

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09666

研究課題名(和文) 妊婦のエネルギー摂取不足に起因する成長後の児の脂肪肝発症リスク軽減を目指して

研究課題名(英文) Toward Reducing the Risk of Fatty Liver Syndrome in Post-Growth Infants Caused by Undernutrition in Utero

研究代表者

幸村 友季子 (Kohmura, Yukiko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80537415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期低栄養環境に引き続くcatch up growthによる組織慢性炎症の増悪に関するメカニズムとして小胞体ストレスに着目し成獣期に小胞体ストレス緩和剤Tauroursodeoxycholic acid(TU)を投与し、脂肪重量が有意に減少した。脂肪組織のマイクロアレイ解析を行い胎生期低栄養の有無と胎生期低栄養におけるTU投与の有無により発現変化した遺伝子群のエンリッチメント解析では両者に共通した、炎症に関わる4つのGene Ontology(GO)を同定した。4つのGOに含まれる遺伝子群の発現は胎生期低栄養とTU投与で相反する変化を認めた。M 数は胎生期低栄養で増加しTU投与で減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス動物モデルの解析から、胎生期低栄養と出生後のcatch upにより、脂肪組織に炎症に関わる一群の遺伝子発現の変化ならびにマクロファージの集簇が明らかとなった。二次胆汁酸であるTauroursodeoxycholic acid が、プログラムされたMetaflammationを改善する可能性が指摘された。Developmental Origins of Metaflammationという新規視点から研究の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on endoplasmic reticulum stress as a mechanism involved in the exacerbation of chronic inflammation in tissues due to catch-up growth following prenatal malnutrition, and administered Tauroursodeoxycholic acid (TU), an endoplasmic reticulum stress reliever, in adult animals, and fat weight was significantly reduced. Microarray analysis of adipose tissue identified four Gene Ontologies (GOs) related to inflammation, which were common to both hypofertilization and TU administration. M counts were increased by prenatal malnutrition and decreased by TU administration.

研究分野：DOHaD

キーワード：DOHaD 慢性炎症 metaflammation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

疫学研究から、母体のエネルギーで摂取不足による胎生期低栄養 (**Under Nutrition: UN**) 環境に引き続き、乳児期において急速に成長 (**Rapid infantile growth: RG**) すると、成人期の肥満や代謝異常などのメタボリックシンドローム (**MS**) 発症のハイリスク群となることが報告されている。しかし、具体的なメカニズムは明らかではない。現在日本において、若年女性のやせ、妊婦の低栄養の現状が明らかとなり、それによる出生体重減少の可能性が指摘されている。一方、現代生後は飽食の環境にさらされるというミスマッチが生じている。**DOHaD** の視点から、日本の将来世代の健康障害を懸念され、**2018** 年の **Science** 誌 (**Normile D. Science, 2018**) にも取り上げられ、社会的に大きな問題となっている。将来世代の **MS** 発症リスクの低減のため、若い世代のエネルギー摂取不足の改善とともに、**MS** 発症のメカニズムを解析することにより、先制医療のターゲットを探索することが喫緊の課題である。

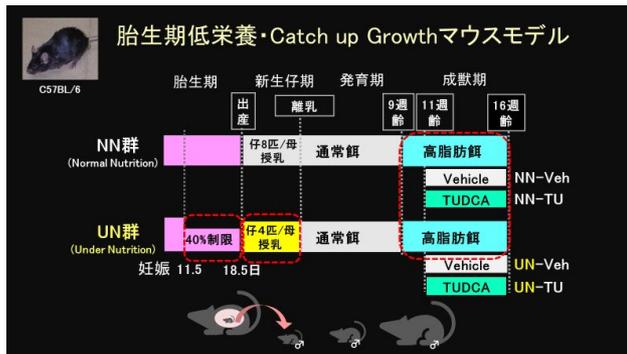
## 2. 研究の目的

我々の研究グループでは、これまで、母獣摂餌制限による胎生期低栄養マウスモデルを作成し研究を行ってきた。産生仔の生後の **catch up** 率が高いと、成獣期における脂肪蓄積の増加およびマクロファージ浸潤による組織炎症 (**Metaflammation**) が惹起されていることを報告してきた。また、肝臓組織において肝脂肪変性の増悪、マクロファージ浸潤の増加を認めた。この変化において小胞体ストレスに着目し、小胞体ストレス緩和剤である二次胆汁酸 (**Tauroursodeoxycholic acid: TU**) を投与することにより肝脂肪変性が改善することを報告してきた。**DOHaD** の視点から **Metaflammation** を惹起する変化が胎児期にプログラミングされ、成人期の **MS** 発症のリスクが形成されるという可能性を想定し「胎生期低栄養に引き続く生後の **catch up growth** は児の組織 **Metaflammation** のリスクをプログラミングする」という仮説のもと胎生期低栄養-**catch up** 促進マウスモデルを用い、検証を行うこととし、**UN** 環境に引き続き、出生後の授乳期に急速な成長を経験すること並びに **TU** 投与の有無により、脂肪組織において遺伝子発現の網羅的解析を行いその特異的なプロファイルを検討し、メカニズムの解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

浜松医科大学動物実験委員会 (承認番号: **H20-014**) の承認のもと、**C57BL/6** 妊娠マウスを自由摂餌 (**ad libitum: AD**) 群と摂餌制限 (**caloric restriction: CR**) 群に分け、それぞれ正常栄養 (**normal nutrition: NN**) 群と **UN** (**under nutrition: UN**) 群とした。**CR** 群は妊娠 **11.5** 日から **18.5** 日まで母獣の摂取カロリーを **AD** 群の **40%** 減らして給餌した。出産後すぐに **1** 母

獣あたりが授乳する産生仔の匹数を、**NN 群は 8 匹**、**UN 群は 4 匹**とし、急速な成長を促した。雄マウスを対象とし、それぞれの産生仔に **9 週齢から 16.5 週齢まで 60%の脂肪を含んだ高脂肪餌 (HFD)** を与えた。また、**11 週齢から 16.5 週齢まで、vehicle (Veh) または TU** を経口投与する群に分け、**NN-Veh 群、NN-TU 群、UN-Veh 群、UN-TU 群の 4 群**に分けた(図 1)。

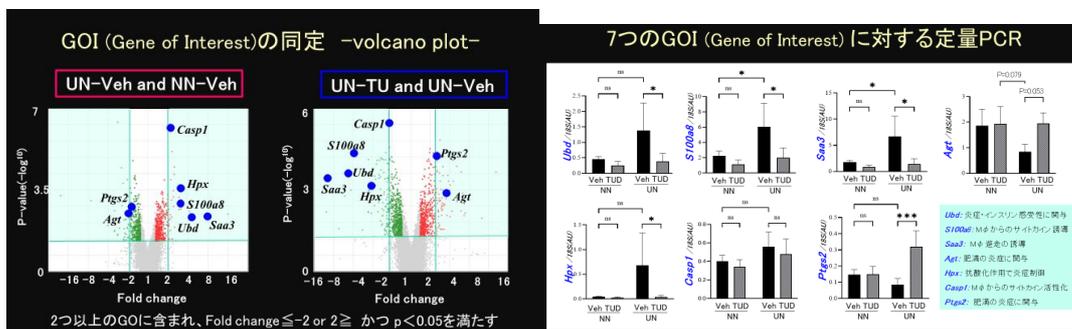
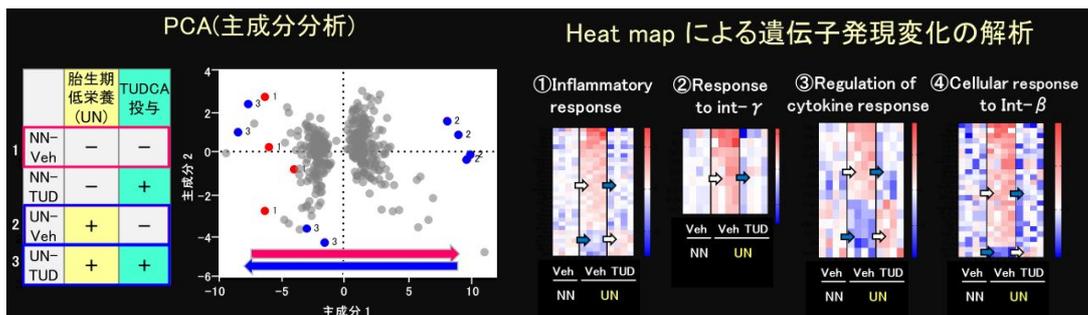
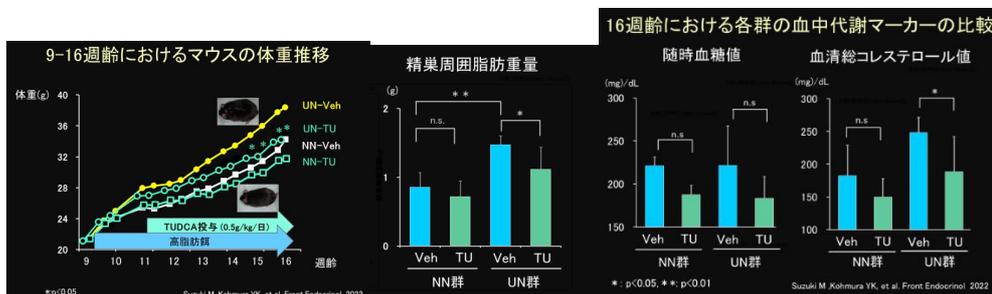


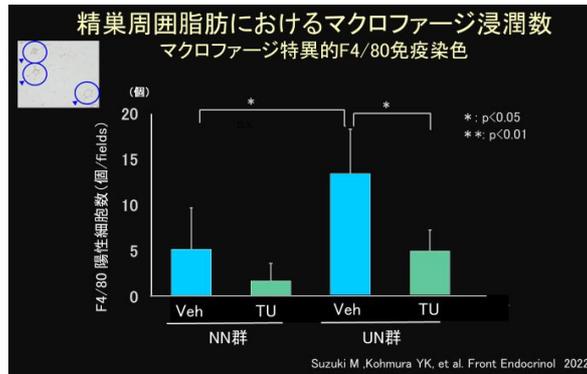
**16.5 週齢**のマウスから血液を採取し、総コレステロール、血糖値を測定した。精巣周囲脂肪を採取し、精巣周囲脂肪組織のマイクロアレイ解析を行い、**fold change** のカットオフ値および **p** 値から変動遺伝子を抽出した。遺伝子リストから **2** つの比較群 (**NN-Veh vs UN-RG-Veh**、**UN-Veh vs UN-TU**) におけるエンリッチメント解析を実施し、**7** つの興味深い遺伝子 (**Gene of interest: GOI**) を抽出した。また、**NN-Veh**、**UN-Veh**、**UN-TU** 群の遺伝子リストにおけるヒートマップ作成および主成分分析を行った。各群の精巣周囲脂肪において、**7** つの **GOI** 遺伝子発現を定量 **PCR** 法で測定し比較検討した。脂肪組織において、マクロファージ特異的 **F4/80** 免疫染色を施行し、平均陽性細胞数を **4** 群間で比較した。

#### 4 . 研究成果

産生仔の平均体重は、離乳までは **UN 群の方が NN 群より有意に高値 ( $p < 0.01$ )**であったが、離乳後は同程度の成長パターンであった(図 2)。**HFD** 給餌後の産生仔の平均体重(図 2)および精巣周囲脂肪組織重量(図 3)は、**UN-Veh** において **NN-Veh** より有意に高値を示し、**UN-TU** が **UN-Veh** より有意に低値を示した。精巣周囲脂肪組織重量は **UN-Veh** が **NN-Veh** より有意に高値を示し、**UN-TU** は **UN-Veh** より有意に低値となった(図 4)。精巣周囲脂肪組織のマイクロアレイ解析から、**NN-Veh vs UN-Veh** 比較群と **UN-Veh vs UN-TU** 比較群において発現変動遺伝子に、どのような機能や特徴が多くみられるかを調べるために、エンリッチメント解析を行い、得られた **Gene ontology (GO)** のうち **p** 値の高いものを **20** 個抽出した。**2** つの比較群において、共通する **4** つの **GO** (**Inflammatory response**、**Response to interferon- $\gamma$** 、**Regulation of cytokine production**、**Cellular response to interferon- $\beta$** ) が認められた。**4** つの **GO** は炎症に関連するものであった。**4** つの **GO** での代表遺伝子の発現量をヒートマップに示したところ、**UN-RG** によって発現が増加する遺伝子は **TU** によって発現が減少し、

UNによって発現が減少する遺伝子はTUによって発現が増加することが判明し(図5)、主成分分析でも同様の結果であった(図6)。4つのGOのうち2回以上観察され、さらに fold change 2 または 2、p 値 < 0.05 の条件を満たした7つのGOI (Ubd、S100a8、Saa3、Hpx、Agt、Ptgs2、Casp1) について、精巣周囲脂肪組織において定量PCR法による遺伝子発現の検討を行った。これらのGOIは、いずれも肥満、マクロファージ、サイトカイン、炎症などに関連する重要な遺伝子であった。UN-Veh群ではNN-Veh群と比較して、Saa3、Ubd、S100a8、Hpxの遺伝子発現が有意に高値を示し、Agtの遺伝子発現は有意に低値を示した。UN-TUの産生仔はUN-Vehと比較してSaa3、Ubd、S100a8、Hpxの遺伝子発現が有意に低値を示し、AgtとPtgs2の遺伝子発現が高値を示した。F4/80陽性細胞の平均数は、UN-Veh産生仔ではNN-Vehよりも有意に高値を示し、UN-RG-TU産生仔はUN-Vehと比較しF4/80陽性細胞の平均数が有意に低値を示した。





胎生期低栄養（UN）環境に引き続き、授乳期において急激な成長をきたすマウス動物モデルを新たに確立し、その産生仔は高脂肪餌給餌により肥満を発症し、TU投与により有意に改善した。マイクロアレイ解析とエンリッチメント解析により、炎症に関連した4GOが同定された事ならびにマクロファージ特異的免疫組織染色の変化から、胎生期にプログラムされた脂肪蓄積とそのTUによる改善に、慢性炎症の低減が重要な寄与をしている可能性が示された。肝臓に関する同様の解析は現在も進行中である。

[ 成果 ] 本成果は以下の英語論文として投稿し、掲載された。

**Suzuki M, Kohmura-Kobayashi Y, Itoh H, et al. Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in the Adipose Tissue of Obese Adult Mice With Rapid Infantile Growth After Undernourishment In Utero. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Feb 24;13:818064. doi: 10.3389/fendo.2022.818064. eCollection 2022. (IF 6.055)**

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Itoh Hiroaki, Aoyama Tomoko, Kohmura-Kobayashi Yukiko, Nemoto Takahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Editorial: A Half-Century History of Nutritional Guidance for Pregnant Women in Japan: A Promising Research Target of the DOHaD Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.942256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Hiroaki, Ueda Megumi, Suzuki Misako, Kohmura-Kobayashi Yukiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Developmental Origins of Metaflammation; A Bridge to the Future Between the DOHaD Theory and Evolutionary Biology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.839436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Hiroaki, Ueda Megumi, Suzuki Misako, Kohmura-Kobayashi Yukiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Developmental Origins of Metaflammation; A Bridge to the Future Between the DOHaD Theory and Evolutionary Biology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.839436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Misako, Kohmura-Kobayashi Yukiko, Ueda Megumi, Furuta-Isomura Naomi, Matsumoto Masako, Oda Tomoaki, Kawai Kenta, Itoh Toshiya, Matsuya Madoka, Narumi Megumi, Tamura Naoaki, Uchida Toshiyuki, Mochizuki Kazuki, Itoh Hiroaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in the Adipose Tissue of Obese Adult Mice With Rapid Infantile Growth After Undernourishment In Utero	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.818064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Sugimura, Yukiko Kohmura-Kobayashi, Megumi Narumi, Naomi Furuta-Isomura, Tomoaki Oda, Naoaki Tamura, Toshiyuki Uchida, Kazunao Suzuki, Motoi Sugimura, Naohiro Kanayama, Hiroaki Itoh	4. 巻 17
2. 論文標題 Comparison of three classification systems of Prepregnancy Body Mass Index with Perinatal Outcomes in Japanese Obese Pregnant Women: A retrospective study at a single center	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 2002-2012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.47076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Diyvanu Jain, Tomoaki Oda, Yukiko Kohmura-Kobayashi, Naomi Furuta-Isomura, Chizuko Yaguchi, Toshiyuki Uchida, Kazunao Suzuki, Hiroaki Itoh, Naohiro Kanayama, Naoaki Tamura	4. 巻 139
2. 論文標題 Acute inflammation in the uterine isthmus coincides with postpartum acute myometritis in the uterine body involving refractory postpartum hemorrhage of unknown etiology after cesarean delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Immunol	6. 最初と最後の頁 103116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2020.103116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoaki Oda, Naoaki Tamura, Rui Ide, Toshiya Itoh, Yoshimasa Horikoshi, Masako Matsumoto, Megumi Narumi, Yukiko Kohmura-Kobayashi, Naomi Furuta-Isomura, Chizuko Yaguchi, Toshiyuki Uchida, Kazunao Suzuki, Hiroaki Itoh, Naohiro Kanayama	4. 巻 48
2. 論文標題 Consumptive Coagulopathy Involving Amniotic Fluid Embolism: The Importance of Earlier Assessments for Interventions in Critical Care	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Crit Care Med	6. 最初と最後の頁 e1251-1259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CCM.0000000000004665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 幸村友季子
2. 発表標題 妊婦の栄養摂取と次世代の 組織慢性炎症(Metainflammation)との関わり
3. 学会等名 日本周産期新生児医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 幸村友季子
2. 発表標題 胎生期低栄養による肝脂肪変性増悪マウスモデルにおける網羅的DNAメチル化解析
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸村友季子
2. 発表標題 母児の健康を目指した妊娠中の栄養管理について
3. 学会等名 日本女性栄養代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸村友季子
2. 発表標題 胎生期低栄養による臓器慢性炎症のプログラミング-マウス動物実験から-
3. 学会等名 第44回日本女性栄養代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 幸村友季子
2. 発表標題 若年女性、妊婦の栄養 -母体および児の将来の健康を目指して-
3. 学会等名 第61回日本母性衛生学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 幸村友季子
2. 発表標題 妊婦のエネルギー摂取不足に起因する成長後の児の脂肪肝発症リスク軽減を目指して エピゲノム記憶再編集の視点から
3. 学会等名 第72回 日本産科婦人科学会 学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 幸村友季子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 140
3. 書名 分娩の生理・病態に基づいた 頸管熟化と分娩誘発法	

〔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	伊東 宏晃  (Itoh Hiroaki)  (70263085)	浜松医科大学・医学部・教授   (13802)	

6. 研究組織（つづき）

	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	内田 季之  (Uchida Toshiyuki)  (90570234)	浜松医科大学・医学部附属病院・准教授    (13802)	
研究分担者	成味 恵  (Narumi Megumi)  (50594321)	浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教    (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関