

学位論文要旨

氏名

橋田一輝



論文題目

「Hypertrophic fat cells in hypophagic intrauterine growth restricted rats
without catch-up growth」
(Catch-upのない子宮内胎児発育遅延ラットにおける肥大した脂肪細胞)

指導教授承認印

石井正浩



Hypertrophic fat cells in hypophagic intrauterine growth restricted rats without catch-up growth

(Catch-up のない子宮内胎児発育遅延ラットにおける肥大した脂肪細胞)

氏名 橘田一輝

要旨

【背景】

胎児の成長は、遺伝子、胎盤、母体基礎疾患や母体栄養など多因子の影響を受ける。妊娠中の母体の低栄養は、胎盤重量の減少と胎児への栄養供給不足を招き、胎児の正常な成長発育を阻害し、胎児は子宮内胎児発育遅延(IUGR)となる。IUGR は、成人期に高血圧や糖代謝異常の危険因子であることが知られているが、IUGR のうち生後に catch-up growth を示すもので特にその関連が指摘されている。そのため Catch-up という急激な成長は、IUGR の場合、メタボリックシンドローム発症の危険因子であると言える。出生した IUGR のほとんどが catch-up を認めるが、約 15%は成人期まで catch-up を認めない。catch-up のない IUGR では、インスリン感受性は悪化しないとする研究があるものの報告は少ない。アディポネクチンは耐糖能を予測しうる因子の一つであるが、catch-up のない IUGR に関しては糖代謝もアディポサイトカイン調節も明らかにされていない。

catch-up の機序の一つとして食事摂取量の増加が報告されている。IUGR モデルラットにおいて、食欲刺激ホルモンであるグレリンの増加と食欲抑制ホルモンである PYY と CCK の減少により食餌摂取量の増加と catch-up を示した。しかし catch-up のないラットでの報告はない。

【目的】

Catch-up のない IUGR モデルラットを用いて、グレリン、PYY、CCK と食餌量、脂肪量とアディポサイトカインの変化、また糖代謝について検討する。

【方法】

生後 8 週の Sprague-Dawley ラットを雌雄購入し、室温 22 度、明暗サイクルを 12 時間毎に管理した。妊娠を確認後 7 日目に妊娠ラットを 2 群に割り振った。コントロール群として食餌を自由摂取させた群と、食餌摂取制限群としてコントロール群の 50%の食餌量を与えた群を作成した。食餌摂取制限群の母体から出生したラットは、食餌制限をしなかった母体の母乳で育てた。離乳後の食餌は両群とも自由摂取とした。食餌摂取量を一日一回、体重を週一回測定し、食餌摂取制限群の母体から出生したラットのうち、catch-up を示さなかったラットを R 群とした。食餌制限をしなかった母体より出生したラットを C 群とした。

腹腔内糖負荷試験(IPGTT)は、生後 30 週齢において空腹時に行った。負荷前の採血を尾静脈より行った。腹腔内に 2.5 g/kg の 50%D-glucose を投与し、15 分後、30 分後、60 分後、120 分後に採血を行った。採取できた検体ですぐに血糖を測定し、残った検体を迅速に凍結後、ELISA にてインスリンを測定した。

生後 3 週齢、生後 8 週齢、生後 33 週齢において、空腹時の血液と組織を採取した。血液は心臓穿刺にて採取し、遠心分離後に -70°C で凍結保存した。総コレステロール(TC)、中性脂肪(TG)は SRL に依頼し測定を行った。また 1ml 当たり 500 カリクレインインヒビター単位のアプロチニンと血液を EDTA 管に採取し、遠心分離を行い、-80°C で凍結保存した。全ての検体を

採取後に、グレリン、レプチン、アディポネクチンを ELISA で測定した。

脂肪組織は、腎周囲脂肪、腸管膜脂肪、精巣周囲脂肪の総重量を体重で除して、Adiposity Index として評価した。

採取した組織は RN easy Mini Kits を使用し、RNA を抽出後、リアルタイム PCR を使用し、mRNA の発現を測定した。Advantage RT-for-PCR Kit を使用し、逆転写を行った後、SYBR Green PCR Kit を使用して cDNA を作成した。PCR サイクルは、95°C を 15 分間保った後、1 サイクルが 94°C を 15 秒、60°C を 30 秒、72°C を 30 秒で設定したものを 40 サイクル行った。mRNA の発現レベルはすべて 18s rRNA を内在性コントロールとした。

また採取した脂肪組織は、10% 中性緩衝ホルマリンとパラフィンにより固定し、薄切後に HE 染色を行い、オリンパス BX51 顕微鏡にて、倍率を 100 倍に固定し観察を行った。DP2-BSW を使用し、各脂肪細胞の面積を各検体からそれぞれ 3 視野毎計測した。

【結果】

R 群の出生時体重は 5.8 ± 0.14 g と C 群 7.0 ± 0.09 g より小さく、その後も catch-up を認めなかった。また R 群の離乳後の食餌量は C 群より少なかった。R 群の腹腔内脂肪量は $5.3 \pm 0.7\%$ と C 群 $6.5 \pm 0.7\%$ より少なかった。腹腔内脂肪である精巣周囲脂肪において、個々の脂肪滴の大きさを計測すると、その面積の分布も中央値も R 群で大きかった。空腹時血糖は、C 群 (70 ± 7 mg/dl) と R 群 (75 ± 6 mg/dl) で有意差はなかった。IPGTT において、R 群の糖負荷後の血糖は低かったが、糖負荷後 120 分では低下傾向を示しただけだった。またインスリンにおいても R 群は低かった。HOMA-R は R 群 (0.21 ± 0.11) で C 群 (0.37 ± 0.05) より低かった。グレリン、PYY、CCK、アディポネクチンは、生後 3 週齢、8 週齢、33 週齢において R 群で減少しており、レプチンは増加していた。TG、TC では C 群と R 群に差は認めなかった。生後 3 週齢、8 週齢、33 週齢において、胃におけるグレリンの発現、回腸における PYY、十二指腸における CCK の遺伝子発現は R 群でそれぞれ低下していた。

【考察】

既報において、体重の catch-up をしない IUGR 児は耐糖能障害を認めない。この結果は今回の我々の結果と一致する。しかし脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインの結果とは一致しなかった。既報では、レプチンは体脂肪量に相関し、肥満患者におけるアディポネクチンは非肥満患者より低値となる。我々の結果では、R 群の Adiposity index は低いものの、レプチンは増加し、アディポネクチンは減少していた。IUGR 児における BMI とレプチンは順相関しないとの報告がある。また脂肪細胞の大きさがレプチン分泌量を決定し、脂肪細胞の大きさとアディポネクチンが逆相関することも知られている。以上より IUGR においてもアディポサイトカイン分泌は脂肪量ではなく個々の脂肪細胞のサイズに相関するものと考え脂肪細胞のサイズを測定した。IUGR の脂肪細胞が肥大しやすい機序は不明だが、脂肪細胞の数は小児期に決定され、やせている個体は肥満個体より数が少ないことが関係しているかもしれない。我々は R 群の脂肪細胞の数が C 群より少ないと推測したが、この仮説を証明できる結果は今回の我々の研究においては無い。

アディポネクチンは肥満によるインスリン抵抗性、耐糖能、リポプロテイン代謝、動脈硬化、冠動脈疾患に関連する。我々の結果は R 群の耐糖能の悪化を示すものではなかった。しかし

アディポネクチンの低値は将来の耐糖能悪化を予測する因子として知られており、R 群が過栄養にさらされると、これらのメタボリックシンドロームが発症しやすいのかもしれない。低出生体重児であることが、耐糖能障害と 2 型糖尿病の発症に関わる独立したリスク因子として報告されており、catch-up の有無にかかわらず、IUGR であることは一つのリスクと考えられる。

我々は以前に、IUGR ラットにおける catch-up は食餌摂取量が重要であることを報告した。IUGR ラットは、食餌摂取量が少ないとき catch-up を示さず、catch-up を示すラットは過食であった。さらに catch-up を示す IUGR ラットにおいて、摂食ホルモンであるグレリンの増加と食欲抑制ホルモンである PYY と CCK の減少があることも報告した。我々の結果では catch-up を示さない IUGR ラットの生後 3 週齢と 8 週齢における胃のグレリンの発現は減少しており、血中濃度も低く、食餌量も減少していた。PYY と CCK は食事に反応して胃腸から分泌され、肥満の場合は空腹時の PYY は低く、食後の PYY の上昇も低くなる。PYY の投与は食事摂取量を減少させ、PYY のノックアウトマウスでは過食と肥満となる。我々は PYY が R 群において上昇していると予測したが、実際には減少していた。この変化は食事摂取量の変化と一致しなかった。CCK もまた食事量を減少させるホルモンであるが、CCK ノックアウトマウスは対照マウスより小さくなる。以上より空腹時の CCK と PYY の食餌摂取量に対する影響は、グレリンより小さいものと考えられた。

これらの結果は、子宮内の低栄養がグレリンと PYY、CCK により食餌摂取量を変化させ、過食により catch-up することに矛盾しない結果である。また catch-up しなくても IUGR そのものがメタボリックシンドロームの危険因子であることを示すものである。