

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：34305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650507

研究課題名(和文) 線虫を用いた生活習慣病胎児期起源説の検証

研究課題名(英文) Analyzing Fetal Origin of Adult Diseases Theory using *Caenorhabditis elegans*.

研究代表者

松本 晋也 (Matsumoto, Shinya)

京都女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：30263156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病発症の新しい要因として「成人病胎児起源説(FOAD説)」が提唱されている。これは、親世代の体験が胎児に体質変化を引き起こすという考えであるが、そのメカニズムには不明な点が多い。本研究では、FOAD説のメカニズムを解明するモデル系として線虫(*Caenorhabditis elegans*)が使えるかどうかを明らかにすることを目的に解析をおこなった。その結果、親世代が飢餓を経験すると子孫線虫では、脂肪量が増加していたことを機器分析で示した。このことは、FOAD説に基づく体質変化が線虫でも起きること、したがってこの現象を解析すればFOAD説のメカニズムの理解に貢献できることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fetal-Origin of Adult Diseases (FOAD) has been suggested as the third factor, in addition to genetic and environmental, that contributes to the establishment of life-style related disease. The basis of the theory is that nutritional condition in early stage of life may trigger the epigenetic modification in the genome, which leads to obese in adult stage. The precise mechanism of the theory, however, remains to be understood. This project was performed to explore the usefulness of *Caenorhabditis elegans* as a model system to study the FOAD. In this project, it was shown that the progeny of starvation-experienced worms accumulated more fat compared to those of normally-fed worms using fluorescent dye Nile Red. The actual fat content, determined by gas chromatography, supported the increment of fat in the second generation of starvation-experienced worms. These data indicates that worms can be a suitable model system to study FOAD theory.

研究分野：分子栄養学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：線虫 *Caenorhabditis elegans* 成人病胎児期起源説 低出生体重 エピジェネティクス 飢餓

1. 研究開始当初の背景

肥満の増加には、食べ過ぎとともに極度の運動不足が関わっているというのが現在の考え方である。この過食・運動不足説が出生後の生活習慣・環境に原因を求めるのに対して、今の世代は太りやすい体質として生まれており、それが原因(あるいは一因)となって肥満が増えているのではないかという仮説が提唱されている。この仮説は、出生前に原因を求めるものであり、生活習慣病胎児期起源説(FOAD説)と呼ばれている⁽¹⁾。FOAD説による生活習慣病発症の機序は以下のように考えられている。

母体の栄養不足により、胎児が子宮内で十分に成長できなくなる。これを子宮内成長遅延 IUGR: Intra-Uterine Growth Retardation) と呼ぶ。

IUGR は、胎児が生まれ出る世界には十分な食べものがないというシグナルになる。

出生後の食べもの不足に備えるため、胎児は太りやすい体質に変化して生まれ出る。

生まれ出た世界には食べものが溢れているので、太りやすい体質に過食と運動不足が加わり、生活習慣病に罹患するリスクが高くなる。

FOAD 説はまだ仮説の域を脱していないが、これを支持する知見のひとつに「オランダ冬の飢餓事件」がある。ナチスドイツにより引き起こされたこの飢餓を胎児として経験した世代では、成人後脂質異常症、循環器系疾患が高い割合で見出された⁽²⁾。また、IUGR の指標である低出生体重は、腎系球体ネフロン⁽³⁾、膵臓細胞の減少⁽⁴⁾との関連性が報告されている(それぞれ高血圧、糖尿病リスクを高める)。さらに、母獣への栄養を制限すると、仔獣の内臓脂肪が増加する⁽⁵⁾。

日本では他国と比べて、低出生体重児が突出して多い(全出生児の 9.6%⁽⁶⁾)。低出生体重は IUGR の指標なので、FOAD 説の観点からすれば、日本では生活習慣病リスクの高い子供が増えているといえる。したがって、FOAD 説の真偽を含め、その実態、影響、メカニズムを明らかにすることは重要である。しかし、ヒトや動物を用いて調べることは倫理的、経済的な困難が伴う。

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) は、多細胞生物特有の生命現象を解析するモデル生物として確固たる実績を残している。申請者は、親線虫が飢餓を経験すると、仔線虫の脂肪蓄積量が増えることを見出した(未発表データ)。これは、次世代が太りやすい体質として生まれたことを示唆するものであり、FOAD 説と合致する。この知見に基づき、本課題では 線虫は FOAD 説を研究するための有用なモデル生物となり得るのかという点を明らかにすることを目的として、飢餓が次世代に及ぼす影響を線虫を用いて多面的に検討する。

生活習慣病は、持って生まれた遺伝素因と出

生後の生活習慣の二つが原因であると考えられてきた。しかし、世界的規模で認められる爆発的な糖尿病発症は、この二つでは説明できないと指摘されてきた⁽⁷⁾。胎内での低栄養環境により生活習慣病に罹りやすい世代が生じるという FOAD 説は、これを補完する第三の原因説として注目を集めている。線虫は、多細胞生物を研究するモデル生物として 1970 年代から計画的に開発が進められており、変異体バンクの充実、全ゲノム配列・全細胞系譜・全シナプス結合の解明、遺伝子導入法の確立など実験動物としての基盤整備は群を抜いている。その成果を利用しては乳類の寿命、記憶、筋肉生理学、アポトーシス、RNA 干渉(RNAi)、miRNA といった生命現象を分子レベルで解明するのに大きく貢献した。したがって、FOAD 説研究でも威力を発揮すると思われるかもしれないが、現実はその逆で、線虫は FOAD 説を解析するには全く役に立たないと考えられてきた。その理由は FOAD 説のメカニズムにある。

FOAD 説では胎内低栄養環境により胎児の体質が変化するとしているが、体質変化にはエピジェネティクス変異が寄与すると考えられている⁽⁸⁾。エピジェネティクス変異により、クロマチン構造が変化し、それが原因となって遺伝子の発現が生涯にわたって変化してしまうというのが体質を変化させる仕組みだと考えられている。エピジェネティクス変異には、大きく分けて DNA のメチル化とヒストンタンパク質の修飾(メチル化、アセチル化など)の二つがあるが、FOAD 説に關与するのは DNA のメチル化だろうと現在考えられている。DNA のメチル化は、ほ乳類を含む多くの生物種で認められる現象であるが、実は線虫は DNA のメチル化が起こらない生物なのである。このことから、線虫は有用なモデル生物であるにもかかわらず、FOAD 説研究に限っては役に立たないとされ、全く利用されてこなかった。

申請者もこの点は承知していたが、ものは試しと、線虫に脂質結合性蛍光試薬 NileRed を投与し、線虫体内の脂肪滴を蛍光染色したところ、飢餓を経験した親線虫から生じた仔線虫は対照群に比べ蛍光強度が強いことを見いだした。もちろん、再現性があることは確認している。これが、線虫が FOAD 説研究のモデル生物として使えるのではないかという発想に至った経緯である。なお、DNA のメチル化が起こらない線虫で FOAD 説と合致する現象が見いだされたことについては、もうひとつのエピジェネティクス変異機構であるヒストンの修飾が寄与しているのではないかと考えている。FOAD 説において、ヒストンの関与についてはほとんど研究が行われておらず、不明な部分が多い。一方、線虫ではヒストンの修飾は起こることがわかっている。

本課題の意義は二つある。一つめは、FOAD 説の研究に線虫という強力なモデル生物を

導入できるかもしれないという点である。線虫のモデル生物としての実績、基盤、認知レベルは非常に高く、このような有力なモデル生物を使うことにより FOAD 説研究が大きく進むことが期待できる。二つめは、FOAD 説の新しいメカニズムを提供できるかもしれないという点である。上述のように、線虫での FOAD 説にはヒストンが関わっている可能性があり、このことは FOAD 説を理解するうえで新しい視点を提供するものである。

日本は、諸外国に比べ低出生体重児が突出して多く、かつ一貫して増えている。これは、妊婦のやせ志向とともに、「小さく産んで大きく育てる」という出産・育児トレンドが影響しているものと思われる。FOAD 説が正しいならば、この現状は将来の医療、社会福祉、国民生活に大きな問題を生じさせる可能性がある。したがって、FOAD 説を研究することは重要であり、線虫を用いた本課題が FOAD 説の理解に全く新しい切り口を提供できるのではないかと期待できる。

(1)Hartfordshire Study(Barker DJ et al.*Lancet*,1:1077-1081(1986)) (2)Roseboom TJ et al.*Mol Cell Endocrinol* 185:93-98,2001 (3)Hughson M et al. *Kidney Int* 63:2111-2113,2003 (4)de Boo HA et al. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46:4-14, 2006 (5)Guan,H et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E633, 2005 (6)人口動態 2008 (厚生労働省) 7)Barker DJ J Intern Med 261:412-417,2007 (8)福岡秀興監「胎内で成人病は始まっている」ソニーマガジン 2005

2. 研究の目的

FOAD 説は、子宮内での低栄養状態が胎児にさまざまな体質変化を引き起こし、その体質変化が成人後の生活習慣病発症に繋がるという仮説である。例えば、母体の栄養不足による新生児の低出生体重と成人後の虚血性心疾患発症率との間には相関があると報告されている⁽¹⁾。申請者は、親線虫が飢餓を経験すると仔線虫の脂肪蓄積量が増えるという研究結果を得ている。この結果は線虫でも FOAD 説が起こっている可能性を示唆するものである。本課題では、FOAD 説の観点から、親世代の栄養状態が次世代に与える影響をモデル生物である線虫を用いて解析できることを示す。

3. 研究の方法

本課題の目的は、FOAD 説を研究するのに線虫は有用なモデルとなりえるという点を明らかにすることである。そのために、次の二点、 に絞って研究を展開する。

線虫において FOAD 説が成立することを示す

親線虫が飢餓を経験すると仔線虫の脂肪蓄積量が増えるという研究結果を機器分析、分子生物学的手法、画像解析法を用いて徹底的に検証し、確固たるものにする。

親世代の飢餓が脂肪蓄積量以外にどのよ

うな変化を仔線虫にもたらすのかを解析する

線虫における FOAD 説の全体像を明らかにするために、仔線虫への影響を多面的に解析する。具体的には仔線虫の寿命、生殖能力、成長速度、運動能力を検討する。

上記、 を明らかにするには研究期間を二年とするのが妥当である。平成 24 年度は、 を重点的かつ集中的に行う。平成 25 年度は、 の成果に基づいて を遂行する。

平成 24 年度

線虫において FOAD 説が成立することを示す

前述の通り、申請者は親線虫が飢餓を経験すると仔線虫の脂肪蓄積量が増えるという研究結果を見出している。「この結果は線虫において FOAD 説が成立していることを意味する」と考えたことが本課題の根本である。したがって、この研究結果は極めて重要である。また、線虫において親世代の栄養状態が次世代に影響を及ぼすことを示した報告はこれまでにない。よって、線虫において FOAD 説が成立することを示すには、この研究結果を徹底的、多面的に追試・検証し、確固たるものにする必要がある。

申請者の研究結果は、脂肪滴に親和性を持つ蛍光試薬 NileRed を使った蛍光画像解析実験から得られた。したがって、当該研究結果の信頼性を高めるには、NileRed 蛍光画像解析法⁽⁹⁾とは異なる手法で検討をおこなう必要がある。そのため、下記 i)~iii)を解析を行うこととする。

i)機器分析により脂肪蓄積量が増えていることを直接確認する

仔線虫から脂質画分を抽出し、TLC(薄層クロマトグラフィー)と GC(ガスクロマトグラフィー)を使った機器分析で、脂肪量を定量分析する。

ii)エサ摂取量が変化していないことを確認する

仔線虫の脂肪蓄積量が増えたのは体質変化が原因ではなく、単にエサ摂取量が増えたからだという可能性を検討する。このために、線虫の咽頭ポンピング回数を計測する。食べものを嚥下するときヒトの咽頭が上下するように、エサである大腸菌が腸に送り込まれるとき線虫の咽頭が脈動する。この脈動はポンピングと呼ばれ、ポンピング回数が多いほど腸に送り込まれる食物が多いことが既にわかっている⁽¹⁰⁾。したがって、ポンピング回数を計測することでエサ摂取量を比較することができる。飢餓線虫から生じた仔線虫のポンピング回数を計測し、仔線虫のエサ摂取量が比較対照群と比べて増えていないこと、つまり、仔線虫の脂肪蓄積量が増えたのは単にエサをたくさん食べたからではないことを確認する。

平成 25 年度

親世代の飢餓が脂肪蓄積量以外にどのような変化を仔線虫にもたらすのかを解析する

現在のところ、仔線虫の脂肪蓄積量が増えること以外に、親線虫の飢餓体験が次世代に影響を及ぼすことを示すデータは得られていない。しかし、ヒトにおける低出生体重は、糖尿病や虚血性心疾患との関連が認められる^(1~4)ことから、親線虫の飢餓体験は脂肪蓄積量以外のさまざまな性質に影響を与えている可能性がある。そこで、親世代の飢餓体験が次世代に及ぼす影響の全体像を得るために、飢餓を経験した親線虫から生じた仔線虫の性質を詳細に解析する。具体的には仔線虫の寿命、生殖能力、成長速度、運動能力を検討する。

i) 寿命への影響

多くの生物において、摂取カロリーが制限されると寿命が延びる⁽¹¹⁾。IUGRでは胎児の摂取カロリーが減少していることから、低出生体重児はカロリー制限による寿命延長効果を受けている可能性が考えられる。しかし、これをヒトで検証するのは極めて困難である。この可能性を検証するため、飢餓を経験した親線虫から生じた仔線虫の寿命を解析する。

ii) 生殖能力への影響

多くの生物において、生殖能力は寿命と反相関の関係にある⁽¹¹⁾。例えば、カロリー制限がかかると寿命が延びる反面、生殖能力は止まることが多い。このことは、IUGRを経験すると生殖能力に変化が生じる可能性が指摘される。この可能性を検証するため、飢餓を経験した親線虫から生じた仔線虫の生殖能力を検討する。生殖能力は、一匹の仔線虫が産出する線虫数(孫線虫数)を計数することで評価できる。

iii) 成長速度、運動能力への影響

個体の成長速度と運動能力には、出生後の栄養状態が大きな影響を及ぼすとされている。これをFOAD説の観点から検証するため、飢餓を経験した親線虫から生じた仔線虫の成長速度と運動能力を検討する。線虫は頭部を左右にリズムカルに振りながら動くので、このリズムを比較することで運動能力を定量化して比較することができる⁽¹⁰⁾。

研究体制

本課題は、申請者本人と研究室に配属される4年生(9名)でおこなう予定である。4年生は研究に関する知識、技術とも十分ではないが、体得すべき実験手法を絞り込むことで集中的、効率的に研究を展開する。

(9)Srinivasan S et al. Cell Metab
7:533-544,2008

(10)Riddle DL(ed) et al. C.elegans II
679-716,CSHP,1997

(11)Mair W et al. Annu Rev Biochem

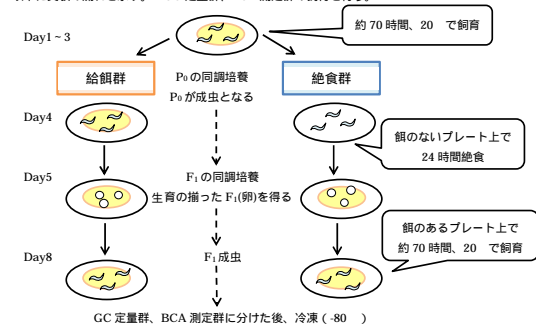
77:727-754,2008

4. 研究成果

線虫の飢餓体験が次世代のATP蓄積状況に及ぼす影響の解析

これまでの研究結果より、「飢餓体験により次世代の脂肪蓄積量は増加する」ということが明らかになった。この脂肪蓄積量の増加は、エネルギーを蓄積しやすい体質となることに関連すると示唆される。このことから、本研究ではエネルギー出納、中でもATP量の蓄積状況に着目し、研究を進めることとした。飢餓体験が次世代に及ぼすATP量の解析を目的とする。下記の図は、ATP測定のための線虫の処理プロトコールである。

以下に実験の流れを示す。GC定量群、BCA測定群の飼育を行う。



・手法

ATP測定の原理

ATPは高エネルギーリン酸結合した化合物である。ATP量はATPの合成、ATPの消費の2つのパラメーターで決まる。従って、ATPを測定することでエネルギーが余っている状態か、少なくなっている状態かが判断できると考えた。

ATPはルシフェラーゼの存在下でルシフェリンと反応して、その発光量をルミノメーターで測定することで測定した。線虫の細胞からATPを溶出させ、続いてルシフェラーゼ反応を行う。

・結果と考察

ATP測定は4回行い、そのうち3回の実験において絶食群が給餌群に比べてATP量が多いという結果となった。

これより、飢餓体験を経験することで次世代はエネルギーを消費しにくく、体内に蓄えるという傾向があると考えられる。そして、この結果は本研究室で行われた「飢餓体験により次世代の脂肪蓄積量は増加する」という研究結果を指示する者である。ATP量が多いということはエネルギーを豊富に蓄えることに繋がり、その結果、脂肪という形で体内に貯蔵されると考えられるからである。

線虫の飢餓体験が次世代に及ぼす脂肪蓄積量の機器分析的解析

・目的

一昨年の本研究室において飢餓を経験した親線虫から産まれた仔線虫の脂肪蓄積量の解析を、蛍光顕微鏡を用いて行った。この結

果を補強するため、飢餓を体験した線虫から生じた子線虫体内から脂質を抽出し、機器分析により脂肪量を直接定量した。その結果、飢餓体験は次世代の脂肪蓄積量を増加させることが明らかとなった。

・結果

初めに、餌として使っている大腸菌からの脂質量が線虫の脂肪蓄積量に与える影響はほとんど無いことを確認した。

次に線虫から脂肪を抽出し、脂肪蓄積量の定量は4回行ったが、1回目の定量は給餌群TG量の検出が出来なかったため結果に含めることは出来ない。残り3回のうち2回の実験において絶食群が給餌群に比べて総脂質量が多いという結果となった。これより、飢餓体験を経験することで次世代は体内に脂肪を蓄えるようになる傾向があると考えられる。

また、脂質量測定操作においてTG量とリン脂質量を個別に定量した。そして、TG量においても3回のうち2回の実験において絶食群が多いという結果となった。これより、絶食群の脂肪量が増加したことが示唆され、飢餓体験によって次世代の脂肪蓄積量が増加するという仮説に合致する結果であった。

・考察

これらの研究結果は、これまでに得られた本研究室で行われた「飢餓体験により次世代の脂肪蓄積量は増加する」という蛍光顕微鏡を用いた研究結果を支持するものとなると考える。本研究では総脂質量において、給餌群に比べ絶食群が2回目は1.36倍、3回目は1.25倍、4回目は0.83倍の脂肪蓄積量であった。一昨年の研究結果では1回目1.94倍、2回目1.15倍、3回目1.34倍の蛍光強度であり、いずれも絶食群が給餌群に比べ高い値となった。これらより、脂肪蓄積量において蛍光強度の測定とGCでの定量は同様の傾向があると示唆され、本実験は先行実験を生化学的に支持すると考える。

また、この結果は1章で述べた「飢餓体験により次世代のATP量は増加する」という研究結果との関連性が挙げられる。ATP量が多いということはエネルギーを豊富に蓄えることに繋がり、その結果、脂肪という形で体内に貯蔵されるという流れを考えることが出来る。よって、ATP量の増加と脂肪蓄積量の増加は矛盾がないと考えられる。このことから、飢餓体験は次世代のエネルギー消費を低下させることにより、体内に脂肪を蓄積しやすい性質にする傾向があると考察される。

FOAD説によると、「胎児期の低栄養によって将来の生活習慣病の罹患率が高くなる」とされている。本章では、胎児期の低栄養によって生活習慣病の罹患率が高くなる要因は、胎児期の低栄養に適応するために、効率よく栄養を蓄える体質に変化し、肥満になりやすくなるためであると考え、実験を行った。よ

って、本研究結果はFOAD説に合致した結果となったといえる。

本研究において「飢餓体験によって次世代の脂肪蓄積量は増加する」ということが機器分析で直接定量することにより明らかとなった。よってこの結果に基づき、今後は脂肪蓄積遺伝子の発現量を測定することによって、より生化学的にFOAD説のメカニズムの解明を進めていくことを課題としたい。

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)

1. Kohta Ohnishi, Shinya Ohkura, Erina Nakahata, Akira Ishisaka, Yoshichika Kawai, Junji Terao, Taiki Mori, Takeshi Ishii, Tsutomu Nakayama, Noriyuki Kioka, Shinya Matsumoto, Yasutake Ikeda, Minoru Akiyama, Kazuhiro Irie, Akira Murakami, Non-specific Protein Modifications by a Phytochemical Induce Heat Shock Response for Self-Defense. PLOS ONE 査読有, 8, 2013, pp.1-15

2. 木村理恵, 麻生知子, 相馬顕子, 森友彦, 松村康生, 松本晋也, 長期的な酸化脂質摂取が線虫の生殖能力と寿命に与える影響. 京都女子大学食物学会誌 査読有 67, 2012, pp.37-44

[学会発表](計 1件)

Shinya Matsumoto, Kosuke Kato, Yasuki Matsumura, Nao Sato, Yukari Yamamoto, Akari Sawanaga, Effect of repeated starvation on fat content in C.elegans. 19th International C.elegans Meeting, UCLA(Los Angeles, USA) June 26-30, 2013

[図書](計 2件)

1. 有園幸司, 石橋弘志, 石橋康弘, 伊藤貴美子, 岡本誉士典, 甲斐穂高, 古賀伸幸, 柴田祥江, 杉原数美, 高尾雄二, 瀧口益史, 春山洋一, 松原斎樹, 松本晋也, 山元涼子

川添貞治(編)

健康と環境の科学(講談社)2014

担当執筆 第1章2節

2. 松本晋也, 他多数,

灘本知憲, 仲佐輝子(共編)

新食品・栄養科学シリーズ基礎栄養学(化学同人)2012, 執筆担当第10章, 第11章

[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
京都女子大学家政学部食物栄養学科松本晋也
<http://gyouseki-db.kyoto-wu.ac.jp/2/0000128/profile.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
松本晋也 (Shinya Matsumoto)
京都女子大学家政学部食物栄養学科・准教授
研究者番号：30263156

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし