

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591526

研究課題名(和文)胎児期過栄養による胎児プログラミングの機序解明 - 日内リズム異常との関連性の検討

研究課題名(英文)The role of biological clock in fetal programming by maternal overnutrition

研究代表者

川井 正信(カワイマサノブ)(Kawai, Masanobu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：50598117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期過栄養は成人期の生活習慣病の発症に関与している。更に、概日リズムは糖・脂質代謝と密接な関係にある。そこで、胎児期の過栄養が成獣期における代謝関係遺伝子の概日リズムに与える影響を検討した。胎児期に高栄養に暴露されたマウスは、コントロールマウスと比較して、内臓脂肪量の増加、および耐糖能異常・インスリン抵抗性を示した。コントロールマウスの内臓脂肪組織では、PPAR $\gamma$ の発現は暗期に減少していたが、胎児期過栄養モデルではPPAR $\gamma$ の発現が増強していた。これらの結果は、胎児期過栄養により、成獣期でのPPAR $\gamma$ の概日リズムが変化し、代謝異常の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fetal exposure to high fat diet (HFD) has been implicated in metabolic syndrome in later life. In addition, accumulating evidence indicates the critical role of biological clock in the development of metabolic syndrome. Based on these, the effect of fetal exposure to HFD on the circadian rhythm of genes involved in glucose and lipid metabolism was analyzed. Fetal exposure to HFD caused a significant increase in the fat accumulation in the abdomen accompanied by the impaired glucose tolerance and insulin sensitivity. Expression profile of Pparg showed the circadian pattern in the epididymal adipose tissue with lower expression during the dark phase, whereas its expression was enhanced in mice exposed to HFD during fetal period. These findings suggest that the alteration of Pparg expression profile may have a significant impact on the development of metabolic syndrome in mice exposed to HFD during fetal life.

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：概日リズム 胎児期プログラミング PPARガンマ

## 1. 研究開始当初の背景

成人同様、小児期においても肥満ならびにそれに伴う合併症(2型糖尿病・高脂血症など)が増加傾向にある。その原因に関しては、遺伝・環境・社会的要因など、多因子性であることが判明しているが、中でも胎児期の環境要因により引き起こされる“胎児プログラミング”がその後の小児期、成人期の体組成の変化(肥満、骨量低下)・代謝症候群の発症に大きく関わっていることが明らかとなっている。さらに、成人における肥満の増加に伴い、肥満合併妊娠も増加しており、妊娠中の過栄養が出生後の肥満等の発症に与える影響が懸念される。事実、妊娠中の過栄養は、成人期ならびに小児期における肥満、2型糖尿病の危険因子であることが近年疫学的に報告されてきている。妊娠中の過栄養がどのように“胎児プログラミング”に影響を与えるかは、まだ不明な点が多いが、DNAメチル化・ヒストン修飾といったエピジェネティックな要因により代謝に関与する遺伝子の発現の変化をきたし、結果的に体組成の変化、代謝異常を誘引する可能性が指摘されている。

一方、近年、概日リズムと代謝には密接な関係があることが判明している。概日リズムの中枢ペースメーカーは視床下部に存在しているが、末梢組織も独自のリズムを有し、中枢性リズムと協調しながら、栄養状態などの外的要因の変化を感知し、末梢組織での代謝反応を調節している。末梢組織の概日リズムは栄養摂取により強く影響を受けることは良く知られている。個々の末梢組織の細胞がどのように外的な環境の変化を感知し、遺伝子の発現を変化させているかはまだ不明な点が多いが、核内受容体とそのシグナルを媒介している可能性が指摘されている。中でも、核内受容体であるPPAR $\gamma$ は、脂質代謝・糖代謝、骨代謝において重要な役割を果たし、さらに概日リズムを有していることが報告されている。このことは、“胎児期における過栄養は出生後の糖・脂質代謝、骨代謝をつかさどる遺伝子(PPAR $\gamma$ など)の概日リズムの周期性ないし振幅を変化させ、その結果、体組成、糖・脂質代謝異常を引き起こす可能性を示唆しているが、その検討はほとんど行われていない。

## 2. 研究の目的

胎児期過栄養は小児・成人期の肥満・生活習慣病の発症に密接に関与している(胎児プログラミング)が、その詳細な機序は不明である。近年、概日リズムが体組成(脂肪量・骨量)や糖・脂質代謝と密接な関係にあることが報告されている。そこで、胎児期の過栄養が出生児において代謝に係る遺伝子の概日リズムに影響を与え、その結果、体組成、脂質・糖質代謝異常を引

き起こすのではないかとという仮説を検証することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 胎仔期化過栄養モデルの作成

胎仔期過栄養モデルは、雌マウスを離乳後より高脂肪食(カロリー比60%)で飼育し、8週齢時点から普通食飼育下の雄マウスと交配することで作成した。妊娠中および授乳中(生後3週齢まで)の母マウスは、高脂肪食で飼育し、仔マウスは離乳後からは普通食で飼育した。普通食で飼育された雌マウスから出生した仔マウスをコントロールマウスとして使用した。

### (2) 胎仔期の過栄養が糖・脂質代謝に及ぼす影響の検討

胎仔期過栄養モデルマウスとコントロールマウスを月齢6まで飼育し、毎週体重を測定した。また、糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行い糖代謝の評価を行った。月齢6でマウスを6時間毎(ZT0,6,12,18)に屠殺し、血清、脂肪組織(皮下および内臓)、肝臓、骨を採取した。また、脂肪量の測定も行った。

### (3) 胎仔期の過栄養が、概日リズムに与える影響の検討

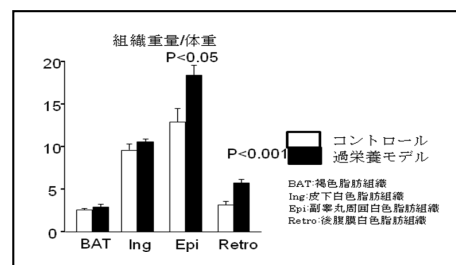
上記(2)で採取したサンプルからcDNAを作成し、時計遺伝子および概日リズムとの関連性がある糖・脂質代謝に関わる遺伝子の発現を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 胎仔期過栄養モデルマウスにおける体組成の評価

胎仔期過栄養モデルマウスは、離乳時の体重が雄・雌ともに有意に増加していた。しかし、その後体重の差は速やかに消失し、最終的には体重差を認めなくなった。しかし、皮下脂肪量および内臓脂肪量を測定したところ、胎仔期過栄養モデルマウスでは、内臓脂肪量(図1)が雌雄ともに有意に増加していたが、皮下脂肪量および褐色脂肪組織量に変化を認めなかった。これらの結果は、胎仔期に過栄養にさらされると、生後に普通食で飼育されても、部位特異的に、特に内臓脂肪に、より脂肪を蓄積しやすい表現型を呈することが判明し、体重には現れない体組成の変化が糖・脂質代謝異常の発症につながっているのではないかと考えられた。

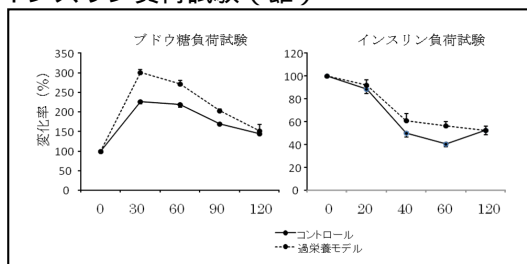
図1: 雄における部位特異的脂肪組織量



## (2) 胎仔期過栄養モデルマウスにおける糖代謝の評価

生後6カ月時点で、糖代謝評価のため、ブドウ糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。空腹時血糖は雌雄ともコントロール群と胎仔期過栄養群で差を認めなかった。しかし、ブドウ糖負荷試験を行うと、雌雄ともに、耐糖能異常を呈していた。インスリン負荷試験では、雄のみにインスリン抵抗性を認め、雌雄で表現型が異なっていた(図2)。

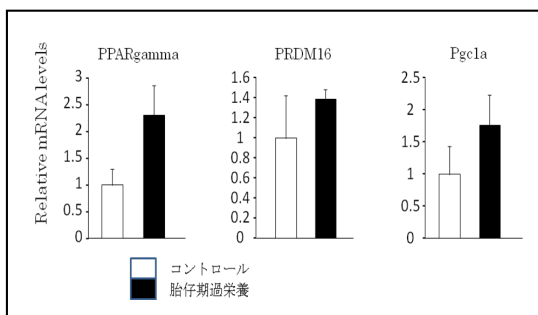
図2：月齢6時点における糖負荷試験およびインスリン負荷試験(雄)



## (3) 脂肪組織における代謝関連遺伝子の発現

まず、通常食飼育下におけるマウスを用いて、脂肪組織におけるPPAR $\gamma$ の発現リズムを検討した。副睾丸周囲脂肪組織では、PPAR $\gamma$ は振幅は小さいものの、暗期に発現が低下する発現パターンを有していた。次にZT2におけるPPAR $\gamma$ の発現を検討した。副睾丸周囲脂肪組織では、胎仔期過栄養群でPPAR $\gamma$ の発現が上昇していた(図3)。また、近年、白色脂肪細胞がある状況下(交感神経刺激など)では、褐色脂肪細胞様の機構を獲得することが報告されてきている。また、この褐色化した白色脂肪細胞(Beige脂肪細胞)の増加は、肥満に対して防御的に作用する可能性が示唆されている。そこで、胎児期に過栄養にさらされると、白色脂肪細胞の褐色脂肪様機能が減弱するのではないかと考え、白色脂肪の褐色化に参与するPrdm16, Pgc1aの発現を検討した。これらの発現は、予想に反して胎仔期過栄養群において増加しており、脂肪量増加に対する代償性の反応である可能性が考えられた(図3)。

図3：副睾丸周囲脂肪組織における遺伝子発現



## 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12件)

- Kawai M, Mödder UI, Khosla S, Rosen CJ: Emerging therapeutic opportunities for skeletal restoration. Nat Rev Drug Discov 10;2:141-156, 2011 査読あり
- Kawai M, Breggia AC, DeMambro VE, Shen X, Canalis E, Boussein ML, Beamer WG, Clemmons DR, Rosen CJ: The heparin-binding domain of IGFBP-2 has IGF binding-independent biologic activity in the growing skeleton. J Biol Chem 22;286:14670-80, 2011 査読あり
- Guntur AR, Kawai M, Le P, Boussein M, Bornstein S, Green C, Rosen CJ: An essential role for the circadian-regulated gene Nocturnin in Osteogenesis: The Importance of local timekeeping in skeletal homeostasis. Ann N Y Acad Sci 1237:58-63, 2011 査読あり
- DeMambro VE, Maile L, Wai C, Kawai M, Cascella T, Rosen CJ, Clemmons DR: Insulin-like growth factor binding protein-2 is required for osteoclast differentiation J Bone Miner Res 27;2:390-400, 2012 査読あり
- Le P, Kawai M, Bornstein S, DeMambro VE, Horowitz MC, Rosen CJ: A High Fat Diet Induces Bone Loss in Mice Lacking the *Alox5* Gene. Endocrinology 153;1:6-16, 2012 査読あり
- Koshimizu T, Kawai M, Kondou H, Tachikawa K, Sakai N, Ozono K, Michigami T: Vinculin Functions as a Regulator of Chondrogenesis. J Biol Chem 4;287(19):15760-75, 2012 査読あり
- Kawai M, de Paula FJ, Rosen CJ: New Insights into Osteoporosis: The Bone-Fat Connection. J Intern Med 272;4:317-29, 2012 査読あり
- Kawai M, Rosen CJ: The IGF system in bone: Basic and Clinical Implications. Endocrinol Metab Clin North Am 41;2:323-33, 2012 査読あり
- Kawai M, Kinoshita S, Kimoto A, Hasegawa Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Ohata Y, Ozono K, Michigami T: FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble  $\alpha$ -Klotho both in vitro and in vivo. J Biol Chem. 25;288(4):2414-27, 2013 査読あり
- Kondou H, Kawai M, Tachikawa K, Kimoto A, Yamagata M, Koinuma T, Yamazaki M, Nakayama M, Mushiake S, Ozono K, Michigami T: Sodium-coupled Neutral Amino Acid Transporter 4 Functions as a Regulator of Protein Synthesis during Liver Development. Hepatol Res 43;11:1211-23, 2013 査読あり
- Motyl KJ, Bishop KA, DeMambro VE, Bornstein SA, Le P, Kawai M, Lotinun S, Horowitz MC, Baron R, Boussein ML, Rosen CJ: Altered thermogenesis and impaired bone remodeling in Misty mice. J Bone Miner Res. 28;9:1885-97, 2013 査読あり
- Kawai M: Adipose tissue and bone: role of PPAR $\gamma$  in adipogenesis and osteogenesis Horm Mol Biol Clin Invest 15;3:105-113, 2013 査読あり

[学会発表](計7件)

(国際学会)

1. Oral Presentation, Brown adipose dysfunction causes bone loss, IOF Regionals 2<sup>nd</sup> Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting, September 4–8, 2011, Gold Coast, Australia

2, Plenary Poster, FGF23 suppresses chondrocyte proliferation and maturation in the presence of soluble  $\alpha$ -klotho both in vitro and in vivo, Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, October 12–15, 2012, Minneapolis, Minnesota, USA

3, Oral Presentation FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble  $\alpha$ -Klotho, 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 28-June 1, 2013, Kobe, Japan

4, Poster Presentation Sympathetic activation induces skeletal *Fgf23* expression in a circadian rhythm dependent manner. Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, October 4–7, 2013, Baltimore, Maryland USA

(国内学会)

1. 川井正信  
FGF23は可溶性klotho存在下で軟骨細胞分化を抑制する  
第30回日本骨代謝学会学術集会  
2012年7月19日～21日 東京

2. 川井正信  
FGF23は軟骨細胞増殖をリン代謝非依存性に抑制し、X連鎖性低リン性くる病に伴う低身長の一因となりうる  
第46回小児内分泌学会学術集会  
9月27日～9月29日 大阪

3. 川井正信  
細胞外無機リン酸シグナルは、脂肪細胞においてPTENの発現を抑制し、インスリンシグナルを増強する。  
第86回日本内分泌学会学術集会  
2013年4月25日～27日 仙台

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 特記すべき事項なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
川井正信(KAWAI MASANOBU)  
大阪府立母子保健総合医療センター研究  
所 環境影響部門 主任研究員  
研究者番号：50598117

(2)研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者 なし  
( )

研究者番号：