

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 千阪俊行

学位論文名 胎生期の低栄養による胎児発育遅延は、成長後に受ける血管障害に対し、より強い細胞増殖反応を起こす

学位論文の要約

【背景・目的】胎児発育遅延は成人期における心血管病の罹患率を増加させるリスク因子となることが疫学研究や動物実験から報告されている。しかし、胎児発育遅延により血管自体へ影響を及ぼしているか動物モデルで検討した報告は少ない。

本研究では、胎児発育遅延で生まれた仔において、将来に受ける血管障害に対する反応の差異についてマウス大腿動脈へのカフ留置術を用いて明らかにすることを目的とした。

【方法】野生型 C57BL6 母獣マウスに 10 週齢より 8%低蛋白食による食事制限を行い 12 週齢に交配を行うことで胎児発育遅延マウスの仔(LPO)を作成し、20%通常蛋白食を与えたコントロール群の仔(NPO)と比較検討を行った。出生後は両群ともに母獣マウスを通常蛋白食とし、離乳後の仔も通常食で飼育した。この 2 群の仔に対し出生体重、10 週齢までの体重増加、12 週齢時のテレメトリー法による血圧測定を行い比較検討した。

次にこの 2 群の仔に対し 10 週齢時に大腿動脈にカフを留置し、2 週間後に elastica van Gieson (EVG) 染色にて新生内膜を同定しその形成された面積を比較検討した。またカフ留置 1 週間後に血管を採取し、anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)染色で細胞増殖の違いを比較検討した。

続いて、血管障害時の酸化ストレス反応について同様の大腿動脈カフ留置術を施行しその 1 週間後に採取した血管を用いて dihydroethidium(DHE) 染色による Superoxide anion の産生、real-time RT-PCR による NADPH oxidase subunit(p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, gp91^{phox}, Rac1) の発現、そしてウェスタンブロット法を用いた NADPH oxidase subunit(p47^{phox}, p67^{phox}, Rac1) と Superoxidase dismutase (SOD) 1, 2, 3 の蛋白発現について解析した。また、血管障害時の炎症性サイトカインの発現についてもカフ留置 1 週間後の血管を用いて real-time RT-PCR による IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF α mRNA の発現を検討した。最後に血管障害時の低酸素応答についてカフ留置 1 週間後に Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) の免疫組織染色、HIF-1 α mR

NA 発現、ウェスタンブロット法を用いた HIF-1 α 蛋白発現を行い 2 群間で比較検討を行った。

【結果と考察】 出生仔の体重は LPO 群で有意な減少を認めた (NPO; $1.3143 \pm 0.0098\text{g}$, LPO; $1.2072 \pm 0.0073\text{g}$)。その後、2 週齢時に体重はキャッチアップし 10 週齢までその差は認めなかった。

また 12 週時のテレメトリー法を用いた血圧測定においても 2 群間で有意な差は認めなかった。

続いてこの 2 群を用いて成長後の血管障害時における反応の差異を検討した。まず、血管リモデリングの違いを解析するため行った大腿動脈カフ留置術 2 週間後の新生内膜形成については LPO 群において NPO 群に比較して有意に新生内膜形成面積が増大した ($p < 0.01$)。またカフ留置 1 週間後の血管に対する PCNA 染色でも有意な差をもって LPO 群で血管障害に対して細胞増殖反応が亢進していることが分かった ($p < 0.01$)。細胞増殖反応、新生内膜形成共に留置していない血管では二群間に差は認めなかった。

血管リモデリングにおいて二群間で差が出る原因について促進因子となる酸化ストレス反応に関して検討した。まず、Superoxide anion の産生について DHE 染色にて解析したが、カフ留置 1 週間後の血管において LPO 群で有意に産生が亢進していた ($p < 0.01$)。また産生経路のひとつである NADPH oxidase subunit について mRNA 発現、蛋白発現の差異を解析した。この検討においても有意に LPO 群で発現が亢進していた。逆に同回路の調節経路として働く SOD に関しては SOD 3 において LP-offspring にて有意に発現が減少していた (< 0.01)。

次に促進因子のひとつである炎症性サイトカインに関して解析した。Real-time RT-PCR を用いた二群間における血管障害 1 週間後の炎症性サイトカインの発現についても IL-6 ($p < 0.01$)、IL-1 β ($p < 0.01$)、MCP-1 ($p < 0.05$)、TNF- α ($p < 0.01$) と有意に LPO 群で発現が亢進していた。また、酸化ストレス反応同様、血管障害のない血管では二群間に差を認めなかった。

最後に動脈硬化の促進因子と報告されている血管障害時の組織低酸素応答について HIF-1 α の発現を免疫組織染色、mRNA、蛋白の発現を用いて解析した。

カフ留置 1 週間後の血管において免疫組織染色にて有意に HIF-1 α 陽性率が高まり ($p < 0.05$)、HIF-1 α mRNA 発現 ($p < 0.01$)、蛋白発現 ($p < 0.05$) とともに有意に LPO 群で亢進していた。

以上の結果より成長後に血管障害をうけた場合、胎生期に低栄養であった仔の血管は将来に渡り、酸化ストレス反応の亢進、炎症反応の亢進、組織低酸素反応が正常出生群に比べて強く起こる可能性が示唆された。またそのメカニズムを介して将来に渡り胎生期低栄養群で正常発育群に比べて血管リモデリングが強く発現する可能性が示唆された。

【結語】 胎生期の低栄養は将来に渡り、血管障害に対する感受性を亢進させる因子となる可能性が示唆された。

なおこの学位論文の内容は、以下の原著論文に既に好評済みである。

主論文 ; Toshiyuki Chisaka, Masaki Mogi, Hiroto Nakaoka, Harumi Kan-no, Kana Tsukuda, Xiao-Li Wang, Hui-Yu Bai, Bao-Shuai Shan, Masayoshi Kukida, Jun Iwanami, Takashi Higaki, Ei-ichi Ishii and Masatsugu Horiuchi; Low protein diet-induced fetal growth restriction leads to exaggerated proliferative response to vascular injury in postnatal life. American journal of hypertension DOI: 10.1093/ajh/hpv072