

氏 名 木村 智子

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第809号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

学位授与年月日 平成30年 3月 9日

学位論文題目 Maternal undernutrition during early pregnancy inhibits postnatal growth of the tibia in the female offspring of rats by alteration of chondrogenesis

(妊娠初期の母体低栄養ストレスは、仔ラット雌の軟骨形成に変容を来たし、生後の脛骨成長を抑制する)

審査委員 主査 教授 今井 晋二

副査 教授 杉原 洋行

副査 教授 伊藤 俊之

## 論文内容要旨

※整理番号	816	(ふりがな) 氏名	きむら ともこ 木村 智子
学位論文題目	Maternal undernutrition during early pregnancy inhibits postnatal growth of the tibia in the female offspring of rats by alteration of chondrogenesis (妊娠初期の母体低栄養ストレスは、仔ラット雌の軟骨形成に変容を来たし、生後の脛骨成長を抑制する)		
<p>【研究の目的】</p> <p>胎児期などの感受期に低栄養ストレスに曝露されることで、生後に2型糖尿病や高血圧症、骨粗鬆症などの発症リスクを高めることが疫学研究や動物実験により示唆されている。日本では低出生体重児の比率が1990年代より増加傾向にあり、現在では約10%と高くなっている。その一因として、妊娠前および妊娠中の過度なダイエットが示唆されている。一方、2012年度の文部科学省学校保健統計調査によると、1990年代後半生まれの13歳から17歳の生徒の身長は親世代（1982年度の統計調査）より伸びているが、身長に占める脚の長さの割合（(身長-座高)/身長）は低下している。脚長比率低下の原因は未だ不明であるが、脚長比率低下の見られる世代は、低出生体重児の比率の増加が認められた世代と一致する。</p> <p>そこで今回、これまで原因不明であった現代の子ども達の体格変化機構を解明すべく、ラットの後肢骨を対象とし、母体低栄養が軟骨内骨化に関わる胎児期のプログラミングへ与える影響を調査した。</p> <p>【方法】</p> <p>Wistarラットを妊娠させ、妊娠5.5～11.5日（胚盤胞の子宮着床前から後肢芽形成直前まで）の間、対照群(C)の40%量の給餌にした低栄養群(UN)から生まれてくる仔ラット（胎仔を含む）を研究対象とし、以下の実験を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 形態学的解析 生後0日齢ならびに16週齢で体重、胴長（脊柱長）、脛骨長、脛骨近位骨端の形態や体積などを計測した。</li> <li>2. 培養実験 生後0日齢の脛骨近位骨端軟骨を採取し、増殖・分化実験を行った。</li> <li>3. 遺伝子発現解析（real-time RT-PCRを用いた定量解析） 胎生13.5日齢の後肢芽間充織ならびに生後0日齢の脛骨近位骨端軟骨を採取し、軟骨内骨化に関連した遺伝子の発現量を定量解析した。</li> </ol>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。  
2. ※印の欄には記入しないこと。

## 4. ヒストン修飾の解析

*Col2a1*, *Fgfr3*, *Igflr* をターゲットとし、アセチル化・メチル化解析を行った。

## 【結果】

UN 群の仔ラット雌では、C 群に比べ生後 0 日齢で脛骨長が長かった ( $p<0.05$ )。しかし 16 週齢では短く ( $p<0.05$ )、生後の脛骨成長が抑制されていた。培養実験では、軟骨細胞の IGF-1 刺激による増殖性およびII型コラーゲン産生量が UN 群で低下していた ( $p<0.05$ )。骨端軟骨における *Igf1* 遺伝子の発現量に差はなかったが、その受容体 *Igflr* 遺伝子やII型コラーゲン遺伝子 (*Col2a1*) の発現は低下していた ( $p<0.05$ )。一方、軟骨細胞の増殖・分化を抑制する *Fgfr3* 遺伝子の発現は増加していた ( $p<0.05$ )。これら遺伝子の転写調節因子 *Sox5/6* 発現や、*Col2a1* や *Igflr* のプロモーター領域周辺のヒストン (H3K9/14, H3K4) の修飾には差がなかった。しかしながら、*Col2a1* および *Igflr* の転写活性化因子 *Sp1* の発現が UN 群で低下していた ( $p<0.05$ )。

## 【考察】

今回、栄養制限を行った期間は、胚盤包の子宮着床前から後肢芽形成直前までの胎生ごく初期に相当する。その後の栄養制限解除により十分な子宮内成長を遂げたことから、出生時には大きな体格を有していたと考える。しかし、生後に脛骨の成長障害が生じており、後肢芽形成直前までの胎生初期における低栄養ストレスが、脛骨骨端軟骨局所の増殖性や分化に影響を与えたことを示唆している。つまり、脛骨骨端軟骨において *Col2a1* 遺伝子や *Igflr* 遺伝子の発現低下や *Fgfr3* 遺伝子の過剰発現が生じ、軟骨細胞の増殖・分化能が低下したことで、生後の脛骨成長が抑制されたと考える。本結果は、脛骨形成予定領域における間葉系幹細胞に生じたエピゲノムの変化が、子孫細胞にまで引き継がれている可能性を示唆している。

## 【結論】

初期胚の期間における母体低栄養ストレスは、仔ラット雌の軟骨細胞の機能を変えることにより、生後における脛骨の成長を阻害する。そして、この効果は *Col2a1* と *Igflr* 発現の減少ならびに *Fgfr3* 発現の増加を介した骨端軟骨細胞の増殖抑制と II 型コラーゲン産生低下に起因していると考えられる。軟骨細胞の増殖・分化機能に対するこのような変容は、*Sp1* などの転写活性化因子群の発現抑制などの変化から生じている可能性がある。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	816	氏名	木村 智子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文は、本邦では低出生体重児が増加していること、胎児期の低栄養が様々な疾患の発症リスクや体格に影響しているという報告があることに注目し、胎生初期の低栄養環境が与える生後の後肢骨成長への影響を調べた。また、低栄養ストレスが後肢骨成長に関する胎児プログラミングに与える影響について検討した。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 形態計測によって、初期胚の期間における母体低栄養ストレスは生後における脛骨の成長を阻害することが分かった。</li><li>2) 遺伝子発現解析により、この効果は <i>Cil2a1</i> と <i>Igf1r</i> 発現の減少と <i>Fgfr3</i> 発現の増加を介した骨端軟骨細胞の増殖抑制と II 型コラーゲン産生低下に起因していることが示された。</li><li>3) このような発現変化の原因としては、上記遺伝子のプロモータ領域周辺のヒストンの修飾には差がなかった一方で、<i>SP1</i> など転写活性化因子群の発現抑制がみられた。</li><li>4) 循環 IGF-1 濃度には変化がなかったことから、局所で産生される IGF-1 に対する反応性の低下が胎生期から引き継がれ、生後の脛骨成長障害の要因になっていると考えられた。</li></ol> <p>本論文は、胎生初期の低栄養環境が与える生後の後肢骨成長への影響について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総文字数 571 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 30 年 2 月 2 日)</p>			