

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390451

研究課題名（和文）成人病胎児期起源仮説の実験的検証とその臨床応用に関する総合的研究

研究課題名（英文）Comprehensive Study on Experimental Proof of Fetal Origins of Adult Diseases Hypothesis and its Clinical Application

## 研究代表者

佐川 典正（SAGAWA NORIMASA）

三重大学・大学院医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：00162321

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、成人病胎児期起源仮説の検証とこの機序に起因する成人病発症予防法の探索を目的とした。

まず、胎生期低栄養に起因する成人期高血圧の発症には心臓局所におけるアンギオテンシン系の亢進が関与していることおよび母獣に高蛋白食あるいは分枝鎖アミノ酸を補充すると出生仔の高血圧発症が予防できることを明らかにした。

次いで、妊娠期の母体高脂肪摂取は母体の肥満や耐糖能低下だけでなく、胎仔脂肪組織の慢性炎症を介して、次世代の血圧上昇や耐糖能低下をプログラムする可能性を示した。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to confirm the fetal origins of adult disease hypothesis and to explore a tool to prevent adult diseases of fetal origins. We found that hypertension in the offspring exposed to undernutrition *in utero* was closely related to activation of cardiac angiotensin system and that development of hypertension in these offspring was blocked by feeding high protein diet or branched chain amino acid to the pregnant mother. Maternal obesity is another cause of perinatal morbidity such as gestational diabetes and pregnancy-induced hypertension. Therefore, we also examined the effect of maternal high-fat diet on both mother and fetus. We found that high fat diet caused not only maternal obesity and impaired glucose tolerance but also hypertension and impaired glucose tolerance in the next generation through chronic inflammation of fat tissue of the fetus.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：妊娠・子宮内環境・胎児プログラミング・成人病・糖脂質代謝・インスリン抵抗性・高血圧・脂肪組織の慢性炎症

## 1. 研究開始当初の背景

周産期領域では、胎児期に低栄養に曝された児は、子宮内発育制限(IUGR)として出生するが、出生後に栄養状態が改善すると catch up growth を示すことが従来からよく知られている。近年の欧米を中心とした疫学研究から、胎児期の低栄養と乳児期の catch up growth が相互に作用し、成長後に生活習慣病を高率に発症することが明らかとなり、Fetal Origins of Adult Diseases (FOAD)あるいは”Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)”という新たな概念が提唱されている (*Science, 2004, 305:1733*)。しかし、胎生期の栄養環境と成長後の各種疾患の発症を結びつける因子や機序については不明の点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、成人病胎児期起源仮説の検証とこの機序に起因する成人病発症予防法の探索を目的とした。

具体的には、胎児期や小児期の栄養・発育環境と生活習慣病発症の関連を解析した。胎生期低栄養マウス動物モデルを用いて高血圧など成長後の生活習慣病発症に関与する因子と高血圧発症予防の方策の検討を行った。また、肥満妊婦では耐糖能の低下が起こり妊娠糖尿病 (gestational diabetes; GDM) 発症頻度が増加することが知られている。本研究では、肥満妊婦から出生した児の長期予後 (成長後の生活習慣病発症) に関しては未だ詳細は明らかでない。本研究では、脂質過剰摂取による母体の肥満が出生時の超寄与簿にどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で、高脂肪餌を負荷したマウスモデルを用いて、出生時の長期予後を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 胎生期低栄養による仔の成長後の高血圧発症機序の解析とその予防法の検討

10 週齢の C57BL/6N マウスに妊娠 10 日目から対照群のエネルギー70%に制限した餌を投与し、発育制限モデルを作成した。別の群には、エネルギー70%制限餌に分岐鎖アミノ酸を補充した群を作成し、それぞれ対照群と比較した。

(2) 高脂肪食負荷による肥満が仔の長期予後に与える影響の解析

① 6 週齢の C57BL/6N マウスに高脂肪餌 (HFD: 60%脂肪) を 4 週間与え、有意な肥満と耐糖能低下を確認した後、交配、妊娠 17 日目に開腹、胎仔及び各種臓器及び血液を採取し、糖・脂質代謝のパラメーターを標準食群 (NCD: 10%脂肪) と比較した。

② 上記 60%HFD マウスモデルおよび 45%高脂肪餌投与した母獣モデル (HFD45 群) を用いて、母獣が高脂肪餌に曝された仔の成長後の血

圧や耐糖能などを解析し、母体肥満や高脂肪食摂取が次世代の血圧や耐糖能に影響 (プログラム) するか否かを検討した。

③ ヒト肥満妊娠におけるインスリン抵抗性機序の解析

施設内倫理委員会承認の下、帝王切開時に肥満妊婦 (3 例) と非肥満妊婦 (4 例) の皮下および内臓脂肪組織を採取し、脂肪細胞の大きさや脂肪組織中のマクロファージの浸潤の程度を測定し、脂肪組織における各種アディポカイン・ケモカイン遺伝子発現を real time RT-PCR 法により解析した。

## 4. 研究成果

(1) 胎生期低栄養による仔の成長後の高血圧発症機序の解析とその予防法の検討

① 胎生期低栄養に起因する成長後の高血圧発症に対する分岐鎖アミノ酸補充の影響

マウスの妊娠10日目から母獣の摂餌量を対照群の70%に制限した摂餌制限群の仔は、出生後8週齢では血圧の有意な上昇は認めないが16週齢で収縮期圧が有意に上昇する。このモデルに妊娠中から母獣に分岐鎖アミノ酸を補充すると胎児肝臓でのIGF-1が増加し収縮期血圧上昇は有意に改善した。

② 胎生期の低栄養が成人期の高血圧及び心血管障害発症に及ぼす影響

上記低栄養マウスモデルの生後16週齢ではレニン-アンジオテンシン系が亢進している。そこで、8週齢から16週齢にかけて、皮下埋込みの浸透圧ポンプを用いangiotensin IIの1型受容体拮抗薬(カンデサルタン)を投与したところ、16週齢で血圧上昇は有意に改善し、心肥大と冠動脈周囲線維化が抑制された。

(2) 高脂肪食負荷による肥満が仔の長期予後に与える影響の解析

① HFD 母獣では、NCD 群に比し母獣の耐糖能低下、インスリン抵抗性(IR)の増大を認めた。

② HFD 母獣の血中遊離脂肪酸値と TNF- $\alpha$ 値が NCD 群に比し有意に高かった。

③ HFD 群母獣において内臓脂肪組織の CD-68, MCP-1, CCR2, TNF- $\alpha$ 各遺伝子発現の有意な増加が認められた。

④ 胎仔・胎盤重量は両群間で差を認めなかったが、HFD 群胎仔の血糖値および血清インスリン値は ND 群に比し有意に高値を示した。

⑤ HFD 群胎仔の皮下脂肪細胞は有意に肥大化し、CD68, CCR2 および TNF- $\alpha$ 遺伝子発現の有意な亢進を認めた。

⑥ HFD 群胎仔の脂肪組織では GLUT-4 遺伝子発現の有意な低下を認めた。

⑦ HFD 群新生仔は出生後 NCD 母獣に哺育させても NCD 群新生仔より有意に大きな体重増加を示した。

- ⑧ 新生仔の 10 週齢での体重は有意差がなかったが、HFD60 群の血圧(110±5.8mmHg)は対照群(92±4.0)に比して有意(p<0.0001)に高値を示した。
- ⑨ 10 週齢時の糖負荷試験では HFD60 群で負荷 30 分後、60 分後で有意(いずれも p<0.001)に高値を示し、耐糖能が低下することが判明した。
- ⑩ 一方、インスリン負荷試験では両群間で有意差を認めなかった。
- ⑪ 母獣に 45%の高脂肪餌を投与した群(HFD45 群)でも同様の検討を行ったところ、若年期(10 週齢)では有意差を認めなかったが、成獣期(35 週齢)になると HFD60 群と同様に血圧上昇と耐糖能低下を認めた。
- ⑫ HFD45 群の腸間膜脂肪組織では M1 マクロファージの浸潤亢進を認め、M2 マクロファージ発現には変化がなかったことから脂肪組織局所での慢性炎症が存在すると考えられた。
- ⑬ また HFD45 群の脂肪組織では adiponectin 遺伝子発現の低下を認めた。

### (3) ヒト肥満妊娠におけるインスリン抵抗性機序の解析

施設内倫理委員会承認の下、帝王切開時に肥満妊婦(3例)と非肥満妊婦(4例)の皮下および内臓脂肪組織を採取し、脂肪細胞の大きさや脂肪組織中のマクロファージの浸潤の程度を測定し、脂肪組織における各種アディポカイン・ケモカイン遺伝子発現を real time RT-PCR法により解析したところ、ヒトにおいてもマウスと同様に、妊娠中には脂肪細胞の肥大化と M1 マクロファージの浸潤の増加を介した TNF $\alpha$ 、レジスチン発現の増加とアディポネクチン発現の低下が認められた。肥満妊娠ではそれら変化がさらに増強していた。

結論：以上より、胎生期低栄養に起因する成人後の高血圧発症には心臓におけるアンギオテンシン系の発現亢進が関与していることおよび妊娠母体への蛋白特に分枝鎖アミノ酸の補充が高血圧発症を抑制する可能性が示唆された。また、高脂肪餌(HFD)負荷母獣では、脂肪組織へのマクロファージ浸潤を介した慢性炎症様変化を来すことにより IR が増強する可能性が示唆された。また HFD 群の胎仔でも、母獣と同様に皮下脂肪組織においてマクロファージ浸潤を認め、アディポカインの発現変化を介した GLUT-4 発現の低下が生じ、IR が惹起される可能性が示唆された。さらに、HFD 群胎仔は出生後に普通餌の親に哺育されてもより肥満したことから、肥満しやすい体質にプログラムされている可能性が示された。また、このようなプログラミングには母体の高血糖や高遊離脂肪

酸血症に起因する胎仔脂肪組織の慢性炎症が関連している可能性があり、本マウスモデルは母体肥満や耐糖能異常妊婦における次世代の生活習慣病 programming 機序解明のツールとして有用であることが示された。

### 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 9 件)

- ① Lingyun Zhang, Takashi Sugiyama, Nao Murabayashi, Takashi Umekawa, Ning Ma, Yuki Kamimoto, Yoshihiro Ogawa, Norimasa Sagawa: The inflammatory changes of adipose tissue in late pregnant mice. *J Mol Endocrinol*, **47**: 157-165, 2011. (査読有り)
- ② Hiroaki Itoh, Shigeo Yura, Norimasa Sagawa, Naohiro Kanayana, Ikuo Konishi, and Hamamatsu Birth Cohort for Mothers and Children Study Team: Neonatal exposure to leptin reduces glucose tolerance in adult mice. *Acta Physiol*, **202**: 159-164, 2011. (査読有り)
- ③ Yuta Onodera, Takeshi Teramura, Madoka Ozawa, Toshiyuki Takehara, Tasuku Mitani, Masayuki Anzai, Norimasa Sagawa, Chiaki Hamanishi, Yoshihiko Hosoi, Kanji Fukuda: Differentiation diversity of mouse parthenogenetic embryonic stem cells in chimeric mice. *Theriogenology* **74(1)**:135-45, 2010. (査読有り)
- ④ Yuki Kamimoto, Takashi Sugiyama, Tomohisa Kihira, Lingyun Zhang, Nao Murabayashi, Takashi Umekawa, Kenji Nagao, Ning Ma, Nagayasu Toyoda, Junji Yodoi, Norimasa Sagawa: Transgenic mice overproducing human thioredoxin-1, an antioxidative and anti-apoptotic protein, prevents diabetic embryopathy. *Diabetologia* **53**:2046-2055, 2010. (査読有り)
- ⑤ Takashi Sugiyama, Takumi Kobayashi, Kenji Nagao, Tsuyoshi Hatada, Hideo Wada, Norimasa Sagawa: Group A streptococcal toxic shock syndrome with extremely aggressive course in the third trimester. *J Obstet Gynaecol Res* **36**:852-855, 2010. (査読有り)

⑥ Norimasa Sagawa: Maternal nutrition and long-term consequences of the offspring. *Endocrine J*, **57(6):465-6, 2010**. (査読有り)

⑦ Makoto Kawamura, Hiroaki Itoh, Shigeo Yura, Hirota Mogami, Tsuyoshi Fujii, Hisashi Makino, Yoshihiro Miyamoto, Yasunao Yoshimasa, Seiichiro Aoe, Yoshihiro Ogawa, Norimasa Sagawa, Norio Kanayama, Ikuo Konishi: Isocaloric high-protein diet ameliorates systolic blood pressure increase and cardiac remodeling caused by maternal caloric restriction in adult mouse offspring. *Endocrine J*, **56(5):679-689, 2009**. (査読有り)

8. Hiroaki Kawato, Tsutomu Tabata, Hiroyuki Minoura, Nao Murabayashi, Ning Ma, Dong Fang Wang, Norimasa Sagawa: Factor XII gene expression in endometrial stromal cells during decidualisation. *Reprod Fertil Develop* **21: 840-847, 2009**. (査読有り)

9. Haruta Mogami, Shigeo Yura, Hiroaki Itoh, Makoto Kawamura, Tsuyoshi Fujii, Ayako Suzuki, Yoshihiro Ogawa, Norimasa Sagawa, Ikuo Konishi, Shingo Fujii: Isocaloric high-protein diet as well as branched-chain amino acids supplemented diet partially alleviates adverse consequences of maternal undernutrition on fetal growth. *Growth Horm IGF Research* **19(6): 478-85, 2009**. (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

① Norimasa Sagawa, Nao Murabayashi, Takashi Sugiyama, Shigeo Yura, Hiroaki Itoh, Takashi Umekawa, Lingyun Zhang 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology Symposium  
Maternal nutrition modulates adipocytokine expression in the fetal adipose tissue.  
2010/3/29, 京都国際会館

② Takashi Sugiyama, Nao Murabayashi, Lingyun Zhang, Takashi Umekawa, Yuki Kamimoto, Nagayasu Toyoda, Norimasa Sagawa  
The 14th International Congress of

Endocrinology  
Symposium  
Universal screening for gestational diabetes in Japan  
2010/3/26~30 国立京都国際会館

③ Takashi Umekawa, Takashi Sugiyama, Lingyun Zhang, Nao Murabayashi, Norimasa Sagawa  
The 14th International Congress of Endocrinology  
一般演題 (ポスター)  
Placental glucocorticoid metabolism is modulated by antioxidant system and affects Pancreatic function of the offspring in later life  
2010/3/26~30 国立京都国際会館

④ Nao Murabayashi, Takashi Sugiyama, Lingyun Zhang, Takashi Umekawa, Norimasa Sagawa  
The 14th International Congress of Endocrinology  
一般演題 (ポスター)  
Fetal growth and metabolic change in high-fat diet (HFD)-induced obese pregnant mice.  
2010/3/26~30 国立京都国際会館

⑤ Lingyun Zhang, Takashi Sugiyama, Nao Murabayashi, Takashi Umekawa, Ning Ma, Kennji Nagao, Yuki Kamimoto, Norimasa Sagawa  
The 14th International Congress of Endocrinology  
一般演題 (ポスター)  
Dynamic changes of macrophage subtypes M1 and M2 in adipose tissue contribute to insulin resistance in obese pregnancy in a diet-induced obesity mouse model  
2010/3/26~30 国立京都国際会館

⑥ 佐川典正  
第10回宮崎代謝内分泌研究会  
特別講演  
Developmental Origins of Health and Disease (DoHaD) - 胎児期の環境が生涯の健康と疾病をプログラムする -  
2009年10月27日 宮崎観光ホテル

⑦ 佐川典正  
第43回日本小児内分泌学会学術集会  
教育講演  
周産期の栄養と児の長期予後  
2009年10月1日 栃木県総合文化センター

⑧ 佐川典正  
第42回間脳下垂体疾患研究会  
特別講演  
産婦人科領域におけるレプチン  
2009年8月29日 京都全日空ホテル

[図書] (計 2件)

- ① 佐川典正: DOHaD / fetal programming.  
「産婦人科レビュー-最新主要文献と解説-(2011)」木村 正、高木耕一郎、竹田省、吉川裕之 編集、第1章 産科.  
総合医学社、56-69頁、2011.
- ② 佐川典正: 内分泌系の変化. 「イラストで学ぶ妊娠・分娩・産褥の生理」金山尚裕編集、メディカ出版、66-74頁、2011年.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐川 典正 (SAGAWA NORIMASA)  
三重大学・大学院医学系研究科・リサーチ  
アソシエイト  
研究者番号: 00162321

### (2) 研究分担者

杉山 隆 (SUGIYAMA TAKASHI)  
三重大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 10263005

梅川 孝 (UMEKAWA TAKASHI)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 80422864

神元 有紀 (KAMIMOTO YUKI)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90422865

村林 奈緒 (MURABAYASHI NAO)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 10378416

溝口 明 (MIZOGUCHI AKIRA)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 90181916

### (3) 連携研究者

由良 茂夫 (YURA SHIGEO)  
京都大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 60335289