

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591598

研究課題名(和文)母体低栄養マウス胎仔を用いた虚血再灌流時の低酸素遺伝子応答解析

研究課題名(英文)Fetal gene response of maternal undernutrition mouse at ischemia reperfusion

研究代表者

伊藤 拓哉 (Ito, Takuya)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70396539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は虚血低酸素負荷により脳出血を発症する母体低栄養モデルマウスの脳出血発症前後の遺伝子発現を網羅的な解析し、遺伝子発現変化と調整する転写因子を明らかにし、発症の危険因子を見つけ出すことを目的とした。ミトコンドリア関連遺伝子の発現量がp53発現量でクラスタリングされ、p53の活性阻害薬投与により、脳出血の発症が抑制された。母体低栄養に由来する低酸素耐性低下にはp53シグナル活性によるミトコンドリアの異常活性の関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to find out the risk factors gene network and transcription factor for fetal cerebral hemorrhage onset. We compared the gene expression of the fetal brain of model mouse before and after ischemic-reperfusion. Expression levels of mitochondria-associated genes were clustered in p53 expression level. By the maternal treatment of p53 inhibitor, the onset of fetal cerebral hemorrhage has been suppressed. Vulnerable to hypoxia derived from maternal malnutrition has been suggested to be involved in the aberrant activity of mitochondrial by p53 signaling activity.

研究分野：実験動物学

キーワード：胎児脳出血 転写因子 HIF1-alpha p53

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦では年間 300-500 例の脳性麻痺児が生まれている。これは 50 年間改善が無く、周産期領域における重要な課題である。脳性麻痺の発症には虚血低酸素が関与していることが解ってきた。しかし、虚血低酸素に対する耐性を判断出来ないことが、発症の予防や予知を難しくしていた。

2. 研究の目的

(1) 母体に低栄養食を与えた胎子は虚血低酸素負荷によって脳出血を発症しやすいことから、母体低栄養は胎子の虚血低酸素に対する耐性を低下し、脳出血が発症しやすい様に遺伝子発現を変化させると着想し、本研究を企画した。

(2) 本研究ではモデルマウスの脳出血発症前後の遺伝子発現を網羅的な解析から遺伝子発現の変化とそれを調整している転写因子を明らかにすることで、脳性麻痺の危険因子を見つけ出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 通常酸素分圧時における母体低栄養の影響を検討。C57BL/6N 雌マウスを導入し、与える餌の種類で 2 群に分けた。繁殖に十分な栄養含む餌を与えた 1 群を対照群とし、もう 1 群は対照群の餌と比べ蛋白含有量を約半分に制限した低栄養群とした。両群ともに正常な雄マウスと交配し、妊娠 17.5 日目に胎子脳を採取した。採取した胎子脳から RNA を抽出し、マイクロアレイ(東レ 3D gene)にて遺伝子発現を網羅的に解析、母体低栄養による遺伝子発現変化を調整する責任転写因子候補を推定した。

(2) 虚血再灌流耐性に対する母体低栄養の影響を検討。低蛋白食群を妊娠 17.5 日目に麻酔下で開腹・子宮を露出した。胎子心電図計測装置、超音波による胎子の心拍数、脳血流監視下で子宮動脈の圧迫開放を行い、胎子脳に虚血再灌流を起こし、胎子脳出血を発症した脳を採取した。対照群でも同様の負荷後、胎子脳を採取した。採取した胎子脳から RNA を抽出し、マイクロアレイにて遺伝子発現を網羅的に解析、母体低栄養による虚血再灌流耐性を変化させる遺伝子発現変化を調整する責任転写因子候補を推定した。

(3) 虚血再灌流耐性責任転写因子候補修飾実験。(1)、(2)の解析から胎子脳出血の発症に p53 の活性化が関与している可能性が示唆されたので、2 種類の p53 活性阻害薬を母獣に投与した。1 種は核、ミトコンドリア両方に作用する pifithrin-alpha (PFT-alpha)で妊娠 15.5 日目と 16.5 日目に 2.2mg/kg 母獣腹腔に投与した。もう 1 種はミトコンドリアにのみ作用する

pifithrin-mu (PFT-mu)で同じタイミングで 3mg/kg を母獣腹腔に投与した。妊娠 17.5 日目に麻酔下で開腹・子宮を露出した。胎子心電図計測装置、超音波による胎子の心拍数、脳血流監視下で子宮動脈の圧迫開放を行い、胎子脳に虚血再灌流を起こし、胎子脳を採取し、脳出血発症率を検証した。

(4) p53 シグナルによるミトコンドリア活性調整の検証。ミトコンドリアの異常活性から産生される活性酸素が脳出血発症に関与していることが知られているため、(2)、(3)の結果から示唆された、核、ミトコンドリア両方に発現するミトコンドリア関連遺伝子の発現量と p53 シグナルの活性化が母体低栄養マウスの低酸素耐性低下に関与の可能性を検証した。対照群、低栄養群、PFT-alpha 投与群で、虚血再灌流負荷前後でミトコンドリア活性の指標として胎子脳に含まれる ATP 量を定量化した。

4. 研究成果

(1) mRNA 発現レベルの網羅的解析から虚血再灌流負荷前の母体低栄養群で HIF1-alpha の発現量の有意な増加が確認された。

(2) 虚血再灌流負荷に対する母体低栄養の影響をミトコンドリア関連遺伝子の発現変化に注目して解析した。虚血再灌流負荷後に低栄養群でミトコンドリア関連遺伝子群の発現量が増加した。また、それらの mRNA 発現量が p53 発現量によって母体栄養条件によってクラスタリングできることを明らかにした (図 1)。

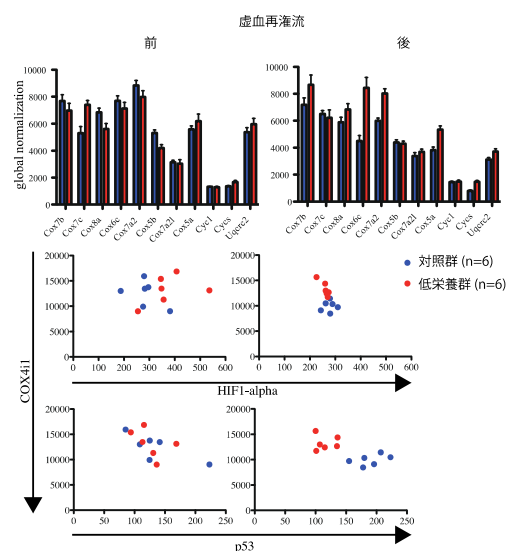


図 1 虚血再灌流負荷前後のミトコンドリア関連遺伝子発現変化

(3) p53 シグナル阻害による脳出血発症率抑

制の検証。虚血再灌流負荷による胎仔脳出血は核、ミトコンドリア両方で p53 シグナルを阻害する PFT-alpha 投与によって対照群と同程度に抑制された。一方、ミトコンドリアのみの p53 シグナルを阻害する PFT-mu 投与では非投与群（低栄養群）と対照群の中間状態を示した(図 2)。これらの結果から、母体栄養制限に由来する低酸素耐性低下には p53 シグナルが関与し、その局在はミトコンドリアだけでなく、核との両方のシグナル経路が作用していることが明らかになった。

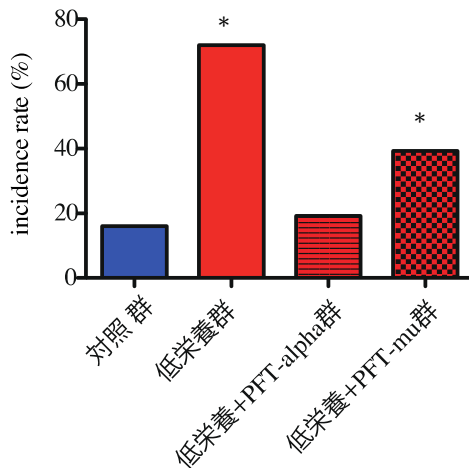


図 2 虚血再灌流負荷による脳出血発症率

(4) p53 シグナルによるミトコンドリア活性調整の検証。脳出血発症機構としてミトコンドリア異常活性に由来する活性酸素による細胞傷害が知られている。(3)で示した p53 シグナルの活性阻害がミトコンドリア活性を抑制することを確認した(図 3)。低栄養群は虚血再灌流負荷により ATP レベルが対照群異常に蓄積し、ミトコンドリアの異

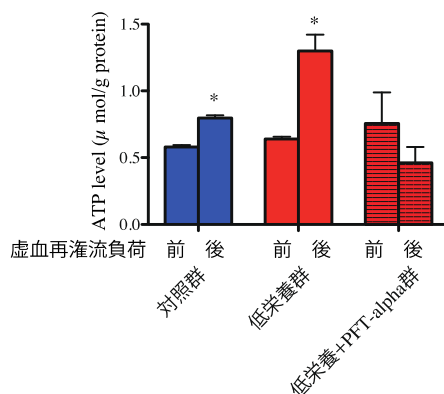


図 3 虚血再灌流負荷後の ATP レベル

常活性が示された。一方、PFT-alpha は虚血再灌流負荷によるミトコンドリア活性を阻害した。これらの結果から、母体低栄養に由

来する低酸素耐性低下には p53 シグナル活性によるミトコンドリアの異常活性が関与している。ミトコンドリア活性に關する遺伝子群は核とミトコンドリア両方に局在することが示唆された。

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 2 件)

Velayo Clarissa, Ito Takuya, Dong Yupeng, Endo Miyuki, Sugibayashi Rika, Funamoto Kiyoe, Iida Keita, Yaegashi Nobuo, Kimura Yoshitaka, Molecular patterns of neurodevelopmental preconditioning: a study of the effects of antenatal steroid therapy in a protein-restriction mouse model, ISRN Obstet Gynecol, 査読有、2014, doi: 10.1155/2014/193816.

伊藤拓哉、木村芳孝、佐藤尚明、星合哲郎、八重樫伸生、胎児脳出血は p53 シグナル不活化で抑制される、東北医学雑誌 125(1) 88-90、査読無、2013

[学会発表](計 3 件)

伊藤拓哉、木村芳孝、杉林 里佳、佐藤尚明、董 宇鵬、飯田 深太、八重樫伸生、繰り返す虚血再灌流負荷は母体低栄養マウス胎仔の脳出血発症リスクを増大させる、第 66 回日本産婦人科学会学術集会、2014.4.18、東京、東京国際フォーラム

Takuya Ito, Kenichi Funamoto, Kiyoe Funamoto, Clarissa L. Velayo, Yupeng Dong, Miyuki Endo, Rika Sugibayashi, Keita Iida, Toshiyuki Hayase, Nobuo Yaegashi, Yoshitaka Kimura, Repeated ischemia reperfusion in a maternal protein restriction model increases the risk of fetal brain hemorrhage via p53-signal activation. 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, 2013.11.17, Singapore

伊藤拓哉、木村芳孝、佐藤尚明、星合哲郎、八重樫伸生、胎児脳出血は p53 シグナル不活化で抑制される、第 64 回日本産婦人科学会学術集会、2012.4.14、神戸、神戸国際展示場

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.fetalecg.med.tohoku.ac.jp/kimuralab/kimuralab_top_jn.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 拓哉 (ITO, Takuya)
東北大学・医学研究科・助教
研究者番号：70396539

(2) 研究分担者

木村 芳孝 (KIMURA, Yoshitaka)
東北大学・医学研究科・教授
研究者番号：40261622

佐藤 尚明 (SATO, Naoaki)
東北大学・医学研究科・助教
研究者番号：70431567

船本 聖絵 (FUNAMOTO, KIYOE)
東北大学・医学研究科・技術補佐員
研究者番号：30570030

董 宇鵬 (DONG Yupeng)
東北大学・医学研究科・助手
研究者番号：10569320
クラリッサ ヴェラヨ (CLARISSA Velayo)
東北大学・東北メディカルメガバンク・助教
研究者番号：30635636

(3) 連携研究者

()

研究者番号：