

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700933

研究課題名（和文）胎盤性レプチン発現に及ぼす母体必須金属栄養状態の影響

研究課題名（英文）Effects of maternal nutrition for essential metals on placental leptin expression

研究代表者

上田 英典（UEDA HIDENORI）

大阪大谷大・薬学部・助教

研究者番号：50419462

研究成果の概要（和文）：食餌性の母体必須金属欠乏や過剰状態が、妊娠時に亢進する胎盤性レプチン発現に及ぼす影響について、ヒト胎盤絨毛細胞株 JEG-3 および妊娠マウスを用いて検討した。その結果、必須金属の過不足により母体血中レプチン濃度や、胎盤由来のレプチンおよびレプチン受容体の発現量が変動した。よって、母体の必須金属栄養状態により胎盤性レプチンの発現量が変動し、胎児の発育に影響が及ぶ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Effects of maternal deficiency and overload of essential metals on placental leptin expression were studied in pregnant mice and human placental choriocarcinoma cell line JEG-3. The levels of plasma leptin and leptin receptor expression were decreased in essential metals deficient mice and increased in them overloaded mice. These results suggest that placenta-derived leptin and its receptor expression may be controlled by maternal nutrition of essential metals for fetal development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：必須金属, レプチン, 胎盤, 妊娠

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国ではライフスタイルの変化によって食生活が多様化し、その結果不足する栄養素を補う目的で、健康食品やサプリメント等の需要が急速に高まっている。種々の健康食品やサプリメントが流通する中、国が定めた安全性や有効性に関する基準を満たすものを『保健機能食品』とし、その規格や表示基準が定められた。保健機能食品は『栄養機能食品』と『特定保健用食品』からなり、栄養機能食品の対象となる栄養成分には、鉄、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、銅の5種の必須金属が含まれる。しかし、鉄、カルシウム、マグネシウム、亜鉛は、最近の国民健康・栄養調査の結果からその摂取量が推奨量や目安量を下回っていることが明らかになっており、さらにこの現象は、妊娠適齢期の女性で顕著である。また、妊娠中は妊婦自身の恒常性維持だけでなく、胎児の正常な発育を促すために非妊娠時とは生理的・生化学的に異なった状態になることから、妊婦の必須金属推奨量には付加量が設定されている。

妊娠時に母体と胎児の間に形成される胎盤は、母体から胎児への栄養分の供給やガス交換、また、物質代謝能の十分でない胎児に代わって外来異物の代謝を行い、胎児にとって不必要な物質の移行を防ぐ物理的関門としての機能も果たしている。さらに胎盤は、エストラジオールやプロゲステロンといったステロイドホルモン等、種々の生理活性物質を産生し、内分泌腺としての機能も有する。

近年、視床下部の受容体に作用して摂食を抑制し、さらにエネルギー消費亢進作用を示す等、肥満や糖尿病に影響を及ぼす脂肪組織由来のホルモンとして同定されたレプチンが、新たにヒト胎盤絨毛細胞でも合成されることが明らかになった。妊娠期の母体血中レプチン濃度は、妊娠初期よりも中期・末期において高値を示し、胎盤娩出後は速やかに非妊娠時のレベルまで低下する。一方、マウスでも、妊娠期の血中レプチン濃度上昇が認められるが、胎盤でのレプチン産生は認められない。このため、胎盤由来の可溶性レプチン受容体の産生亢進によって脂肪組織由来のレプチンと受容体の複合体が増加し、レプチン代謝が抑制されることでその濃度が上昇すると考えられる。いずれにせよ、妊娠の成立、維持、出産という一連の生命再生産の過程には多大のエネルギーが必要になることから、妊娠期の血中レプチン濃度の上昇は、母体の糖・エネルギー代謝調節を介して、胎児の発育に何らかの形で寄与している可能性が示唆されている。

また、近年、著しく増加している生活習慣病（成人病）の発症説として、新たに「受精時、胎芽期、胎児期または乳幼児期に、低栄養または過栄養の環境に曝露されると成人病（遺伝）素因が形成され、その後の生活習慣の負荷により成人病が発症する」という『成人病胎児期発症（起源）説』が提唱され、胎児期の栄養状態、つまり妊娠適齢期の女性の栄養状態の重要性が指摘されている。さらにこれらの症例では、胎児期の低栄養と新生児期の高栄養がレプチン発現を変容させ、成長後もレプチン抵抗性が持続する原因となり、その結果、肥満につながる可能性が示唆されており、『成人病胎児期発症説』とレプチンとの関連性が指摘されている。

2. 研究の目的

新たに胎盤由来ホルモンとして確認され、妊娠末期に急激に血中濃度が上昇することから、胎盤由来ホルモンとして母体エネルギー代謝やインスリン感受性の調節を介し、胎児発育に関与していると考えられるレプチンの発現に、レプチンと同様、胎児の発育に重要である母体の食餌性必須金属栄養状態が及ぼす影響を明らかにし、さらにヒト胎盤の性ステロイドホルモン合成系を加えた三者に焦点を当て、ヒト胎盤絨毛細胞株 JEG-3 や妊娠マウスを用い、レプチン—母体必須金属栄養状態—性ステロイドホルモンの関連性を解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

母体必須金属栄養状態が、胎盤でのレプチン発現にどのような影響を及ぼすのか、また、レプチンそのものが、必須金属輸送系や性ステロイドホルモン合成系に及ぼす影響について検討した。

(1) 必須金属欠乏または過剰状態がヒト胎盤絨毛細胞のレプチンおよびレプチン受容体発現に及ぼす影響

必須金属である鉄、亜鉛、銅の特異的キレート剤である DFO, TPEN, BCS で処理した各種必須金属欠乏状態の培地中でヒト胎盤絨毛細胞株 JEG-3 を培養し、回収した細胞から total RNA を得た。同様の操作を FeCl₃, ZnCl₂, CuCl₂ で処理した各種必須金属過剰状態でも行った。さらに得られた total RNA から cDNA を合成し、これを用いてリアルタイム RT-PCR を行い、レプチンおよびレプチン受容体の mRNA 発現量を測定した。また、同様に培養し

た JEG-3 を Lysis buffer で処理しタンパク質を抽出した。これを用い、レプチンおよびレプチン受容体のタンパク質発現量をウエスタンブロット法により測定した。

(2) ヒト組換え体レプチンが胎盤の必須金属トランスポーターおよびステロイド合成酵素に及ぼす影響

JEG-3 をヒト組換え体レプチン (1~100 ng/ml) で同様に処理し、鉄輸送に関わる DMT1、亜鉛輸送に関わる Zip6、銅輸送に関わる Ctr1 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で測定した。さらに、性ステロイドホルモン合成酵素アロマターゼおよび 17 β -HSD1 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で、またタンパク質発現量をウエスタンブロット法でそれぞれ測定した。

(3) 必須金属栄養状態が妊娠マウスのレプチンおよびレプチン受容体発現に及ぼす影響

妊娠マウス (ICR 系, 10 週齢) に妊娠 1 日目から鉄, 亜鉛, 銅をそれぞれ欠乏または過剰にした改変 AIN-93M 飼料を自由摂取させ、妊娠 14 または 17 日目に採血後、胎児, 胎盤, 母体内臓脂肪を回収した。胎児および胎盤の必須金属濃度は湿式灰化後、原子吸光光度計を用いて測定し、血中レプチンおよびインスリン濃度は ELISA 法で、また血糖値はムタローゼ・GOD 法でそれぞれ定量した。さらに、胎盤および内臓脂肪中のレプチン受容体またはレプチンの mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法で、またタンパク質発現量をウエスタンブロット法でそれぞれ測定した。また、胎盤の糖輸送体 GLUT1 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で測定した。

4. 研究成果

(1) 必須金属欠乏または過剰状態がヒト胎盤絨毛細胞のレプチンおよびレプチン受容体発現に及ぼす影響

- ① 鉄過剰状態では、レプチンの mRNA およびタンパク質発現量が有意に増加した。
- ② 鉄欠乏状態では、レプチンのタンパク質発現量が有意に減少した。一方、レプチン受容体の mRNA およびタンパク質発現量が有意に増加した。
- ③ 亜鉛欠乏状態では、レプチンの mRNA 発現量が有意に増加した。
- ④ 銅欠乏状態では、レプチンのタンパク質発現量が有意に増加した。
- ⑤ 銅過剰状態では、レプチン受容体のタン

パク質発現量が有意に増加した。

(2) ヒト組換え体レプチンが胎盤の必須金属トランスポーターおよびステロイド合成酵素に及ぼす影響

- ① レプチン濃度依存的に、アロマターゼのタンパク質発現量が有意に増加し、また、濃度依存的に 17 β -HSD1 の mRNA およびタンパク質発現量が有意に増加した。
- ② それぞれ、鉄, 亜鉛, 銅のトランスポーターである DMT1, Zip6, Ctr1 の mRNA 発現量は、レプチン処理によって有意に変動しなかった。

(3) 必須金属栄養状態が妊娠マウスのレプチンおよびレプチン受容体発現に及ぼす影響

- ① 妊娠亜鉛欠乏および銅欠乏食群では、胎児および胎盤の各必須金属濃度が有意に低下した。また、妊娠 17 日目の胎児重量が有意に減少した。さらに妊娠亜鉛欠乏食群の内臓脂肪量が有意に減少した。
- ② 血中インスリン濃度は、妊娠の有無に関わらず亜鉛欠乏食群で有意に低下した。また妊娠亜鉛欠乏食群では、妊娠後期にかけてその濃度が有意に低下した。一方、亜鉛過剰食の非妊娠群で血中インスリン濃度が有意に上昇したが、妊娠群では有意な差は認められなかった。
- ③ 血中レプチン濃度は、妊娠により顕著に増加した。一方、母体内臓脂肪のレプチン mRNA 発現量は、妊娠 14 日目に一度減少した後、17 日目に非妊娠時のレベルに回復した。
- ④ 亜鉛欠乏食群では、妊娠群で血中レプチン濃度が顕著に低下し、また母体内臓脂肪のレプチン mRNA 発現量、胎盤のレプチン受容体 mRNA およびタンパク質発現量が有意に減少した。一方、亜鉛過剰食群では、妊娠群で血中レプチン濃度が有意に上昇し、胎盤のレプチン受容体タンパク質発現量が有意に増加した。
- ⑤ 銅欠乏食群では、妊娠群で血中レプチン濃度が有意に低下し、さらに胎盤のレプチン受容体タンパク質発現量が有意に減少した。一方、銅過剰食群では、妊娠群で血中レプチン濃度が有意に上昇し、胎盤のレプチン受容体タンパク質発現量が有意に増加した。
- ⑥ いずれの群も、血糖値に有意な変動は見られなかった。また、亜鉛欠乏食群で、GLUT1 mRNA 発現量が有意に減少した。

(5) 総括

ヒト胎盤絨毛細胞株 JEG-3 において、鉄過剰時にはレプチンの mRNA およびタンパク質発現量が有意に増加し、鉄欠乏時にはタンパク質発現量が有意に減少した。一方、レプチン受容体の mRNA およびタンパク質発現量は、鉄欠乏時に有意に増加した。さらに、JEG-3 をヒト組換え体レプチンで処理したところ、エストロゲン合成酵素であるアロマターゼおよび 17 β -HSD1 のタンパク質発現量が濃度依存的に有意に増加した。これらのことから、母体必須金属の栄養状態と性ステロイドホルモン、さらにレプチンの三者には相関があることが明らかになった。

また、妊娠マウスでは、亜鉛欠乏により内臓脂肪のレプチン発現量および胎盤のレプチン受容体発現量が有意に減少し、血中レプチン濃度が顕著に低下した。一方、亜鉛過剰では胎盤のレプチン受容体発現量が有意に増加し、血中レプチン濃度が有意に増加した。また、銅の過不足によっても血中レプチン濃度が顕著に増減し、同様に胎盤のレプチン受容体発現量の増減が関与していた。さらに、非妊娠時には、亜鉛や銅の過不足で血中インスリン濃度が有意に増減したが、妊娠時にはその変動が少なかった。これらのことから、母体の糖・エネルギー代謝には、妊娠時は母体インスリンだけでなく血中レプチンが大きく関与し、この血中レプチン濃度の調節を胎盤が担っており、さらにこの調節には亜鉛や銅といった必須金属の母体栄養状態が大きく影響することが明らかになった。

胎生期という短期間であるにもかかわらず、望ましくない栄養環境に曝露されるとヒストン修飾や DNA メチル化などのエピゲノム変化が起こり、成熟後の肥満や生活習慣病の素因が形成されることが報告されている。これらのことから今後の展望として、母体必須金属栄養状態の変動や胎盤性レプチンが、胎盤や胎児臓器に及ぼすエピジェネティックな変化、さらにその子供や孫など、数世代に渡る影響を検討し、『成人病胎児期発症説』との関連性について更なる解明を目指す予定である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 上田 英典, 中井 健徒, 小西 達也, 坂崎文俊, 関 庚善, 『必須金属欠乏および過剰摂取による妊娠マウスのレプチンおよびその

受容体発現への影響』, 日本薬学会 第 133 年会, 平成 25 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜 (横浜).

② 上田 英典, 小西 達也, 大原 章寛, 関 庚善, 田中 慶一, 『必須金属の欠乏および過剰による胎盤性レプチン発現への影響』, 日本薬学会 第 132 年会, 平成 24 年 3 月 31 日, 北海道大学 (札幌).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 英典 (UEDA HIDENORI)
大阪大谷大学・薬学部・助教
研究者番号: 50419462