

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860914

研究課題名(和文) 初期栄養計画の新たな指標としての新生児オートファジー研究

研究課題名(英文) Neonatal autophagy assessment as a new indicator of initial nutrition plan

研究代表者

関口 和人 (Sekiguchi, Kazuhito)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40437926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは非選択的タンパク分解機構で出生直後飢餓応答機構の一つと考えられている。本研究では出生直後新生児臍帯の凍結標本からのオートファジー指標蛋白(LC3-)評価法の確立および、その臨床背景との関連を検討した。ウエスタンブロット法を用いてヒト凍結臍帯組織からLC3- 発現量を半定量することが可能となった。入院治療を要した新生児において、出生直後の臍帯組織LC3- 発現量は入院時に評価した静脈血糖、総蛋白と正相関する傾向にあった。オートファジーがヒト新生児において栄養産生や胎内発育に関与しているかどうかについて、さらなる検討が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is thought to be a mechanism of starvation response immediately after birth. The aim of this study was to establish the method of evaluation for autophagy indicator (LC3-) from frozen specimens of newborn umbilical cord immediately after birth and to correlate them with clinical background.

With Western blotting method, It became possible to semiquantitate LC3- expression level from human frozen umbilical cord. The expression level of LC3- tended to positive correlate with neonatal blood glucose and total protein on admission. Further studies are needed on whether autophagy is involved in nutritional production or embryonic development in neonates.

研究分野：新生児学

キーワード：オートファジー 新生児 臍帯

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物は出生直後、胎盤からの栄養供給が突然遮断され飢餓状態に陥る。出生に莫大なエネルギーを要するにもかかわらず、ほとんどの児は初回哺乳までの数時間を問題なく過ごすことができる。

オートファジーは細胞内クリアランス機構として恒常的に発現されるのみならず、出生および直後の栄養遮断状態を乗り切るためのエネルギー捻出機構として誘導され、重要な役割を果たしていると考えられている。



図1. オートファジーの多様な役割

オートファジーと新生児に関しては、これまでに ATG5 と ATG7 (オートファジー関連遺伝子) 変異マウスが報告されている。いずれの遺伝子変異マウスも外見はほぼ正常に出生するが、ATG5 ノックアウトマウスは出生後1日で哺乳不良で死亡し、神経細胞や肝細胞に蛋白の凝集体 (オートファゴゾームの形成不全) が蓄積していた¹⁾²⁾。しかし、ヒトでの検討は乏しい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト臍帯組織を用いたオートファジー活性の定量化法を確立し、出生直後の低栄養 (低血糖、低蛋白血症等) との関連を明らかにすることである。

1) ヒト臍帯組織を検体としたオートファジー定量化法を確立する。

2) オートファジー活性と出生後臨床所見の相関を明らかにし、オートファジー活性を新生児初期栄養管理の新たな指標となり得るかを検討する。

3. 研究の方法

対象は当院出生で本研究 (当院倫理委員会承認を経て実施した) への参加について家族同意が得られた新生児とした。

1) 出生直後に凍結保存した臍帯組織からオートファジー指標 (LC3-⁺, LC3-⁻) を抽出し、ウエスタンブロットで β -アクチンとのピクセル比として半定量する方法を確立する。凍結臍帯標本からの最適な蛋白抽出方法を確立するために、薄切方法や、溶解試薬の選定、均質化時間等の検討を行った。画像解析には既存の画像解析ソフト (Image J 等)

を用いた。

臍帯標本の採取においては、新生児蘇生術や、良好な母児関係確立の妨げにならないように十分に配慮した。

2) 出生後、入院加療を要した新生児 18 例 (在胎週数中央値 36 週 (27 週-41 週), 出生体重中央値 2,237g (993g-4,130g)) について、得られた LC3-⁺, LC3-⁻, p62 半定量値と臨床所見 (胎盤重量, 新生児計測, 臍帯動脈・新生児静脈血液ガス, 入院時血糖, 入院時総蛋白) との相関を検討した。これら検査は、通常の診療として実施されたもので、診療記録から抽出した。LC3-⁺, LC3-⁻, p62 半定量値と臨床数値の相関検討は、SPSS を用いてスピアマン順位相関係数検定で検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

凍結臍帯標本を 10 μ m 巾で薄切し、lysis buffer とともに homogenize、超音波破碎し、煮沸、遠心分離して蛋白抽出液を作成することで LC3 を検出することが可能となった。LC3 の検出は、抗 LC-3 抗体を用いたウエスタンブロット法によって実施した。

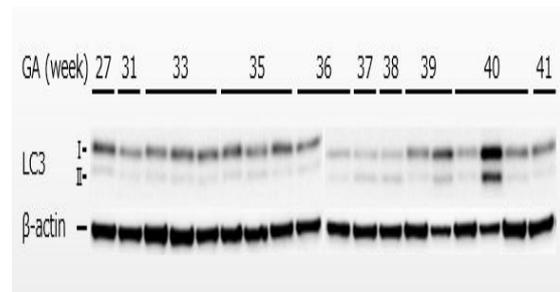


図1. 新生児凍結臍帯における LC3 の検出 (ウエスタンブロット法)

新生児 18 例における LC3-⁺ 半定量値は入院時静脈血糖 ($r=0.55$, $p=0.02$)、入院時総蛋白 pH ($r=0.51$, $p=0.02$) と正相関の傾向を認めた。

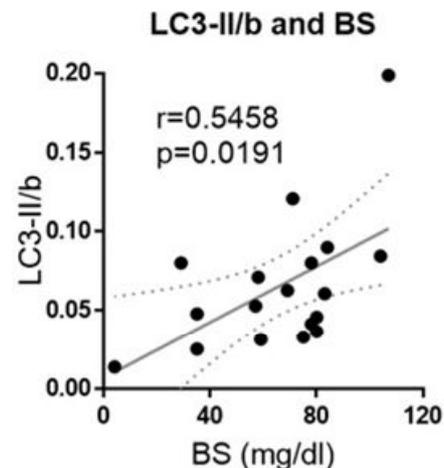


図2. LC3-⁺ と新生児血糖の相関

(BS:血糖、LC3- /b:LC3- および アクチン発現量のピクセル比)

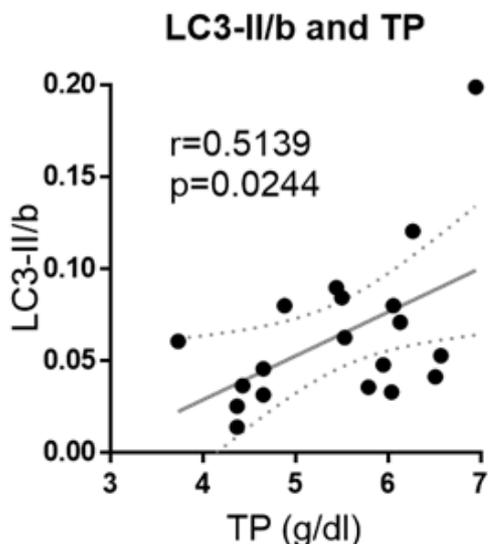


図3. LC3- と新生児血清総蛋白との相関 (TP: 総蛋白、LC3- /b: LC3- および アクチン発現量のピクセル比)

<考察>

肝臓特異的オートファジー (*Atg7*) 阻害マウスでは非阻害マウスに比してアミノ酸分泌が起こらず、低血糖が遷延することが報告されている³⁾。

本研究において LC3- 発現半定量値と新生児栄養指標との間に正相関の傾向を認められたことが、ヒト新生児においてオートファジーが新生児栄養指標の維持に貢献しているか、もしくは、他の別の周産期因子が関連しているのかは明らかにすることができていない。

今回の検討は症例数が少ないこと、各症例の臨床背景の多様から対象の均一性が担保できていないことが制限事項となった。また、迅速診断としては活用困難なウエスタンブロット法を用いていることから、多症例での検討を行うためには、Real time PCR 法の導入など、さらなる検討が望まれる。

本研究はヒト臍帯を用いた独創的、非侵襲的な研究ではあったが、上記の制約事項が、結果解釈を困難とした。飢餓とオートファジーの関連を明らかにするには研究背景の均一化や、標的臓器の選択を増やす必要があり、培養細胞や動物実験系による基礎的研究に拠るべきところが大きいと考えられた。

<引用文献>

- 1) Kuma A et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004;432:1032-6.
- 2) Komatsu M et al. Impairment of starvation-induced and constitutive

autophagy in *Atg7*-deficient mice. *J Cell Biol*. 2005;169(3):425-34.

3) Ezaki J et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy*. 2011;7:727-36.

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0件)

上記結果について論文投稿を検討中である。

〔学会発表〕(計1件)

第117回日本小児学会学術集会、2014年4月12日

関口 和人 他. 新生児臍帯組織を用いたオートファジー関連蛋白質解析. 愛知県・名古屋市 (日本小児科学会雑誌 2014; 118: 312)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関口 和人 (SEKIGUCHI, Kazuhito)

大分大学・医学部小児科学講座・助教

研究者番号: 40437926

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()