

シンポジウム3 動物モデルを用いた DOHaD 学説の検証

座長：久保田健夫（山梨大学）、伊東 宏晃（浜松医科大学）

生活習慣病の胎生期発症仮説（DOHaD）は、第二次世界大戦中のオランダや飢饉の際の中国において、その時代に出産した世代が、その前後の世代に比較して、糖尿病や肥満、精神疾患が多いとの疫学調査結果が報告されたことに端を発する概念である。これにより、「母体の栄養摂取不良に起因する胎生期の低栄養環境が、胎児体内に生活習慣病の源を形成する」と考えられるようになった。しかしながら、生物学的エビデンスは明らかでなかった。

これを受けて、1) 胎生期の低栄養環境暴露が本当に生活習慣病の源を形成するのか、2) 形成するとしたら、その生物学的変化はどのようなものであるのか、3) また DOHaD の影響は環境暴露を受けた胎児の世代だけでなく、その子孫にも伝わるとの見解もあり、そうだとしたら、遺伝学的変化が伴うのか、といった疑問が投げかけられた。

本シンポジウムでは、これらの疑問に答えるためにラットやマウス等の実験動物を用いて研究を行っている方に、最新の研究成果を報告する。具体的には、伊東が胎生期の低栄養による生活習慣病や肥満の発症リスク形成の生物学的変化について、杉山は胎生期の栄養過多による生活習慣病発症リスク形成の生物学的変化について、鈴木は妊娠中の胎児感染症である絨毛膜羊膜炎に基づく胎児の諸臓器の発達や発育への影響について、久保田は胎生期低栄養に代表される環境ストレスによる遺伝子 DNA の修飾変化（エピジェネティクス変化）とその次世代への遺伝の可能性について、自身のデータや最新知見を紹介する。

最近では、逆に、動物実験で得た生物学的変化を、低栄養暴露を受けた世代などのヒトで実証する研究も行われ始めている。本シンポジウムを通じ、会場の研究会会員の皆様と、DOHaD の生物学的意義や影響について、活発な議論が行えたら、と考えている。

【シンポジストの略歴】

伊東 宏晃（浜松医科大学）

- 1986年 京都大学医学部医学科卒業
- 1987年 国立姫路病院、医員
- 1988年 兵庫県立尼崎病院、技術吏員（医師）
- 1990年 京都大学医学部附属病院、産婦人科、医員
- 1994年 京都大学医学部附属病院、産婦人科、助手
- 1996年 ウィスコンシン州立大学マジソン校産婦人科 Visiting Assistant Professor (2年間)
- 2005年 京都大学大学院医学研究科、婦人科学、講師
- 2007年 国立病院機構大阪医療センター、産婦人科、医員
- 2008年 浜松医科大学附属病院周産期母子センター、講師
- 2009年 同上、准教授
- 2011年 同上、病院教授
- 2011年より 同上、センター長

杉山 隆（東北大学）

- 1988年 関西医科大学医学部医学科卒業
- 1988年 三重大学医学部附属病院産婦人科研修医
- 1989年 三重大学大学院医学研究科（博士課程）機能系生化学専攻入学
- 1993年 同博士課程修了

- 1993年 三重大学医学部附属病院産科婦人科医員
- 1994年 三重大学医学部産科婦人科助手
- 1995年 米国テネシー州バンダービルト大学医学部分子生理生物学教室に研究員で留学
- 1998年 三重大学医学部産科婦人科助手
- 2000年 大阪府立母子保健総合医療センター産科主任勤務
- 2001年 三重大学医学部附属病院周産母子センター講師
- 2001年 三重大学大学院医学系研究科病態解明医学生殖病態解明学
および附属病院周産母子センター助教授
- 2007年 同准教授
- 2012年より 東北大学大学院医学系研究科医科学専攻発生・発達医学講座周産期医学分野
および東北大学病院周産母子センター准教授

鈴木 啓二 (東海大学)

- 1982年 東京大学医学部医学科卒業
- 1982年 東京大学医学部小児科 研修医
- 1983年 埼玉県立小児医療センター未熟児新生児科 レジデント/医員
- 1986年 太田総合病院小児科 医員
- 1989年 東京都立府中病院小児科 医員
- 1991年 埼玉県立小児医療センター麻酔科 医員
- 1992年 Westmead Hospital (Sydney, Australia) Newborn Services Fellow
- 1993年 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院周産期センター新生児部門 医長
- 2001年 Monash University (Melbourne, Australia) Department of Physiology, Faculty of
Medicine, Nursing and Health Sciences, Fetal and Neonatal Physiology Visiting
Scientist/PhD
- 2006年 埼玉医科大学総合医療センター総合周産期母子医療センター新生児科 講師
- 2011年より 東海大学医学部専門診療学系小児科学 教授

久保田健夫 (山梨大学)

- 1985年 北海道大学医学部卒業
- 同年 昭和大学小児科入局
- 1991年 昭和大学大学院博士課程修了 (昭和大学医学博士)
- 同年 長崎大学医学部原研遺伝学部門 研究生
- 1993年 米国ペイラー医科大学 研究員
- 同年 米国NIH (国立ヒトゲノム研究所) 研究員
- 1996年 米国シカゴ大学研究員
- 1997年 信州大学医学部 衛生学講座 助手
- 2000年 信州大学病院 遺伝子診療部 助手
- 同年 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第二部 室長
- 2003年より 山梨大学大学院 保健学I (現、環境遺伝医学) 講座 教授
- 2006年より 昭和大学医学部 (小児科) 客員教授
- 2009年より 早稲田大学理工学術院 先進理工学部 (生命医科学科) 客員教授、現在に至る

胎生期低栄養と肥満発症リスク

Undernutrition *in utero* and Risk of Obesity

浜松医科大学附属病院周産母子センター

伊東宏晃

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine

Hiroaki ITOH

キーワード：肥満、低出生体重、糖尿病、マウス、動物モデル

〈概要〉

諸家による疫学研究や動物実験より、胎生期に低栄養環境に曝された場合、成長後にメタボリックシンドロームを発症するハイリスク群となる可能性が報告されている(1)。その具体的な機序の一端を解明することを目的として、母獣に摂餌制限を行うことで胎生期低栄養マウスモデルを調整して解析を行った。

〈緒言〉

我が国において平均 BMI は半世紀にわたり増加の一途をたどり、肥満の増加、メタボリックシンドロームの蔓延が社会問題となり久しい。これに対して、妊孕世代である 20 代、30 代女性の平均 BMI は一貫して低下しており、やせ願望による不自然なダイエットがその主たる原因であると危惧されている。一方、1970 年頃より我が国における平均出生体重は減少の一途をたどっており、その背景因子の一つとして妊孕世代女性のやせならびに不自然な食生活が注目されている。そこで、浜松市において妊婦の食事摂取を調査したところ、妊娠期間を通じて 1 日の平均摂取カロリーは 1,600 キロカロリー未

満であった。すなわち、妊娠前からの不十分な食事摂取を妊娠中も継続している可能性が危惧され、平均出生体重の減少との強い因果関係が示唆された。胎生期に低栄養環境に曝された場合には成長後に肥満を発症するハイリスク群となるという疫学研究が報告されている(1)。さらに、具体的な機序として省エネルギー体質というべき *thrifty phenotype* 仮説 が提唱されているが(1)、必ずしも科学的解明がなされていない。そこで、母獣の摂餌制限により胎生期低栄養マウスモデルを調整して解析を試みた。

〈方法と結果〉

演者らの研究グループはこれまでに母獣摂餌制限による胎生期低栄養マウスモデル(2,3)を開発した。このモデルは対照群に比べて約 18% 平均出生体重が低い。成長後に高脂肪食を負荷すると低出生体重群は肥満が増悪するが、通常食を用いると対照群に比べて体格の差はない(2,3)。疫学的な検討から低出生体重児が *catch up growth* を経験することは生活習慣病発症のハイリスク因子であると報告されている(1)。また、近年脂肪細胞は種々のアディポサイトカインを分泌し生活習慣病の発症に重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある。そこで、

この動物モデルの新生仔の *catch up growth* 期における脂肪組織に注目して種々のアディポサイトカインの遺伝発現を検討したところレプチン遺伝発現に著明な亢進を認めた。正常マウス新生仔ではレプチンサーージと呼ばれる一過性の血中レプチン濃度の上昇が認められる。そこで、摂餌制限群の新生仔期の血中レプチン濃度を検討したところ、レプチンサーージの時期がより早期に認められたので、我々はこの現象を「レプチンサーージの早期化(*Premature leptin surge*)」と名付けた(2-4)。

レプチンは脂肪細胞から産生され視床下部に作用して強力な抗肥満作用を有するが、近年新生仔期の視床下部ニューロンの発達を制御する可能性が注目されている。そこで、「レプチンサーージの早期化」が視床下部のエネルギー代謝調節に関わる神経ニューロンの発達に何らかの影響をおよぼして肥満発症のリスク因子形成に関与している可能性を想定して、正常マウス新生仔にレプチンを投与して人工的な「レプチンサーージの早期化」モデルを調整したところ、成長後における高脂肪食負荷により有意に肥満の加速を認めた。さらに、摂餌制限群ならびに人工的な「レプチンサーージの早期化」モデルいずれにおいても、8週齢の仔においてレプチンの急性投与に対する体重減少作用および摂食量の減少作用が有意に減弱していることが明らかとなった。さらに、両動物モデルにおいてレプチンの急性投与を行ったところ、いずれも視床下部における *signal transducer and activator of transcription3* (STAT3)のリン酸化、視床下部弓状核および室傍核における *c-Fos* 蛋白発現の誘導が有意に減弱していた。また、両者の視床下部室傍核において肥満作用に関与する *neuropeptide Y* (NPY)の神経ニューロン発達に著名な亢進を認めた。

〈考察〉

「レプチンサーージの早期化」現症は視床下部における末梢のレプチン作用に対する恒久的な感受性の低下を *programming* する可能性が明らかとなった。レプチンは視床下部を介して強力な抗肥満作用を有することから、レプチンに対する感受性の低下は易肥満性とも呼ぶべき形質を獲得する機序の一端に関与している可能性が強く示唆された。

結論

胎生期の栄養環境に引き続く新生仔期の *catch up growth* 期には、脂肪細胞からのレプチン分泌の変化である「レプチンサーージの早期化」により視床下部のエネルギー代謝調節機構に恒久的な変化をもたらす可能性が明らかとなった。DOHaD 仮説に基づいたメタボリックメモリーの機序の一つとして「*Hypothalamic Adipose Axis* (HA axis)」(1)の存在を提唱したい。

〈参考文献〉

1. Itoh H, Kanayama N. Low birth weight and Risk of Obesity –Potential Problem of Japanese People- **Current Women's Health Reviews**. 5; pp212-219, 2009
2. Yura S, Itoh H, et al. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition **Cell Metab** 1;371-378, 2005.
3. Yura S, Itoh H, et al. Neonatal exposure to leptin augments diet-induced obesity in leptin-deficient *ob/ob* mice. **Obesity (Silver Spring)** 16:1289-1295, 2008
4. Itoh H, et al. Neonatal exposure to leptin reduces glucose tolerance in adult mice. **Acta Physiologica**. 202; 159-164, 2011

母体過栄養と児の生活習慣病リスク

○杉山 隆、張 凌雲*、村林奈緒*、西郡秀和、目時弘仁、
鈴木吉弥、木村芳孝、菅原準一、八重樫伸生、佐川典正**
東北大学医学部産科婦人科、*三重大学医学部産科婦人科、**音羽会楽和病院産科婦人科

わが国では、妊娠可能な 20 歳代の約 25%、30 歳代の約 15%もの女性がやせでその頻度は漸増しており、低出生体重のリスク因子となっている。一方肥満女性の場合、20 歳代、30 歳代女性のそれぞれ 8%、12%が肥満であり、その頻度の推移をみると横ばいである。すなわち、わが国における妊婦の栄養という視点からみると、やせと肥満の二極化問題が存在するのである。

疫学研究では、子宮内低栄養が児の将来の生活習慣病発症に關与する報告は多々なされているが、子宮内過栄養も児の将来の生活習慣病発症と關連することを示唆する報告がなされている。

そこで本シンポジウムでは、ヒトおよび動物における子宮内過栄養と将来の生活習慣病発症に關する報告のレビューを行うとともに、私どもの高脂肪食摂餌マウスを用いた基礎研究を紹介させて頂く。

我々はこれまで正常耐糖能女性における非肥満・肥満女性の妊娠中の各種アディポカインの血中濃度に関して検討した。その結果、非肥満女性において血中アディポネクチンの低下や TNF- α の増加傾向を呈し、脂肪細胞の肥大化や脂肪組織への M1 マクロファージ優位の浸潤が關連する可能性を明らかにした。さらに肥満妊娠では、これらの変化が増強することも判明した。そこで肥満マウスモデルを用いて炎症の観点より肥満妊娠が胎仔や次世代である仔の将来にどのようなインパクトを及ぼすのかなどにつき検討した。

まず、胎仔についての検討を行った結果、高脂肪食 (HFD) および正常食 (ND) の両群間で胎仔重量に差がないことは予想外であった。HFD を用いた既報によると、母獣の HFD の内容や種類に差があるものの、胎仔の出生体重は両群で差がないとするもの、HFD 群で重いとするものなどが存在する。我々の結果から、胎仔のインスリン抵抗性の存在が HFD による胎仔發育増進に歯止めをかけた可能性を考えた。事実、今回の検討によると、胎仔において高インスリン血症が認められた。また脂肪細胞の肥大化やマクロファージ浸潤を伴い、脂肪組織における GLUT4 発現低下が生じることも判明した。すなわち、これらの結果は胎仔におけるインスリン抵抗性の存在を示唆するものであり、胎仔の皮下脂肪へのマクロファージ浸潤を介したアディポカイン発現異常によるものと推察された。

次にこのモデルを用いて次世代の検討を行った。その結果、10 週齡の雄性仔マウスにおいて既に血圧上昇や耐糖能低下が認められた。ただし両群間にインスリン感受性の差がなかったことより、インスリン分泌が耐糖能低下に關与した可能性が示唆された。また脂質代謝に關しインスリン作用の低下が生じることも判明した。

このように、本マウスモデルはわが国における母体過栄養を反映したモデルと成り得るものと考え、今後エピジェネティクスに關する検討を進めていく予定である。

絨毛膜羊膜炎の諸臓器の発育発達への影響

○鈴木啓二¹⁾、高橋秀弘²⁾、正木宏³⁾、鈴木理永⁴⁾、田村正徳⁴⁾、
船隈奈緒子⁴⁾、近藤敦⁵⁾、菅波佑介⁵⁾、島崎真希子⁶⁾

¹⁾東海大学医学部小児科、²⁾東京都立小児総合医療センター新生児科、

³⁾聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院周産期センター新生児部門、

⁴⁾埼玉医科大学総合医療センター小児科、⁵⁾東京医科大学小児科、⁶⁾杏林大学医学部小児科

【はじめに】絨毛膜羊膜炎(chorioamnionitis; CAM)は早産の主な原因のひとつで、特に 28 週未満の早産の 70%以上に CAM が存在すると言われている。さらに CAM は早産の原因となるばかりでなく慢性肺疾患(chronic lung disease; CLD)や脳室周囲白質軟化症(periventricular leukomalacia; PVL)などの大脳白質病変などの重篤な合併症の病因となることが知られている。CAM はほかにも腎、消化管、胸腺、甲状腺、網膜など発達期の多くの器官に影響を及ぼして障害の原因となることがわかってきた。われわれは妊娠ラットの胎仔羊水腔にリポ多糖体(lipopolysaccharide; LPS)を投与することにより CAM モデルを作成し諸臓器に対する影響を肺、腎、脳を中心に行ってきた。今回は肺、腎、脳、心、肝について臓器発育に対する影響を示し、特に肺に関しては長期的にみたその発達に対する影響を mRNA 発現などの観点からお示したい。

【目的】ラットの胎児羊水腔に LPS を投与しその臓器発育に対する長期的影響、特に肺の発達に対する影響を評価すること。

【方法】SD ラットを妊娠 20 日(満期 22 日)に全身麻酔下に開腹して各胎仔羊水腔内に 0.1mL 生食に溶解した E.coli (O55:B5) 由来 LPS 0.1 μ g または 1 μ g を注入した(それぞれ LPS-L、LPS-H 群)。生食群(SAL 群)では同量(0.1mL)の生食を注入した。手術を行わない無処置群(NTX 群)を対照とした。妊娠 22 日(満期)で経膈または帝王切開にて出生させ生後 8 週までフォローした。出生直後および生後 1 週、4 週、8 週でラットを安楽死させた後脳、肺、心、腎、肝を採取し重量を測定した。肺については右肺組織を採取、RNA 安定化溶液内で凍結保存、RNA 抽出し real time PCR 法により肺サーファクタントタンパク、血管系発育因子などについて mRNA 発現を定量した。

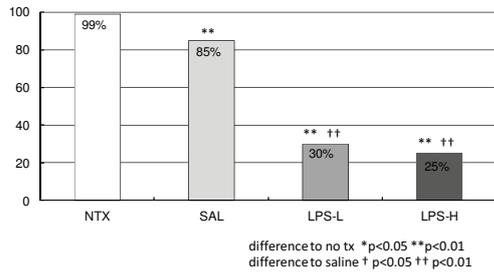
【結果】死亡率は LPS-H 群で最も高く、次いで LPS-L 群、SAL 群で、NTX 群では 1%で最も低かった(Fig.1)。出生体重は LPS-H、LPS-L 群において SAL 群、NTX 群よりも軽かったが、生後 8 週では LPS-H 群のオスにおいてのみ体重が軽かった(Fig.2)。出生時には体重当り肺重量は LPS-H 群において、体重当り心重量は処置したすべての群において高かったが、生後 8 週では肺、心ともに群間に差はなかった(Fig.3,4)。体重当り腎重量は出生時には SAL および LPS-H 群において高く LPS-L 群では NTX 群と差はなかったが、生後 8 週では SAL 群オスにおいてのみ低下していた(Fig.5)。体重当り脳重量は出生時にはすべての処置群において高かったが生後 8 週では LPS-H 群オスにおいてのみ高かった(Fig.6)、すなわち体重補正前の脳重量としては常に 4 群間に差はなかった。体重当り肝重量は出生時、生後 8 週ともに 4 群間に差はなく常に体重に比例していた(Fig.7)。出生時において肺における mRNA 発現は SP-A,D,C では LPS-H 群において、SP-B ではすべての処置群において増加しており、この変化は生後 8 週においても続いていた(SP-A についてのみ Fig.8 に示す)。

【要約および結論】

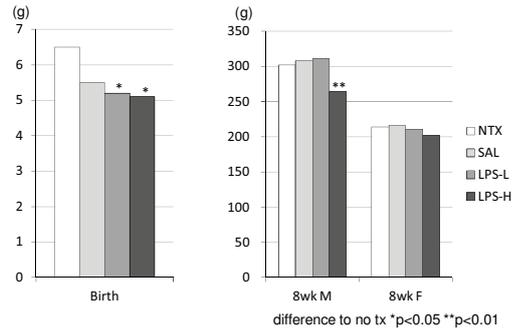
1. 出生前の羊水腔内 LPS 暴露は発育発達期にある各種臓器に影響し、それは出生直後の急性期のみならず生後長期にわたって続き成熟期にまで及ぶ。
2. 羊水腔内 LPS 暴露の臓器の発育・発達への影響には臓器によってその反応が異なるほか、LPS の量によっても異なり、さらには雄雌によっても異なる。
3. 羊水腔内 LPS 暴露の臓器に対する影響は全体としての発育のみならず機能的発達にも及ぶ。

すなわち、胎児期の絨毛膜羊膜炎は各種臓器の発育発達に影響し成熟以後においても臓器の機能に永続的異常をもたらす可能性が示唆された。

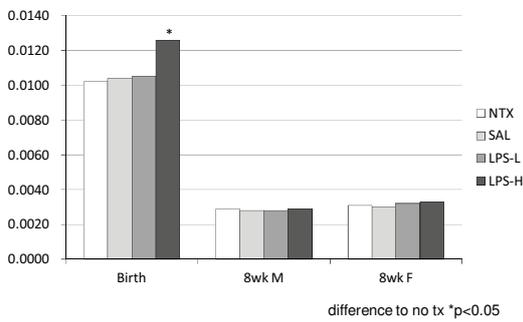
Survival rate of pups (Fig.1)



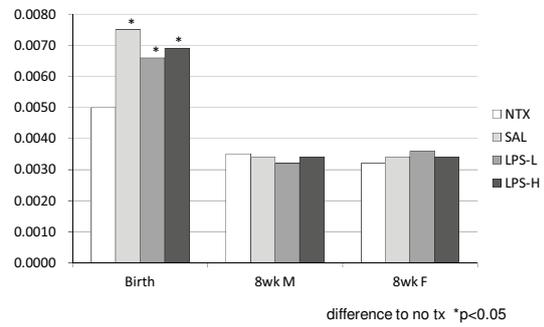
Body weight (Fig.2)



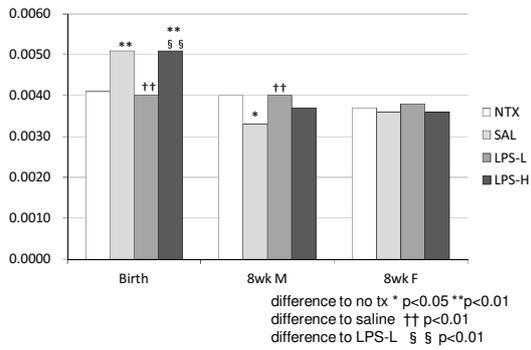
Rt lung weight / BW (Fig.3)



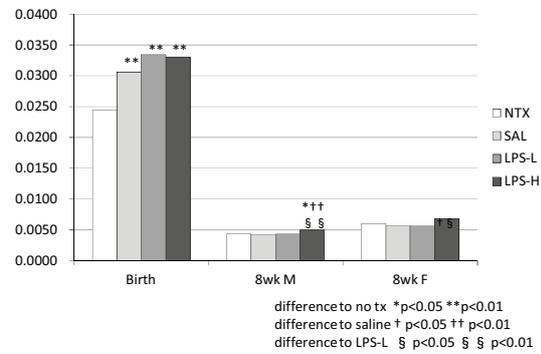
Heart weight / BW (Fig.4)



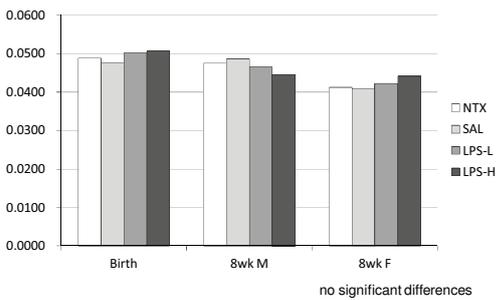
Rt kidney weight / BW (Fig.5)



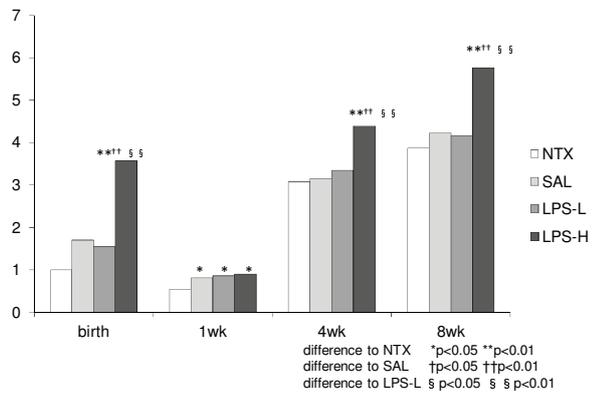
Brain weight / BW (Fig.6)



Liver weight / BW (Fig.7)



mRNA expression of SP-A (Fig.8)



低栄養（DOHaD）とエピジェネティクス

○ 久保田健夫、平澤孝枝、三宅邦夫

山梨大学医学部環境遺伝講座

胎生期に低栄養に曝された胎児は、成人期に生活習慣病の発症リスクが高まることが、戦時中や飢饉の時代の疫学研究で明らかにされた。さらにこれらの胎児の次の世代もまた生活習慣病になる傾向があることが指摘されて来た。この現象の生物学的メカニズムとして、いくつかの考え方が提示され、その1つがエピジェネティクスという考え方である。

エピジェネティクスとは「DNA 配列変化を伴わない遺伝子発現調節メカニズム」であり、その本体は「DNA のメチル化修飾」や「染色体ヒストン蛋白質の化学修飾」である。当初、エピジェネティクスはがんやまれな先天異常症に関わるメカニズムと考えられていた。しかし、近年、DNA やヒストンの修飾は比較的短期間の環境変化に伴って変化しうることが明らかになり、環境と遺伝の双方が関わる生活習慣病の新しい遺伝学的理解とも考えられるようになってきた。

さらに、エピジェネティクスに影響を与える環境要因として、精神ストレス、環境化学物質、薬物、そして胎生期低栄養が明らかにされてきた。胎生期の低栄養環境は、肝臓内の脂質代謝の遺伝子のメチル化を低下させ、これが肥満体質を生み出すもとであることが動物実験で判明した。また、飢饉に曝された実際のヒトにおいても同様の低メチル化傾向が認められることも報告された。さらに、このようなエピジェネティックなゲノム上の刻印は、継代的に伝達する可能性も、動物実験で明らかにされつつある。

一方、私達はこれまで、まれな先天異常症を対象にエピジェネティクス研究を行って来た。具体的には、ゲノム刷込み（父由来染色体と母由来染色体のエピゲノムの相違）や X 染色体不活化（女性の 2 本の X 染色体の片方が不活化される現象）の異常が、ある種の先天異常症の原因であることを見いだした。続いて、エピジェネティックな遺伝子発現調節の詳細が判明するにつれ、これに関わる蛋白質の遺伝子変異で自閉症疾患が生ずることやその脳内病態について明らかにして来た。

このような経験をふまえ、最近、われわれは、1) ラットで実証されて来た胎生期低栄養環境のマウスによる実証研究、2) 胎生期の精神ストレスによる肝臓や脳への影響を調べる研究、3) 出生直後の短期間の精神ストレスによる肝臓や脳への影響を調べる研究に着手した。本シンポジウムでは、これらの研究の一端を紹介する。

エピジェネティクスとは「環境による生体内の刻印」である。しかし、「環境の生体を与える影響を、エピジェネティクスを軸に理解する研究」は、世界的にまだ始まったばかりである。また逆に、エピジェネティクスは、「われわれ（ヒト生物種）にとって良い環境とは何か」を計る尺度を提供する学問分野とも考えられる。シンポジウムの最後に、DOHaD におけるエピジェネティクス研究の展望にも言及したい、と考えている。