

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860437

研究課題名(和文)胎生期DEHP曝露による慢性炎症を基盤とした生活習慣病進展メカニズム

研究課題名(英文)Development mechanism of life-style disease based on chronic inflammation by fetal exposure to DEHP

研究代表者

林 由美(Hayashi, Yumi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30632707

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)：胎生期フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)曝露は離乳後から成熟期にかけて摂食行動を亢進させた。また、DEHP曝露は成熟期の血中グルコースおよびコレステロール濃度を上昇させたことから、糖尿病や脂質異常症などを引き起こす可能性が示唆された。一方、DEHP曝露により強い炎症状態を引き起こしている可能性は低く、今後は軽度の炎症状態評価法について検討する。また、内因性代謝物の網羅的解析(メタボロミクス)の新規分析法を構築した。この手法を用いて、胎生期DEHP曝露との関連について今後検討を行っていく。

研究成果の概要(英文)：DEHP exposure during fetal period upregulated food consumption after weaning, and increased blood glucose and cholesterol level in adult stage. These effects suggest that fetal exposure to DEHP may cause diabetes or dyslipidemia in adult life. On the other hand, it was unlikely that these mice exposed DEHP presented with intense inflammatory condition, therefore, we will consider new methods for evaluating mild inflammation in the future. In addition, we established new analytical method of metabolomics, and the influence on metabolomics of fetal exposure to DEHP will evaluate using this method.

研究分野：衛生学

キーワード：胎生期低栄養 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

近年、胎生期の環境が成長後の疾病リスクにつながるという考え方が注目され、多くの動物実験や疫学調査が行われてきた。母親の食生活による低栄養環境は、子の成長後の耐糖能異常や虚血性心疾患等のリスクを上げる。また、日本における大規模な疫学調査により、母親の化学物質曝露と生まれてくる子のアレルギーや代謝・内分泌等に及ぼす影響について調査(エコチル調査)が行われている。このように胎生期環境について多くの関心が集められている中、申請者らは化学物質曝露による母親の低栄養が仔の摂食行動に影響をもたらすことを明らかにした。プラスチック可塑剤であるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)は、妊娠期曝露により胎仔・新生仔の生存数を減少させる。また、妊娠維持に重要とされる母親の血漿中トリグリセライドおよび必須脂肪酸濃度を減少させ、母親の低栄養状態を引き起こすと報告した(1,2)。さらに、この胎生期低栄養環境下で育った仔を成熟期まで育てたところ、摂餌量が増加し、摂食抑制ホルモンであるレプチン濃度は減少していた(未発表データ)。申請者らはDEHPの生殖・次世代影響に核内受容体 PPAR α の関与を示唆しており(1)、PPAR α ノックアウトマウスを用いて実験を行なったところ、摂餌量やレプチンは変化しなかった。したがって、胎生期 DEHP 曝露は PPAR α を介してレプチンが減少し、摂餌量が増加したと考えられる(論文作成中)。このような摂食行動亢進は、肥満を引き起こし、さらに耐糖能異常や脂質代謝異常などの生活習慣病へと進展する可能性は十分に考えられる。

肥満は肥大化した脂肪細胞から炎症性サイトカインを産生し、アディポネクチン分泌は抑制されることで炎症を引き起こす。これが慢性炎症となり、糖尿病をはじめとする生活習慣病を引き起こすことから、生

活習慣病は慢性炎症が病態基盤となっていると考えられている。すなわち、妊娠期 DEHP 曝露→母親の低栄養→子の低栄養→摂食行動促進→肥満→慢性炎症→生活習慣病へと進展すると推察される。さらに、PPAR α は脂質・糖代謝、さらには炎症にも関与していることから、この一連の反応に影響を与えると考えられる。

これまで、化学物質曝露は胎児・新生児期への影響について評価されることが多かった。しかし、胎生期の環境と成長後の影響を評価することが重要視されるようになり、大規模な疫学調査が始まった。一方で、メカニズムの解明には動物実験は必須であり、胎生期化学物質曝露による低栄養の生活習慣病進展メカニズムの解明は、エコチル調査にとっても有用な情報を提供できる。

2. 研究の目的

胎生期 DEHP 曝露仔マウスの成熟期における生活習慣病進展の評価

・胎生期 DEHP 曝露による低栄養環境が成長後の生活習慣病を引き起こすか否かを明らかにする。

→血糖や脂質濃度を測定し、糖尿病や脂質代謝異常などの生活習慣病の有無を判断する。

新生仔期、離乳期、成熟期における慢性炎症の有無、生活習慣病との関連の解明

・胎生期 DEHP 曝露仔マウスの各時期における慢性炎症関連因子から炎症の有無を確認する。

・炎症の結果を基に胎生期 DEHP 曝露が生活習慣病に進展する過程の分子基盤を明らかにする。

→炎症性サイトカインや炎症制御因子である PPAR α など炎症関連因子の発現量測定を行い、炎症の有無を確認する。これにより、どの時期にどの程度の炎症がどのシグナルによって起きているかを解明する。

3. 研究の方法

胎生期 DEHP 曝露と生活習慣病との関連性を明らかにする。

胎生期 DEHP 曝露マウスが、成熟期に糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病を引き起こすか否かを、血糖値や脂質濃度を測定し明らかにする。

【方法】

1) 動物実験

- ・ 12 週齢雌雄の野生型マウスに DEHP を 0, 0.01 または 0.05% 混餌投与した。
- ・ 4 週間後、同投与量のマウスを交配し、離乳するまで曝露を続けた。
- ・ 生後 21 日目に離乳し、30 週齢まで通常食を自由摂取させた。
- ・ 体重、摂餌量は 1 週間毎に測定した。
- ・ 生後 30 週齢で解剖し、各種臓器(肝臓、脳、腎臓、腎周脂肪、精巣、精巣上体、精巣周囲脂肪)および血液を採取した。

2) 生活習慣病関連因子測定

- ・ 血糖値、トリグリセライド、コレステロール、肝機能マーカーを測定し、生活習慣病の有無を確認した。

胎生期 DEHP 曝露と慢性炎症との関連性を明らかにする。

生活習慣病の病態基盤として考えられている炎症に着目し、胎生期 DEHP 曝露が炎症を引き起こす時期や程度、炎症に関わるサイトカインについて検討する。これらと生活習慣病進展との関連について検討する。

本研究では、離乳期および成熟期のマウスの各時期における炎症を解析し、胎生期 DEHP 曝露から生活習慣病進展への一連の変化を把握する。

【方法】

1) 動物実験

・上記と同様、DEHP を 0, 0.01 または 0.05% 曝露した。

・ 4 週間後に交配し、解剖まで曝露を続けた。

・ 生後 21 日目または 11 週齢に解剖し、肝臓および血液を採取する。

2) 炎症評価

上記の生後 21 日目、11 週齢または 30 週齢マウスのサンプルを用いて、炎症関連因子である IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF, IL-12p70 を測定した。

4. 研究成果

胎生期 DEHP 曝露マウスの体重および摂餌量を離乳 1 週間後 (4 週齢) から測定したところ、DEHP 曝露によって体重に影響は見られなかった(Fig.1)が、摂餌量は 0.01% 曝露群において 4-17 週齢において有意に増加し、0.05% 曝露群においても 15-17 週齢で Control 群に比べ有意に増加した (Fig.2)。一方、0.05% 曝露群の 5 週齢では Control 群に比べ有意に減少した。

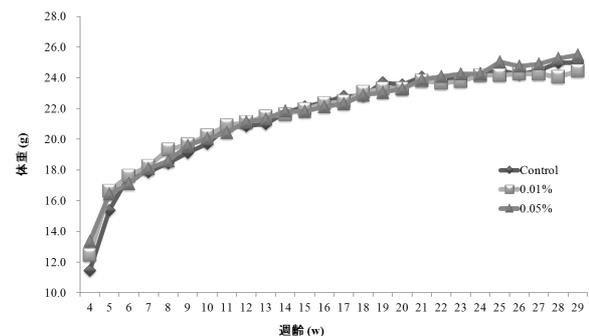


Fig1. 離乳後の体重変化

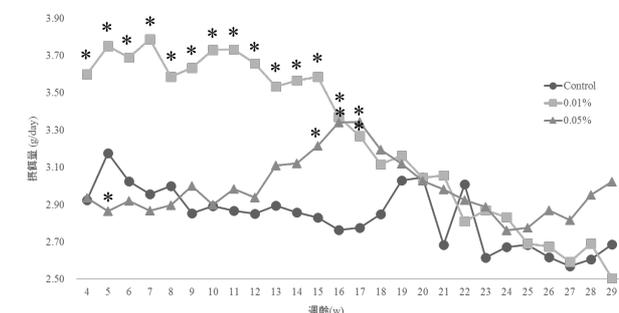


Fig2 離乳後の摂餌量

また、生後 30 週齢で解剖したマウスの体重および各種臓器重量は胎生期 DEHP 曝露による有意な差は認められなかった (Table.1)。

Table 1. 30 週齢マウス体重及び臓器重量(g)

	体重	脳	肝
Control	25.29 ± 2.00	0.43 ± 0.02	0.93 ± 0.12
0.01%	24.80 ± 1.55	0.43 ± 0.02	1.00 ± 0.09
0.05%	24.55 ± 1.65	0.43 ± 0.01	0.91 ± 0.12

	相対肝重量	腎	腎脂肪
Control	0.037 ± 0.004	0.33 ± 0.04	0.19 ± 0.04
0.01%	0.041 ± 0.003	0.33 ± 0.03	0.15 ± 0.04
0.05%	0.037 ± 0.005	0.35 ± 0.09	0.18 ± 0.04

	精巣	精巣上体	精巣脂肪
Control	0.19 ± 0.01	0.064 ± 0.004	0.60 ± 0.21
0.01%	0.18 ± 0.03	0.061 ± 0.007	0.43 ± 0.18
0.05%	0.19 ± 0.02	0.064 ± 0.008	0.55 ± 0.14

胎生期 DEHP 曝露による成長後の生活習慣病について検討するため、血液中のグルコース、トリグリセライド、総コレステロール、肝機能マーカー (ALT, AST, γ -GTP) アルブミンを測定したところ、0.05% 曝露群でグルコースおよび総コレステロールの有意な増加が認められた (Fig. 3, 4)。また、グルコースに影響を与えるインスリン濃度を測定したが、有意な差は認められなかった (Fig. 5)。

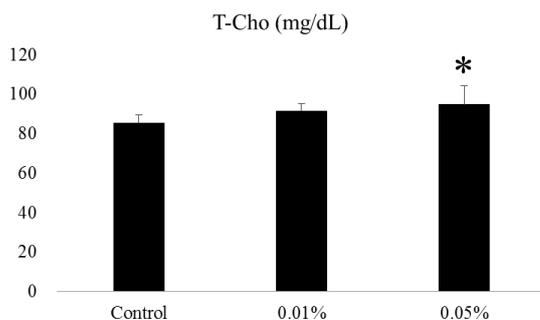


Fig. 3 血漿中総コレステロール濃度

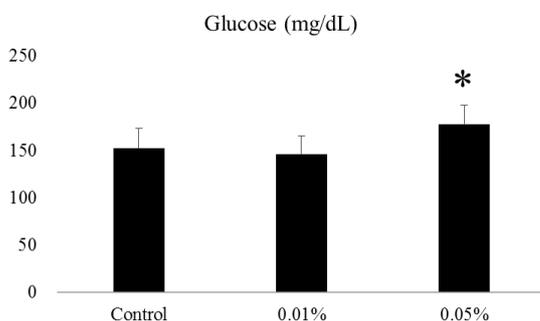


Fig. 4 血漿中グルコース濃度

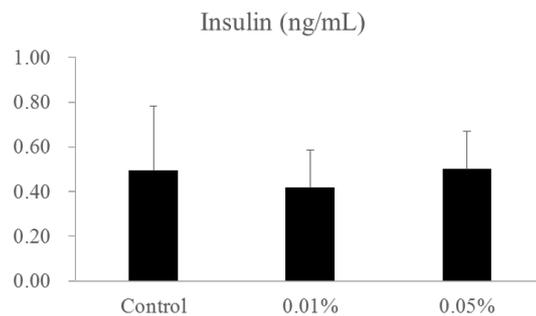


Fig. 5 血漿中インスリン濃度

以上の結果から、胎生期 DEHP 曝露は離乳後から成熟期にかけて摂餌量が増加し、糖質・脂質異常症を引き起こすことが示唆された。

また、これらと炎症との関連を明らかにするために、生後 21 日および 30 週齢で炎症関連マーカーを測定した。BD Biosciences 社製の Cytometric Beads Array キットを用いてフローサイトメーターで IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF, IL-12p70 を測定した。すべてのマーカーにおいて検出限界以下となり、DEHP 曝露による炎症は確認できなかった。さらに ELISA キットを用いて MCP-1 を測定したが、DEHP 曝露による影響は認められなかった。また、炎症に関連する PPAR α 発現量について生後 21 日目および 11 週齢マウスの Control 群および 0.05% 曝露群で測定したところ、曝露による有意な変動は確認できなかった (Fig. 6)。

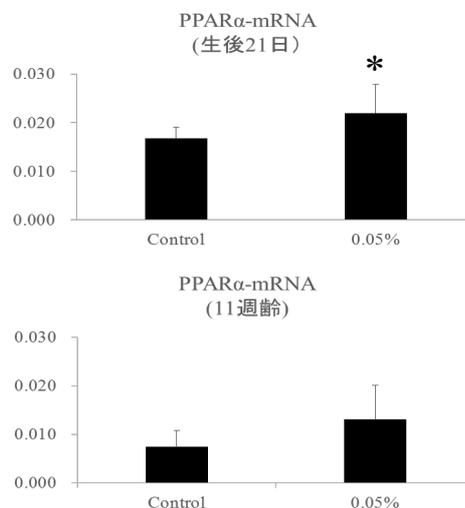


Fig. 6 PPAR α 遺伝子発現量

従って、胎生期 DEHP 曝露は成長後の強い炎症状態を引き起こしている可能性は低いと考えられる。しかし、軽度の炎症でも持続的に起こることで、成熟期の疾患に影響を与える可能性も十分考えられるため、引き続き炎症との関連について検討を行なっていく。

胎生期 DEHP 曝露は摂餌量の増加や糖質・脂質濃度に影響を与えたことから、解糖系や TCA 回路などのエネルギー代謝系にも影響を与える可能性が考えられる。そこで、内因性代謝物の網羅的解析（メタボローム分析）を行なうため、新規分析法の構築を試みた。探針エレクトロスプレーイオン化法（PESI）は抽出や濃縮等の前処理が不要なイオン化法であり、これをタンデム質量分析計（MS/MS）に接続し、メタボローム分析手法の検討を行った。マウス肝臓を解剖により摘出し、約3cm角に切り出し、サンプルプレートにセットした。そこに、50%エタノール溶液を 30 μ l 添加し、PESI/MS/MS を用いて内因性代謝物の分析を行なったところ、マウス肝臓から 26 成分が検出された。次に、本法の有用性を確認するため、四塩化炭素誘導性肝障害モデル動物に適用し、肝臓内のメタボライト直接分析を行なった。対照群マウスとモデルマウスのメタボライトの結果の主成分分析を行なったところ、両群が明確に分離した（Fig. 7）。従って、本法によりメタボライトの変動を直接捉えることが可能であることが示された。

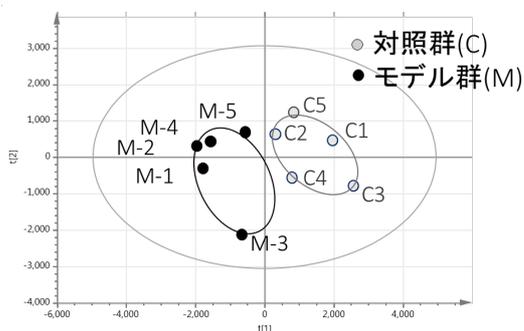


Fig. 7 主成分分析の結果

また、既報の GC/MS/MS メタボローム分析法を用い、PESI/MS/MS 分析法について検証したところ、PESI/MS/MS の結果と有意な相関が認められた（Fig. 8）。従って、本手法はメタボローム分析に有用であることが示唆された。

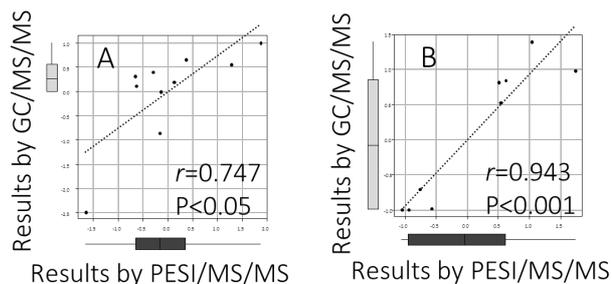


Fig. 8 GC/MS/MS と PESI/MS/MS の結果の相関（A, グルタミン酸, B, タウリン）

本手法を麻酔下で“生きたまま”のマウス肝臓内メタボローム分析法について応用した。TCA 回路の変動をリアルタイムで解析するために、門脈カニューレーションを行なったマウスにピルビン酸を投与し、肝臓内の TCA 回路構成成分である α -ケトグルタル酸およびフマル酸の変動を補足できるか検討した。測定開始 4.5 分後にピルビン酸を投与したところ、投与直後に TCA 回路構成成分の急激な上昇が認められた（Fig. 9）。

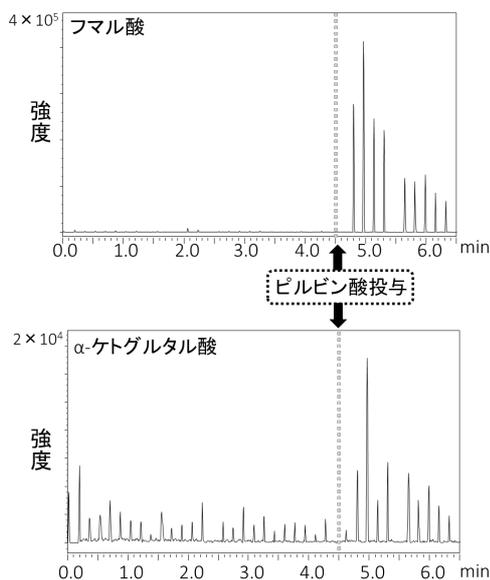


Fig. 9 リアルタイム・モニタリングによるモニタリング図

従って、本手法はリアルタイム・モニタリングへの応用も可能な分析手法であることが示された。本手法は抽出や濃縮等が不要であることから、前処理によるバイアスが除去できる。さらに、1 回当たりの測定時間も 0.25 分であることから迅速分析が可能である。従って、今後、本手法を用いて胎生期 DEHP 曝露によるメタボライトの変動について検討し、成熟期の糖質・脂質代謝との関連について検討する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. NAKAJIMA Tamie, HAYASHI Yumi, ITO Yuki. Prenatal Exposure to Di(2-ethylhexyl) phthalate and Subsequent Infant and Child Health Effects. Food Safety. 3(3), 70-83. 査読有

2. Kei Zaitso, Yumi Hayashi, Tasuku Murata, Tomomi Ohara, Kenta Nakagiri, Maiko Kusano, Hiroki Nakajima, Tamie Nakajima, Tetsuya Ishikawa, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Intact Endogenous Metabolite Analysis of Mice Liver by Probe Electrospray Ionization/Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry and Its Preliminary Application to in Vivo Real-Time Analysis. Anal Chem. 2016 Apr 5;88(7):3556-61. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 林由美、伊藤由紀、那須民江。フタル酸ジ-2-エチルヘキシル曝露による胎生期・発達毒性。第 41 回日本毒性学会年会(招待講演)。2014 年 7 月 2 日~7 月 4 日神戸。

2. 林由美、伊藤由紀、那須民江。胎生期 DEHP 曝露がグルコースとレプチンに与える影響。第 85 回日本衛生学会学術総会。2015 年 3 月 26 日~3 月 28 日和歌山。

3. Yumi Hayashi, Kei Zaitso, Tasuku Murata, Hiroki Nakajima, Tamie Nakajima, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii, Tetsuya Ishikawa. Intact metabolome analysis of mice liver by

probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry (PESI-MS/MS). 63rd American Society for Mass Spectrometry Conference. 2015 年 5 月 31 日~6 月 4 日. St. Louis, Missouri.

4. 林由美、財津桂、村田匡、大原倫美、中切健太、草野麻衣子、那須民江、中島宏樹、石川哲也、土橋均、石井晃。探針エレクトロスプレー/タンデム質量分析(PESI/MS/MS)によるマウス肝臓内のメタボローム直接分析法(インタクト・メタボローム分析法)の構築。第 40 回日本医用マスペクトル学会年会。2015 年 9 月 17 日~18 日。浜松。

5. Kei Zaitso, Yumi Hayashi, Tasuku Murata, Hiroki Nakajima, Tamie Nakajima, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Tetsuya Ishikawa, Akira Ishii. Real-time metabolome analysis by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry (PESI-MS/MS): preliminary challenge to real-time metabolomics. 2016 年 3 月 6 日~10 日。Atlanta, GA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：質量分析装置及び該装置を用いた生体試料の分析方法

発明者：財津桂、林由美、村田匡

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2016/057457

出願年月日：2016 年 3 月 9 日

国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林由美 (HAYASHI Yumi)

名古屋大学・大学院医学系研究科 助教

研究者番号：30632707