R, Kubo K, Yamamoto Y. Longitudinal study of thyroid function in girls with Turner syndrome. 14th International Congress of Endocrinology 2010. 2010年3月26日. 京都(京都国際会議場)
10. Kubo K, Yamamoto Y, Kawagoe R, Gotoh M, So M, Araki S, Kusuhara K. Developmental changes of neuromedin U and galanin-like peptide gene expressions in the rat pituitary: an analysis by *in situ* hybridization histochemistry. 14th International Congress of Endocrinology 2010. 2010年3月26日. 京都(京都国際会議場)
11. Yamamoto Y., Kubo K., Kawagoe R., Gotoh M., So M., Araki S., Kusuhara K. Postnatal development of neuromedin U and galanin-like peptide gene expressions in the rat pituitary: an analysis by *in situ* hybridization histochemistry. Neuroscience 2009, the Society's 39th annual meeting. 2009年10月19日. Chicago, USA (Chicago Convention Center)
12. 荒木俊介、山本幸代、後藤元秀、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、楠原浩一、朝山光太郎. 肥満小児における脳由来神経栄養因子(BDNF)の血中レベルとアディポサイトカインレベルとの関連性. 第43回日本小児内分泌学会. 2009年10月2日. 宇都宮(栃木県総合文化センター)
13. 久保和泰、山本幸代、川越倫子、後藤元秀、荒木俊介、土橋一重、楠原浩一. ラット視床下部における Nesfatin-1 遺伝子発現動態の検討—生後発達過程での発現部位特異的な生理的変動—第43回日本小児内分泌学会. 2009年10月2日. 宇都宮(栃木県総合文化センター)
14. 石井雅宏、山本幸代、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、下野昌幸、楠原浩一. 長期臥床状態の重症心身障害児(者)における骨塩量、骨代謝マーカーの検討. 第43回日本小児内分泌学会. 2009年10月3日. 宇都宮(栃木県総合文化センター)
15. 河田泰定、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、山本幸代、土橋一重、酒井道生、白幡聡、楠原浩一、野田正紀. 慢性特発性血小板減少性紫斑病を合併した21水酸化酵素欠損症の一例. 第43回日本小児内分泌学会. 2009年10月3日. 宇都宮(栃木県総合文化センター)
16. 川越倫子、山本幸代、久保和泰、荒木俊介、宗まりこ、土橋一重、楠原浩一. ラット視床下部 Nesfatin-1 遺伝子発現動態の検討—生後発達に伴う発現部位特異的な生理的変動—. 第9回内分泌学会九州地方会. 2009年8月29日. 北九州(産業医科大学ラマツィーニ会館)
17. 河田泰定、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、山本幸代、土橋一重、楠原浩一. 尿糖陽性で発見された幼児糖尿病の一例. 第9回内分泌学会九州地方会. 2009年8月29日. 北九州(産業医科大学ラマツィーニ会館)
18. 山本幸代、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、白幡聡、鳴海覚志、長谷川奉延. 新生児マススクリーニングで発見されなかった PAX-8 遺伝子異常による甲状腺機能低下症の1家系. 第82回日本内分泌学会. 2009年4月23日. 群馬(群馬県民会館)
19. 川越倫子、山本幸代、久保和泰、宗まりこ、土橋一重、白幡聡. 生後発達に伴うラット視床下部 Nesfatin-1 遺伝子発現動態の検討—発現部位特異的な生理的変動—. 第82回日本内分泌学会. 2009年4月23日. 群馬(群馬県民会館)
20. 石井雅宏、山本幸代、斉藤玲子、千手絢子、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、下野昌幸、土橋一重. 長期臥床重症心身障害児における骨代謝マーカーおよび骨塩量の検討. 九州小児内分泌談話会. 2009年2月7日. 福岡(三鷹ホール)
21. Yamamoto Y., Kawagoe R., So, M., Kubo K., Dobashi K., Shirahata A., Region-specific changes the Nesfatin-1 gene expressions in rat hypothalamus during postnatal development Neuroscience 2008, the Society's 38th annual meeting

2008年11月19日 DC, USA (DC Convention Center)

22. 山本幸代、川越倫子、宗まりこ、久保和泰、荒木俊介、土橋一重、白幡聡. 胎児期からの高脂肪食負荷はラット視床下部での galanin-like peptide 遺伝子発現の出生後発達に伴う生理的変動に影響を与える. 第29回日本肥満学会. 2008年10月17日. 大分 (iichiko 総合文化センター)

23. 久保和泰、山本幸代、川越倫子、荒木俊介、土橋一重、白幡聡. 母乳栄養からの完全離乳後に自然軽快した高コレステロール血症の1例. 第35回日本小児栄養消化器肝臓学会. 2008年10月25日. 東京 (アキバホール)

24. 重松玲子、山本幸代、久保和泰、川越倫子、土橋一重、下野昌幸、白幡聡. 低血糖を契機に下垂体低形成による下垂体前葉機能不全が診断された18p-症候群の1例. 第42回日本小児内分泌学会. 2008年10月3日. 米子 (米子コンベンションセンター)

25. 荒木俊介、山本幸代、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、白幡聡. マスクリーニングで発見されなかったPAX-8遺伝子異常による甲状腺機能低下症の1家系. 第8回日本内分泌学会九州地方会. 2008年月8月30日. 長崎 (長崎大学良順会館)

26. 山本幸代、川越倫子、荒木俊介、久保和泰、土橋一重、白幡聡. ラット視床下部でのガラニン様ペプチド遺伝子の発現動態-生後発達および生後早期からの高脂肪負荷が与える影響. 第81回日本内分泌学会学術総会. 2008年5月17日. 青森 (青森市文化会館)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保和泰 (KUBO KAZUYASU)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：00412643