

母体低栄養に由来する
マウス胎子脆弱性
に関する研究

伊藤拓哉

目次

1. 要旨	・ ・ ・ 4
-------	---------

2. 始めに	・ ・ ・ 8
--------	---------

3. 第一章	・ ・ ・ 10
--------	----------

母体低タンパク質食負荷を伴う LPS 経腔投与が子のオリゴデンドロサイト分化を阻害することに関する研究

3-1 緒言	・ ・ ・ 10
--------	----------

3-2 実験材料及び実験方法	・ ・ ・ 12
----------------	----------

3-3 実験結果	・ ・ ・ 18
----------	----------

3-4 考察	・ ・ ・ 19
--------	----------

4. 第二章	・ ・ ・ 22
--------	----------

母体低タンパク質食負荷による胎子心臓の Hypoxia-Inducible Factor 1 α 遺伝子の異常発現に関する研究

4-1 緒言	・ ・ ・ 22
--------	----------

4-2 実験材料及び実験方法	・ ・ ・ 23
----------------	----------

4-3 実験結果	・ ・ ・ 27
----------	----------

4-4 考察	・ ・ ・ 29
--------	----------

5. 第三章 . . . 31

母体低タンパク質食負荷によって誘導された胎子脳の低酸素関連遺伝子に関する研究

5-1 緒言 . . . 31

5-2 実験材料及び実験方法 . . . 32

5-3 実験結果 . . . 35

5-4 考察 . . . 36

6. 結論 . . . 39

7. 謝辞 . . . 41

8. 引用文献 . . . 42

9. 図表 . . . 61

10. 図表の説明文 . . . 91

1.要旨

妊娠中の母体低栄養は子宮内発育遅延（IUGR）や子の成長後の統合失調症などの精神疾患，高血圧のリスク因子の一つである。高血圧は脳血管障害や循環器疾患の重要な要因の一つである。実際，妊娠中の母体低栄養によって子の成長後に脳血管および循環器疾患発症のリスクが増加することが疫学的にも動物実験でも確認されている。

低栄養状態では様々な遺伝子の発現が変化することが *in vitro* でも *in vivo* でも見出されているにもかかわらず，母体低栄養に由来する胎子の病態と転写因子の発現変化は良く解っていない。転写因子の一つである Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 α)，は細胞の低酸素状態に反応する主要な役割を果たしている。HIF1 α の発現量増加は成人期の脳血管および循環器疾患との関連が知られている。しかしながら，胎子の脳や心臓では母体低栄養による HIF1 α 発現誘導は知られていない。

また，出産前の細菌やウイルス感染も子の成長後の精神疾患のリスク因子の一つである。幾つかの動物実験で妊娠中の母体低栄養や感染で精神疾患を誘発することを試みている。しかし，それぞれの単因子を用いた実験では精神疾患の発症リスクを説明できていない。

5-7 週齢の C57BL/6N 雌マウスを導入し，2 群を作成した。一方の群にはマウスが妊娠を継続するのに必要な栄養を含有した餌を与えた（N 群），他方には N 群の 48% のタンパク質を含有した餌を与えた（L 群）。N 群に与えた餌はタンパク質含有率を 17.90%，熱量は 377.0 kcal/100g とし，L 群に与えた餌はタンパク質含有率を 8.67%，熱量は 352.6 kcal/100g とした。順化の後，交配を行い，妊娠中の体重と摂餌量を毎日計測した。

実験 1：妊娠中の母体低栄養と炎症の併用によるオリゴデンドロサイト分化への影響を調査した。白質のオリゴデンドロサイト機能低下と精神疾患発症の強い関連が指摘されているので、オリゴデンドロサイトを精神疾患リスクの指標として用いた。妊娠 14 日目に N 群, L 群共にリポポリサッカライド (LPS) を経膣投与し炎症を誘導した。中性リン酸緩衝液を投与した対照動物を用意した。マウス前脳におけるオリゴデンドロサイト分化は胎齢 (E) 12.5 日から始まり, 生後日齢 (P) 10 日目までに完了すると言われている。そこで本実験では E17 の胎子脳でオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) を評価し, P7 の新生子脳で成熟オリゴデンドロサイトを評価した。OPCs と成熟オリゴデンドロサイトに対してそれぞれ oligodendrocyte-lineage transcription factor 2 (Olig.2) と myelin basic protein (MBP) の免疫染色を実施した。OPCs の細胞数は E17 胎子脳において各群に有意な差を認めなかった。しかし, P7 の脳において成熟オリゴデンドロサイトの細胞数は炎症を誘導された L 群でのみ減少した。このことはオリゴデンドロサイト分化が障害されたことを示唆する。一方で, 脳の炎症マーカーである反応性アストロの数計測した。P7 における反応性アストロサイトの数は LPS 投与によって母体の栄養条件に関係なく増加した。これらの結果は, 母体の低栄養は炎症によるその子の脳損傷を増強することを示している。母体の栄養および感染症の管理はその子の精神疾患発症を予防するために不可欠である。

実験 2：胎子の心臓を分娩 1-2 日前に相当する E17.5 に採取した。L 群の雌胎子の心臓重量比 (心臓重量/ 体重) が有意に増加した。しかし, 雄胎子ではこの様な増加は認められなかった。マイクロアレイによる胎子心臓の mRNA レベルでの発現量解析で 133 の転写因子が母体低栄養による有意な変化を示した。その中から成人期で循

環器疾患の病因との関与が指摘されている HIF1 α に注目した。qRT-PCR による mRNA 発現量の解析で L 群の雄胎子心臓の HIF1 α の発現量が1.3倍に増加した、しかし雌胎子の心臓ではこの様な変化は認められなかった。その上、L 群の雄胎子の心臓では HIF1 α タンパク質を分解する prolyl hydroxylase 1 (PHD1) の mRNA レベルでの発現量も増加していた。免疫染色の結果は L 群の雄胎子の mRNA レベルでの PHD1 発現量増加にもかかわらず、母体低栄養による両性胎子でのタンパク質レベルでの HIF1 α の蓄積を示した。これらの結果は、母体低栄養が性別に応じて異なるメカニズムを介して胎子心臓に HIF1 α 発現を誘導することを示唆している。

実験 3：母体低栄養による胎子脳への影響を評価するために E17.5 の胎子脳における HIF1 α およびその下流遺伝子の発現量を解析した。母体低栄養による胎子体重、脳重量に対する影響は確認出来なかった。低酸素に反応する hypoxyprom-1 による判定で胎子脳が低酸素状態でないにもかかわらず mRNA レベル、タンパク質レベル共に L 群の HIF1 α の増加が示された。同時に L 群では低酸素状態非依存的に HIF1 α をタンパク質レベルで増加させる mammalian target of rapamycin (mTOR) の mRNA 発現量も増加した。その上、マイクロアレイ解析によって 10 種の HIF1 α 下流遺伝子の mRNA 発現量が増加した。この様に、母体低栄養に対する胎子脳の生化学的な反応は軽度の低酸素状態における反応と類似していた。つまり、母体低栄養は胎子脳の低酸素関連遺伝子の発現を誘発し、その誘発には mTOR 経路の活性化が恐らく関与している。

母体低栄養条件下ではたとえ母親炎症が軽度であっても胎子脳への傷害性は増強される。加えて、母体低栄養は胎子の脳や心臓の HIF1 α 発現を誘導する。HIF1 α は炎症を増強する役割を果たしていることが報告されていことから、母体低栄養によって

誘導される HIF1 α の過剰発現は、子の脳における炎症に対する脆弱性に関与している可能性がある。一方、mRNA および/またはタンパク質レベルでの HIF1 α の発現増加は、脳血管および循環器疾患の発症や重症化に関与している。母体の栄養管理は子の脳血管および循環器疾患、母体軽度感染症が誘導する子の精神疾患を防ぐために重要となる。

2.始めに

1980年代以降、「胎児期から乳幼児期に至る栄養環境が成人期あるいは老年期における生活習慣病発症リスクに影響する」という学説が提唱されている(12)。この学説は提唱者に因んで Baeker 説もしくは **Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD)** と呼ばれている。最近の研究では生活習慣病だけでなく、精神疾患の発症リスクも増加することが解ってきた(11, 19, 44, 50, 73, 112)。加えて、リスクとなる因子も栄養環境(低栄養だけでなく、高脂肪食など過剰栄養(22)も含む)、大気汚染などによる化学物質の摂取(114)、スマトラ沖地震などの大規模自然災害(37)もリスク因子となることが解ってきた。

低栄養は飢餓や貧困だけでなく様々な要因で起きている。「やせ願望」や不規則な食習慣など本邦を含む先進諸国でも起こりうる現象である。妊娠期の低栄養暴露は子宮内発育不全(IUGR)の原因となる(46, 75, 76)。実際、本邦での出生時体重は1980年をピークに年々減少している(29)。周産期医学の発達により、超低体重児の救命が可能となってきた一方、小児麻痺など重度障害を発症する児の割合も増加している(29)。

妊娠中に低栄養暴露を経験した母親から出生した児は出生体重の軽さだけでなく、うつなどの精神疾患(11, 19, 44, 50, 73, 112)の発症率が約2倍に増加することが知られている。Hoekら(44, 73)は、ナチスドイツ占領下のオランダにおいて極端な食料不足が起こった、いわゆる「**Dutch famine (オランダ飢饉)**」における疫学的追跡調査で、特に妊娠初期にこの飢饉を経験した世代で統合失調症の発症率が増加したと報告し、胎児期の母体低栄養が後の統合失調症の一因である可能性を指摘している。

妊娠中の母体低栄養負荷に関する研究で動物モデルで使用されている栄養制限には

- ① 食餌制限モデル: 給餌量を制限することで, 摂取カロリーを制限するモデル (31, 37)。
- ② タンパク質制限モデル: 給餌する餌に含有するタンパク質量を通常の約半分に制限するモデル (69, 92)。
- ③ 外科的介入モデル: 導入できる時期は妊娠末期に限定されるが子宮動脈を結紮することで胎子の発育を抑制し, 発育遅延モデルを作成することができる (74, 104)。

などが実施されている。

本研究では先進国で問題になっている偏食による栄養不足のモデルであり, 同時にもっとも多く実施されている②タンパク質制限モデルを採用し, 母体低栄養負荷実験を実施した。第一章ではリポポリサッカライド (LPS) 経膈投与の併用により母体にタンパク質制限が子のオリゴデンドロサイト分化を阻害しうることを示す。第二章では DOHaD との関連が指摘されている生活習慣病の一つである循環器疾患に着目した。成人期における循環器疾患で心臓での発現量が増加することが指摘されている hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 α) (58) が胎子期の心臓で既に発現量が増加していることを示す。第三章では母体低タンパク食負荷が胎子の脳でも HIF1 α の発現量が増加していることを示す。第一章から第三章までの結果を総合して母体低栄養に由来する胎子の脆弱性を結論にて論じた。

3.第一章 母体低栄養負荷を伴う LPS 経腔投与が子のオリゴデンドロサイト分化を阻害することに関する研究

3-1 緒言

胎児期における脳白質傷害は、脳性麻痺の責任病変としてよく知られているが、主に運動神経が傷害される脳性麻痺のみならず、認識障害や行動障害をもたらす病変として、また統合失調症をはじめとする精神疾患の原因病変としても注目されている。また、母体のインフルエンザ、麻疹ウィルス、ポリオ、単純ヘルペスのウィルスおよびジフテリアなど細菌感染も統合失調症の発症を高める一因としてよく知られている (9, 20)。Volpe ら (102, 103) は、90 年代より胎児脳白質傷害とオリゴデンドロサイトの関係に注目し、未熟な胎児脳において、オリゴデンドロサイトの傷害が脳白質傷害の本態であると提唱している。白質傷害の外因性因子として、低酸素虚血および炎症はよく知られており、低酸素虚血はフリーラジカルや興奮性アミノ酸を介した細胞傷害を、炎症はサイトカインやケモカイン、NO を介した細胞傷害を引き起こすとされる。また、これらの反応により、組織中のミクログリアおよびアストロサイトが活性化され、さらなる細胞傷害の主体となっている。オリゴデンドロサイトは、大脳腹側側脳室周囲の胚細胞層 (SVZ) より産生されたオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) が大脳全体に遊走し、そこで成熟オリゴデンドロサイトへと分化成熟し、ミエリンを形成する (53)。この分化成熟段階において未熟なオリゴデンドロサイトほど酸化的ストレスに対する感受性が高く、未熟なオリゴデンドロサイトは低酸素虚血などフリーラジカルを介する反応で容易に傷害される。同様に未熟なオリゴデンドロサイトは、成熟したオリゴデンドロサイトに比し、サイトカインによる影響を受け

やすい。白質傷害の好発時期である在胎 23～32 週では、胎児脳のオリゴデンドロサイトの約 90%は未熟なオリゴデンドロサイトで構成されており、フリーラジカルやサイトカインなどの影響をもっとも受けやすい時期と一致する。このことから未熟な胎児脳においてオリゴデンドロサイトとしての未熟性、脆弱性が白質傷害の背景として重要であると考えられている (10, 14, 35, 79, 89)。

これまでネコやイヌ、ウサギおよびラットを用いた白質傷害の動物モデルの作成が試みられ、胎子脳での変化が研究されている。LPS あるいはサイトカインの投与による炎症惹起や大腸菌 (*E. coli*) の投与による感染実験で、オリゴデンドロサイトの減少、アストロサイトやマイクログリアの増加等が確認されている。しかしながらこれらの実験では、母獣の死亡が多い、早産率および死産率が高い、投与方法が母獣腹腔内あるいは子宮内に LPS や *E.coli* を大量に投与する、新生子脳にサイトカインを直接注入するといった非臨床的、強侵襲的である、といった問題がある (10, 14, 25, 26, 112)。また、マウスを用いた白質傷害モデルはこれまで報告されていない。これはマウスの小ささ故に投与経路が限定されしまうこと。さらに、他の動物の感染モデルで使用されていた投与量ではマウスは母獣も死亡してしまうなど投与量の検定が困難であるためと予想される。しかし、マウスは遺伝子配列が全て解読されているので、遺伝子レベルでの網羅的解析が可能なこと、加えて、胎盤の構造がヒトに近いことから他の動物種に比べてヒトへの外挿に適していると考えて、本研究ではマウス選択した。

一方、統合失調症も脳の白質不全が主因と考えられるようになっている。統合失調症患者においてオリゴデンドロサイト関連およびミエリン関連遺伝子の発現が抑制されていることが確認されており、それにより統合失調症患者ではオリゴデンドロサ

イトおよびミエリンの減少，機能不全が起こっていると報告されている(38)。現在約 20 個の遺伝子がある原因遺伝子として注目され，様々な研究が行われている。マウスを用いた動物実験において，程度のオリゴデンドロサイト関連遺伝子の発現を抑制すると，前頭前野皮質のオリゴデンドロサイトの構造が変化し，ミエリン鞘の形成が極めて薄くなり，神経繊維の信号伝達が低下したとの報告がある (98)。それらのマウスでは行動範囲が狭まり，マウス同士の社会性が減少する行動異常などの統合失調症に類似する変化が認められた。

以上のことから，胎子脳におけるオリゴデンドロサイトの脆弱性と母体の低栄養負荷に着目し，母体に低栄養食が負荷されるとオリゴデンドロサイトの脆弱性が亢進し，次に起こりうる変化（炎症等の酸化ストレス）に対応できないと仮定し，母体低タンパク質食負荷に LPS 投与を併用による胎子および新生子脳におけるオリゴデンドロサイトの分化への影響を検証した。

3-2 実験材料及び実験方法

本研究は，東北大学医学部実験動物倫理委員会の承認のもと，「東北大学における動物実験に関する指針」に従い，平成 17 年 9 月から平成 23 年 3 月に実施した。対象である C57BL/6N マウス 45 匹の雌マウスを医学部動物実験施設内に導入し，自家繁殖を行い，データを採取解析した。

（1）マウスの飼育環境および給餌

5-7 週齢の C57BL/6N を日本クレアから購入した。マウスは平均室温 24℃，湿度 50%，照明周期 12L-12D（明期間 8:00-20:00）の環境で飼育した。餌および水は自由摂取とした。導入後 1 週間を飼育環境への馴化期間とした。その後，餌を実験用の餌

に切り換えて2週間以上飼育した後、交配を開始した。計測は朝8時から開始し、全ての処置は午前中に行った。

実験用の餌は18%カゼインを含む通常餌 (N餌:AI-93G; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) またはタンパク量を9%カゼインに制限した低タンパク質餌 (L餌: modified AI-93G; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を与えた (表1)。N餌はマウスの繁殖に十分な栄養を有していることが確認されている (86)。L餌はタンパク質含有量をN餌の48%に制限し、同等の熱量を確保するために、脂質や灰分を補充している。今回の実験では、先進国で問題になっている偏食による栄養不足を模倣し、タンパク質摂取制限を採択した。先行する研究で、ラットの栄養制限法として、カゼイン含有量を18-20%から9-10%に約50%制限した低タンパク質食を自由摂取させる方法がもっともよく用いられており、それに準じて行った。この低タンパク質食給餌により、母獣血清中のトレオニンやその他いくつかの必須アミノ酸値の減少が確認されている (46, 85)。餌は交配1週間前より分娩までの期間変更することなくそれぞれ給餌した。本実験は妊娠期間中の母体低タンパク質食負荷を評価する実験であるため、出産した後はL餌を与えていた母マウスの餌も速やかにN餌へと変更した。

9週齢以降のオスとメスを1:1で交配し、膣栓確認日の朝を妊娠 (E) 0日とした。体重と摂餌量を妊娠期間中毎日測定した。毎日の体重をE0の体重と比較し妊娠中の体重増加を算出した。摂餌量は給餌量と翌日の残渣から算出 (単位: g) し、毎日の摂餌量に餌の蛋白含有率を乗じて毎日の蛋白含有量 (単位: g) を算出した。始めに予備的な実験 (N群 n=7, L群 n=7) を行い、1腹あたりの胎子数における母体低タンパク質食負荷への影響 (図 1a) および1腹あたりの胎子数と胎子体重のばらつきの評価を行い (図 1b)、胎子の体重のばらつきが少ない1腹あたりの胎子数が6-9匹

を実験に採用する妊娠条件として決定した。

(2) LPS 投与

E14 日目に滅菌処理を施したリン酸緩衝液 (-) (PBS (-)) に浸漬した綿棒で腔粘液を除去した後, LPS (*E. coli*. Serotype O55:B5; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO: 30 µl 0.1 mg/ml) または同量の PBS (-) を綿球に浸漬し, 腔内に留置し経腔投与とした。LPS は由来する細菌株によって毒性が異なることが考えられる。本研究では Cai らの論文 (25, 26) に準じて投与する LPS を決定した。一連の措置は全て清潔環境で実施した。経腔的に高濃度の LPS を投与するとかなりの頻度で早産となる。そのため LPS 投与量を最適化する為の予備実験を行った。LPS 投与量を漸減し, 早産が起こらない最高量を採用した。この E14 という時期は, 神経幹細胞からニューロンが産生された後, 主にグリア細胞が産生される時期であり, 大脳腹側側脳室周囲より OPCs が産生され, 大脳全体に遊走し, 分化成熟していく時期とされている。また, 臨床上もこの時期に炎症が負荷されると白質傷害がおこることはよく知られており, 今回もこの時期を炎症負荷のターゲットとした。給餌と LPS 投与の組合せで以下の 4 群を 3 つの時期に採材した。処置の概要を図 2 に示した。

1.母体炎症評価用 E15 採材, 対象臓器: 母体生殖器

- ① L-LPS 群 (n=3): 母体 L 餌給餌+LPS 投与群
- ② L-PBS 群 (n=3): 母体 L 餌給餌+PBS 投与群
- ③ N-LPS 群 (n=3): 母体 N 餌給餌+LPS 投与群
- ④ N-PBS 群 (n=3): 母体 N 餌給餌+PBS 投与群

2.胎子脳評価用 E17, 対象臓器: 胎子脳

- ⑤ L-LPS 群 (n=3)

⑥ L-PBS 群 (n=3)

⑦ N-LPS 群 (n=3)

⑧ N-PBS 群 (n=3)

3.新生子脳評価用 日齢 (P) 7, 対象臓器: 新生子脳

⑨ L-LPS 群 (n=5)

⑩ L-PBS 群 (n=5)

⑪ N-LPS 群 (n=4)

⑫ N-PBS 群 (n=4)

(3) 採材

始めに LPS 投与による膣炎が生じている事を確認するため, LPS 投与 24 時間後に頸椎脱臼による安楽殺処置を行い, 母体生殖器を摘出した。摘出した母体生殖器は直ちに PBS (-) で洗浄した後, 長軸方向に割を入れ, 伸展し 4%リン酸緩衝ホルマリン (PFA) にて固定を 24 時間行った。パラフィン包埋の後, 薄切, Hematoxylin Hosin (HE) 染色にて炎症の程度を評価した。

今回, 胎子期と新生子期の変化を比較検討するため, それぞれの群において妊娠 17 日 (E17:分娩 1-2 日前) の胎子脳と生後 7 日目 (P7) の新生子脳の評価を行った。

E17 に各群約半数の母マウスを頸椎脱臼による安楽殺の後, 速やかに開腹し, 子宮切開により, 胎子を娩出した。1 腹あたりの胎子数, 死亡数, 胎子重量を記録した後, 断頭による安楽殺を実施した。断頭後, ペーパータオルを用いて頭部の血液を吸着, 除去し, 胎子頭部の皮膚を剥離した。頭蓋骨が露出した胎子頭部の鼻側をカミソリ刃にて切断し, 胎子脳材料とした。この胎子脳材料を速やかにドライアイス粉末中に埋没することで新鮮凍結し, クリオスタット (CM3050S, Leica, Wetzlar, Germany)

を用いて、脳の新鮮凍結切片を作成した。設定温度-18℃、切片の厚さを 12 μm とした。

残りのマウスは自然分娩を待ち、P7 に体重を測定した後、イソフルランによる深麻酔の後、開胸を行った。4%PFA を心臓から灌流固定し、その後、E17 と同様に脳の新鮮凍結切片を作成した。

(4) 免疫組織学的検索

マウス脳地図 (83, 100) に従ってE17胎子脳およびP7新生子脳を薄切し、側脳室周囲および脳梁部を評価対象とした。

免疫染色は表 2 の手順で実施した。E17 胎子脳には OPCs のマーカーである Rabbit anti- oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig.2, IBL, Takasaki, Japan) を一次抗体 (36) として用いて、アポトーシスの指標である (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) -mediated dUTP nick end labeling: MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit II, MBL, Nagoya, Japan) と二重染色 (28) を行った。P7 新生子脳はアストロサイトマーカーである Mouse anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) と幼若神経系マーカーである Rabbit anti-nestin (Chemicon International, Temecula, CA), 成熟オリゴデンドロサイト Rabbit anti-myelin basic protein (MBP, Chemicon International) の染色 (24) を行った。GFAP, nestin 二重陽性細胞は反応性アストロサイトを反映するとされている (23, 61, 71, 96)。Nakagawa ら (71) の方法に従い GFAP 陽性細胞に占める GFAP, nestin 二重陽性細胞の割合を炎症の指標とした。免疫染色に用いた抗体とその希釈倍率を表 3 に示した。

一次抗体は 4℃, 15000 回転, 10 分遠心し, 上清を規定の倍率に希釈した一次抗体

液を作成した。湿潤箱中の標本上に一次抗体液を滴下し、4℃で10時間静置した。その後、PBS（-）で5分間の振盪洗浄を3回実施し、一次抗体液を除去した。二次抗体は4℃、15000回転、10分遠心し、上清と核染色液 Bis-benz-amide（DAPI; Sigma, St. Louis, MO）を0.5 µg/ml 添加した PBS（-）二次抗体液を作成した。湿潤箱中の標本上に二次抗体液を滴下し、室温で40分静置した。PBS（-）で5分間の振盪洗浄を3回実施し、二次抗体液を除去した。純水で5分間静置し、塩類を除去した。封入材（VECTASHIELD; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA）で速やかに封入した。

TUNEL との二重染色法は以下の手順で行った。表2の手順に従い一次抗体反応まで実施し、同様に PBS（-）で3回洗浄した後、TdT buffer II を滴下し、室温で5分反応させた。TdT buffer II を捨て、TdT 反応液を滴下し、37℃で60分反応させた。TdT 反応液を捨て、TB 液に浸漬し、室温で15分反応させた。純水で2分間4回洗浄して、blocking 溶液を滴下し、室温で10分反応させた。blocking 溶液を捨て、アビジン-FITC II を滴下し、37℃で30分反応させた。PBS（-）で5分間振盪洗浄3回し、二次抗体液を除去した。さらに純水で5分間静置し、塩類を除去し、速やかに封入材で封入した。

（5）陽性細胞計測法

陽性細胞の計測は脳梁を対象に行った。該当領域において染色強度の強弱に関係なく染色されている細胞を陽性とし、判定は目視で行った。GFAP, nestin および MBP は細胞質が染まる抗体であるため、これらの抗体を用いた染色では陽性領域に接している核を陽性細胞として計測した。処置内容を秘した状態で陽性細胞の計測は実施した。

(6) データ解析と統計学的処理

全ての測定値は平均値±標準誤差で表した。子体重 (E17およびP7), GFAPおよびnestin二重陽性細胞/全GFAP陽性細胞数, MBP陽性細胞数について第一要因を母体栄養条件, 第二要因をLPS処置として2-way ANOVAを用いて統計処理を実施した。2-way ANOVAを用いて有意差が認められた場合, N-PBS群を対照にした1-way ANOVA with post hoc test (Dunnett's Test) を行った。全ての統計処理は有意水準を5%とし, Prism 5.0d for Mac (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) を用いた。

3-3 実験結果

(1) 妊娠状態評価と胎子・新生子の成長

E15におけるLPS投与群は母体栄養に関係なく腔に好中球とマクロファージの浸潤が見られた (図3)。しかし, 絨毛膜や羊膜には炎症所見を認めず, 炎症性膣炎に相当する病理所見であった。PBS投与群には炎症所見を認めなかった。

妊娠による母体の体重増加はN-PBS群で1例がE2-3日目に一過性の体重減少を示した以外は4群で同様な変化を示した (図4a)。4群間で毎日の摂餌量に有意な差はなく, L群の蛋白質摂取量はN群の約50%であった (図4b)。E17で子宮内での胎子死亡は認めず, 胎子数に差は認められなかった。

胎子 (E17) 体重は2-way ANOVAにより低蛋白食による体重抑制を認めた (図4c)。新生子 (P7) 体重も2-way ANOVAにより低蛋白食による抑制を認めた (図4d)。E17および P7どちらの時期においてもLPS投与による体重変化は認めなかった。

(2) 免疫組織化学

E17

OPCs (Olig.2陽性細胞) の数に有意差はなく, アポトーシスを起こしている細胞 (TUNEL陽性細胞) は認めなかった (図5)。

P7

成熟オリゴデンドロサイトの数にL-LPS群でのみ有意に減少した (図6a-e)。アストロサイトの細胞数には有意差を認めなかった (図7a-e) が, 反応性アストロサイトの細胞数がアストロサイト細胞数全体に占める割合はLPS投与で増加した (図6f)。

3-4 考察

この実験では母体低タンパク質負荷と LPS 投与が胎子のオリゴデンドロサイトに及ぼす影響を評価した。E17 の胎子脳では母体低タンパク質負荷と LPS 投与の併用は OPCs に有意な効果を示さなかったにもかかわらず, P7 の新生子脳ではオリゴデンドロサイトの細胞数を約 50%減少させた (図 6)。この結果は母体低タンパク質負荷と LPS 投与の併用がオリゴデンドロサイトの成熟を阻害していることを示唆している。

マウスの脳ではミエリン鞘の形成は生後 21 日目までに完成すると言われている。Wright らは 7-14 日齢で減少した MBP タンパク質は成長後も回復できない事を報告している (107)。この報告によれば, 本実験が明らかにした 7 日齢の新生子脳における MBP 陽性細胞 (成熟オリゴデンドロサイト) の減少 (図 6) は成長後も回復が望めない。オリゴデンドロサイトの減少は精神疾患発症と関与している (38, 98) ことから, 母体低タンパク質食負荷と LPS 投与の併用によって精神疾患発症のリスクが高くなることが示唆された。

L-LPS 群でのみ成熟オリゴデンドロサイト数の減少が観察されたことは母体低タンパク質負荷は OPCs の感染に対する脆弱性を増強していることを示唆している。

OPCs の成熟の鍵となる因子としてインスリン様成長因子 (IGF) が知られている

(111)。胎子における IGF の発現は母体低栄養負荷で抑制されることが知られている (30)。IGF がオリゴデンドロサイトをネクロシスから保護している (110) ことから脆弱性と IGF の関与が推察される。

E17 の時点では OPCs の分化に母体低タンパク質食負荷と LPS 投与による変化は見いだせなかった (図 5)。この結果は E17 までのオリゴデンドロサイト発生には母体低タンパク質食負荷と LPS 投与の効果が無かったことを示唆している。一方で、P7 の時点では母体低タンパク質食負荷を伴う LPS 投与によって白質における成熟オリゴデンドロサイトの数が減少している (図 6)。これらの結果は、母体低タンパク質食負荷は胎子脳のオリゴデンドロサイトの分化を E17 から P7 までの間抑制し、それによって OPCs が感染に対して脆弱となることを示唆している。

LPS 投与後 24 時間を経過した時点での母体腔の炎症像は L-LPS 群と N-LPS 群で同様であった (図 3)。このことは本実験における LPS 投与に対する免疫応答は母体の栄養条件によらず一定であったことを示唆している。同時に、P7 の脳における LPS 投与による反応性アストロサイトの割合も母体栄養条件によらず一定であった (図 7f)。これらの結果は母体への LPS 投与による腔炎が新生子の脳炎を誘発し、その脳炎の重症度は母体栄養条件にかかわらず一定であったことを示唆する。同時に、母体での炎症像が腔に局限し (図 3)、絨毛膜及び羊膜への炎症の波及を認められなかったことから、子の脳へ LPS が直接作用したとは考えづらい。サイトカインなど液性因子が胎盤を経由して作用したと推測されるが、詳細な機構は解明出来なかった。

本研究の結果は母体の栄養条件が悪化するとたとえ母体の腔炎が軽度であったとしても子の脳損傷は重症化されることを示唆している。したがって、母体の栄養およ

び感染の管理はたとえ軽度の感染であっても，共に子供の精神疾患を予防するために重要となる。

4. 第二章 母体低タンパク質食負荷による胎子心臓の HIF1 α 遺伝子の異常発現に関する研究

4-1 緒言

母体低栄養は児の将来に精神疾患だけでなく心疾患、糖尿病あるいは高血圧 (12, 77, 106) などの生活習慣病の発症リスクを約 2 倍に高めることが報告されている。高血圧は循環器疾患や脳血管障害の大きな要因である (42)。事実、母体低栄養に暴露された児は循環器疾患や脳血管障害の発症率が高いことが知られている (12)。

このような疾患リスクの機序解明を目的に母体低栄養と遺伝子発現量変化の検索も進められている (6, 16, 32, 99, 101)。さらに遺伝子の発現量変化は受精後の環境変化に反応した結果であるので、塩基配列の変化を伴っている可能性が低いことから、エピジェネティクスな機構も調査されている (18)。しかし未だに不明な点が多く、母体低栄養負荷による各疾患の発症機構を解明するに至っていない。そこで本研究では母体低栄養と循環器疾患の関係から心臓の胎子期における転写因子の発現量の変化に着目して母体低栄養の影響を検証した。転写因子は複数の遺伝子群の発現量を環境に応じて調整している遺伝子である。心臓を対象とした網羅的な解析の結果、有意な発現量増加を示した転写因子の中から低酸素状態において発現量が増加することが知られている hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 α), (60) に着目した。HIF1 α の発現量増加はたとえば糖代謝を嫌気性に遷移させるなど環境に適応して遺伝子ネットワークを調整していることが報告されている (48,

64)。胎子の置かれている子宮内環境は出産後の環境と比較して低酸素状態であり、胎子期の HIF1 α 発現は血管形成や代謝を調整している (4, 52)。加えて、HIF1 α の発現は胎子の心臓形成に重要な役割を果たしており (51, 55, 86), HIF1 α を欠損したマウスはE10-11の時期で心臓の低形成となる。同時に、HIF1 α の発現量増加は成人の循環器疾患で報告されている (58)。第二章では母体低栄養負荷によって増加する循環器疾患に注目し、胎子心臓形成と循環器疾患に重要な役割を果たしている HIF1 α の発現量の変化に対する母体低タンパク質食負荷の影響を評価した。

4-2 実験材料及び実験方法

本研究は、東北大学医学部実験動物倫理委員会の承認のもと、「東北大学における動物実験に関する指針」に従い、平成 20 年 4 月から平成 23 年 3 月に実施した。対象である C57BL/6N マウス 12 匹の雌マウスを医学部動物実験施設内に導入し、自家繁殖を行い、データを採取解析した。

(1) マウスの飼育環境および給餌

マウスの導入元、飼育環境および給餌方法は第一章に準拠して実施した。マウスの計測時間を日中10時、実験開始時間を13時に変更したため、妊娠初日の表記をE0.5に変更した。母体への給餌で以下の2群を作成した。処置の概要を図8に示した。

① L群 (n=6) :母体L餌給餌

② N群 (n=6) :母体N餌給餌

(2) 胎子心臓の採材

E17.5に母体 (n=6) を頸椎脱臼による安楽殺の後、速やかに開腹、子宮切開により胎子を娩出した。1腹あたりの胎子数、死亡数、胎子重量を記録した後、断頭によ

る安楽殺を実施した。断頭後、半数の胎子の心臓を実体顕微鏡下で摘出し、4%PFAに2時間浸漬した後、20%スクロース液に一晩浸漬し、固定脱水処理を施した。この心臓をアルミ箔で作成したケース内でOCTコンパウンド（Tissue-Tek® 4583; Sakura Finetek Japan, Co. Ltd, Tokyo, Japan）に包埋し、第一章の脳標本と同様にドライアイス粉末中に埋没し、凍結心臓標本を作製した。

残り半数の胎子は分子生物学的解析に用いた。実体顕微鏡下で摘出した心臓は、滅菌処理済PBS（-）に浸漬し、腔内の血液を除去した。心耳等の付属器を慎重に除去した後、心室および心房組織の重量を計測し、速やかに液体窒素に投入し、凍結処理を施した。

最後に全ての個体を実体顕微鏡下で兎径部を切開し、生殖器の観察による胎子の性別を判定を行った。

（3）RNA の抽出，cDNA の合成

RNA 抽出は RNeasy Mini Kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用い、以下の手順で行った。サンプルに RLT 溶液 600 µl を加え、シリンジに取り付けた 21G の注射針中に数十回通して破碎し、QIAshredder スピンカラムにサンプル溶液を添加し、2 分間遠心し破碎を行った。さらに同量の 70%エタノールを添加し、速やかに混和し、2 ml コレクションチューブの中にセットした RNeasy スピンカラムに滴下し、10,000rpm で 15 秒間遠心操作を行った。ろ液を捨て、350 µl の RW1 溶液を RNeasy スピンカラムに加え、10,000rpm で 15 秒間遠心操作を行った。10 µl の DNase I ストック溶液を RDD 溶液に加えて混和し、先ほどの RNeasy スピンカラムに添加し、15 分間室温に置き、DNase 処理を行った。その後、350 µl の RW1 溶液を RNeasy スピンカラムに加え、10,000 rpm で 15 秒間遠心操作を行った。ろ液を捨て、500 µl

の RPE 溶液を RNeasy スピнкаラムに加え、10,000 rpm で 15 秒間遠心操作を行った。ろ液を捨て、さらに 500 μ l の RPE 溶液を RNeasy スピнкаラムに加え、10,000 rpm で 2 分間遠心操作を行った。RNeasy スピнкаラムを新しい 1.5ml コレクションチューブにセットし、RNase フリー水 50 μ l をスピнкаラム・メンブレンに直接添加し、10,000 rpm で 1 分間遠心操作を行い、RNA を抽出した。

抽出した RNA 2 μ g と、50 μ M Oligo dT 1 μ l、10 mM の dATP, dGTP, dCTP, dTTP を含んだ dNTP mix w を 1 μ l と H₂O を加えて全体で 10 μ l とし、65°C で 5 分間加熱し、氷上に 1 分間静置した後、2 μ l の 10 \times RT buffer、4 μ l の 25 mM MgCl₂ 溶液、2 μ l の 0.1M DTT、1 μ l の RNaseOUT、1 μ l の SuperscriptIII RT を加え、50°C で 50 分間、85°C で 5 分間保温した後、4°C の氷上に静置した。その後、1 μ l の RNase H を加えて混和し、37°C で 20 分間加温し、反応を終了させて cDNA の合成を行った。

(4) 網羅的遺伝子発現解析

遺伝子発現の網羅的解析には TORAY 社製 3D-Gene mouse chip 25k を用いた。このチップは既知の 25,233 遺伝子の発現を同時に評価することができる (72)。各胎子から抽出した RNA を同腹の雌雄各 1 匹ずつ同量を混和した RNA 混合サンプルを作成した。一枚のチップ上で Cy3 (緑) でラベルした N 群 RNA 混合サンプルと Cy5 (赤) でラベルした L 群 RNA 混合サンプルを反応させ、2 色の発色量から各遺伝子の発現量を定量した。本研究では心臓サンプルを対象に 6 枚のチップを使用して遺伝子発現の網羅的解析を実施した。2 群間の遺伝子の発現量比較には geWorkbench version 2.1.0 (Columbia University, New York, NY) を用いた (34)。また、有意な発現量変化を示した転写因子の下流に位置する遺伝子の調査には

Transcriptional Regulatory Element Database

(<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=searchTFGeneForm>) を用い

た。下流に位置する遺伝子の発現量変化の検定には PAGE 法 (54) を用いた。PAGE 法は大きな発現変動を示す比較的少数の遺伝子よりもパスウェイ上の複数遺伝子の中程度の変化が生物学的に重要な場合に有効な方法である。

(5) リアルタイム RT-PCR

網羅的遺伝子発現解析で有意な発現増加が認められた HIF1 α とその抑制遺伝子である PHD1 を対象にリアルタイム RT-PCR を用いて遺伝子発現量の相関解析を行った。PHD1 は細胞の酸素センサーの役割をしている (67)。PHD1 は HIF1 α のプロリル残基を水酸化することで HIF1 α を分解する (66)。リアルタイム RT-PCR 反応には astercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いた。使用したプライマーの配列を表 4 に示す。

反応液を表 5 で示した分量で混合し、軽く振盪した後、プレートにセッティングし、

①95℃ 15 分間

②94℃ 15 秒間

③60℃ 30 秒間

④72℃ 30 秒間

⑤95℃ 15 秒間

⑥60℃ 15 秒間

(②～④を 40 サイクル繰り返す)

の後、比較 Ct 法を用いてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。ハウスキーピング遺伝子の選択には予め予備的な検討を行い、最も発現量の変動が小さかった GAPDH を採用した。

(6) 病理組織学的検索

心臓は長軸方向に垂直にクリオスタットを用いて厚さ 8 μm , 設定温度 -18°C で薄切を行い, 左右の心室および心室中隔を評価対象とした。心臓では同時に HE 染色を施し, 組織像の評価を行った。

免疫染色は第一章と同様に表 2 の手順に従い実施した。Rabbit ant-HIF1 α antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を 0.3% Triton X-100, 1%ウシ血清添加 PBS (-) に 200 倍希釈した溶液を一次抗体溶液として用いた (表 6)。anti-rabbit Cy-3 を 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI 添加 PBS (-) で 500 倍希釈した溶液を二次抗体溶液として用いた。

(7) データ解析と統計学的処理

全ての測定値は平均値 \pm 標準誤差で表した。胎子体重, 臓器重量対体重比, リアルタイム PCR による各遺伝子の発現量は雌雄別に Mann Whitney test を実施し, 同性の N 群と L 群を比較した。HIF1 α と PHD1 間の相互関係に関する検定では linear regression test を実施した。2 つの遺伝子間の発現量の相同性は, その遺伝子間の発現パターン推定する方法として用いた (27)。全ての統計処理は有意水準を 5%とし, Prism 5.0d for Mac (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) を用いた。

4-3 実験結果

(1) 妊娠状態評価と胎子の臓器重量

妊娠による母体の体重増加は第一章での結果と同様にN群およびL群の間には差はみられなかった (N群: $13.3 \pm 0.75 \text{ g}$, L群: $13.7 \pm 0.71 \text{ g}$) を示した (図9a)。1日当たりの摂餌量も2群間に有意な差はなく, 両群の一日の平均蛋白質摂取量はN群が $0.64 \pm 0.01\text{g}$, L群が $0.31 \pm 0.00 \text{ g}$ であった (図9b)。1腹当たりの胎子の数はN群 8.3

± 1.37 匹, L群: 9 ± 1.17 匹 で有意な差を認めなかった。採材時に死亡していた胎子は両群共に観察されなかった。

胎子体重はN群とL群の間に有意差はなく、餌による体重抑制を認めた第一章の試行と異なる結果を示した(図10a, b)。心臓重量が体重に占める割合は雌胎子でのみ, L群で有意な増加を認めた(図10c, d)。一方で、雄胎子では体重および心臓重量が体重に占める割合共に餌による有意な変化は認めなかった。

(2) 網羅的遺伝子発現解析

母体低タンパク質食負荷による7,242遺伝子の有意な発現変化がマイクロアレイ解析によって検出された(図11)。転写因子に分類される遺伝子の中で133種類存在した。133種類の転写因子の中で、下流遺伝子の有意な発現変化を伴った転写因子がHIF1 α を含む90種類存在した。HIF1 α の下流は40種類の遺伝子が発現量に有意な変化を認めた。PAGE法による解析で21種類の遺伝子が有意な発現増加を示し(表7)、残りの19遺伝子は発現量が有意に減少した(表8)。解糖系の調整に関与しているhexokinase 1 (HK1) のmRNA発現量の増加を確認した。

(3) リアルタイム RT-PCR

母体低タンパク質食負荷によりL群の雄胎子の心臓ではHIF1 α とPHD 1 の発現量が有意に増加した(図12a, c)。一方、雌胎子の心臓ではHIF1 α とPHD 1 の発現量は母体低タンパク質食負荷による影響は認められなかった(図12b, d)。HIF1 α とPHD 1 の発現量の相関を確認すると、N群では両性で有意な相関を認めた(図13a, b)がL群ではHIF1 α とPHD 1 の発現量の相関に有意な相関を認めなかった(図13c, d)。

(6) 病理組織学的検索

HE 染色による病理組織学的検索では、左右の心室壁においては母体低タンパク

質食負荷による組織学的な変化は検出できなかった。しかし、心室中隔においてはL群の雄胎子の心臓で空胞変性を確認した(図 14g)。そこで心室中隔に注目して HIF1 α の免疫染色標本を観察すると,L群では雄だけでなく雌でも HIF1 α タンパク質の蓄積が観察された(図 14a-d)。

4-4 考察

この実験でマイクロアレイによる網羅的な解析によって、母体低タンパク質食負荷に反応して発現量が変化した 133 の転写因子を発見した。その中から成人の循環器疾患 (58) やその他の病的状態 (65, 81) との関与が知られている HIF1 α に注目した。マイクロアレイの結果では HIF1 α の発現量の変化は小さかった。しかし、転写因子は小さな発現量の変化で下流遺伝子群の発現量を調整していることが知られている (70)。

HIF1 α の発現量は酸素分圧に反比例し、PHD1 の発現量は酸素分圧に比例する事が報告されている (48)。この実験では HIF1 α と PHD1 の発現量が N 群では正の相関を示した(図 13a, b; 雄: $r^2 = 0.6666$, 雌: $r^2 = 0.6167$)。一方で, L 群では HIF1 α と PHD1 の間の相関が消失した(図 13c, d)。胎子の心臓では PHD1 による HIF1 α の調整機能が母体低タンパク質食負荷によって損傷していると推察できる。PHD1 の機能障害は HIF1 α の発現量を増加し,解糖系を増加することが報告されている (7)。この実験のマイクロアレイ解析でも HIF1 α の下流に位置する解糖系調節遺伝子の 1 種であるHK1 の発現量が L 群で増加していた(表 11)。この結果は母体低タンパク質食負荷によって PHD1 の機能が低下し, 解糖系が亢進したことを示唆している。

免疫染色の結果はL群の胎子の心臓で HIF1 α タンパク質が蓄積していたことを示

している（図14c, d）。この結果は雄胎子の心臓ではリアルタイムPCRで検出した mRNA の結果と一致している（図12a）が、雌の心臓では mRNA の発現量が増加していないにもかかわらず（図12b）、タンパク質レベルでの蓄積が確認された。これは母体低タンパクによる PHD1 の機能不全によってタンパク質レベルで HIF1 α 発現量の調整ができなかったことを示唆している。

HIF1 α は低酸素で発現が誘導される（81）。Oliver らは母体低タンパク質食負荷では胎子の酸素分圧が変化しないことを報告している（75）。一方、腫瘍組織では HIF1 α は正常酸素分圧でも発現量が増加し、腫瘍組織が周辺環境と適応する中心的な役割を果たしている（17）。この様に、この実験で発見した両性の心臓における HIF1 α タンパク質の増加は母体低タンパク質食負荷に由来する環境変化に適応した反応だと推察される。

胎子体重に占める心臓重量の割合は L 群の雌でのみ増加していた（図 10d）。一方、HIF1 α とPHD1の mRNA 発現量は L 群の雄でのみ増加していた（図 12a, c）。これらの結果に性差が存在することは母体低タンパク質食負荷に対する心臓での反応に性差があることを示唆しているが、性差を生じさせる機構を明らかにすることは出来なかった。

HIF1 α のタンパク質レベルでの発現量の増加は低酸素でないにもかかわらず L 群の雌雄の心臓で確認出来た。この結果は母体の栄養不足が胎子の心臓で HIF1 α の発現を誘導することを示唆している。

5. 第三章 母体低タンパク質食負荷によって誘導された胎 子脳の低酸素関連遺伝子に関する研究

5-1 緒言

母体低栄養は IUGR のリスク因子 (76) であり、児の将来に高血圧 (77) などの生活習慣病の発症リスクを高めることが報告されている。高血圧は循環器疾患や脳血管障害の大きな要因である (42)。事実、母体低栄養に暴露された児は循環器疾患や脳血管障害の発症率が高いことが知られている (12, 18)。第二章で示したように母体低栄養負荷により胎子の心臓で HIF1 α の遺伝子発現量が増加していた。循環器疾患と同様に脳血管疾患でも成人では HIF1 α との関連が知られている。Ostrowski らはラットの頸動脈を圧迫して作成したくも膜下出血モデルを用いて HIF1 α タンパク質の発現量増加がアポトーシスの亢進と脳血管障害の重症化を引き起こすことを示した (77)。HIF1 α は細胞の低酸素に反応する転写因子である (60)。同時に、HIF1 α は LPS による炎症を増強することが知られている (21)。第一章で示した様に母体低栄養負荷は子のオリゴデンドロサイトの LPS 感受性を亢進した。この様に将来の脳血管障害や胎子期の感染に対する脆弱性と HIF1 α 発現量の増加の関連が推察されるにもかかわらず、母体低栄養負荷による胎子脳での HIF1 α 発現量に対する影響は解っていない。そこで第三章では胎子脳を対象に母体低栄養負荷による HIF1 α 発現量への影響を評価した。

HIF1 α は低酸素センサーとして知られているが、低酸素状態ではなくとも mammalian target of rapamycin (mTOR) の刺激によってタンパク質への翻訳が

亢進する (57)。加えて、mRNA レベルでも HIF1 α 遺伝子の転写が mTOR の発現量に依存して増加している (63)。mTOR はセリン/スレオニンタンパク質キナーゼであることが報告されている (41)。mTOR タンパク質は細胞成長、細胞増殖、細胞運動性、細胞生存、タンパク質合成、転写、細胞のエネルギーレベルのセンシングなどを各受容体からのシグナルを受けて異なるタンパク質をリン酸化することで調整している (13, 108)。

第三章では mTOR と HIF1 α の各下流遺伝子群の発現量の変化と mTOR の発現量と HIF1 α の発現量の相関を検証し、母体低タンパク質食負荷による胎子脳への影響を評価した。

5-2 実験材料及び実験方法

本研究は、東北大学医学部実験動物倫理委員会の承認のもと、「東北大学における動物実験に関する指針」に従い、平成 20 年 4 月から平成 23 年 3 月に実施した。対象である C57BL/6N マウス 18 匹の雌マウスを医学部動物実験施設内に導入し、自家繁殖を行い、データを採取解析した。

(1) 胎子脳の採材

第二章の実験で胎子心臓採材時に断頭した頭部から胎子脳を以下の手順で採材した。半数は新鮮凍結標本の作成に使用し、第一章の E17.5 胎子脳と同様の手順で新鮮凍結を行った。残りの半数は分子生物学的解析に用いた。肉眼による目視下で頭部の皮膚、頭蓋骨をマイクロ剪刀、マイクロ鑷子で剥離し、嗅球から延髄までの胎子脳を摘出、重量を計測し、速やかに液体窒素に投入し、凍結処理を施した。

(2) 低酸素状態の組織学的評価

第二章のL群の胎子心臓で高発現が確認されたHIF1 α は低酸素で発現が増加することが知られている (60)。第三章では胎子脳の低酸素状態を組織学的に評価するために低酸素に反応するhypocypromeTM-1 (pimonidazole; Hypoxyprobe, Inc; Burlington, MA, USA) を用いた実験を実施した。N群, L群各3匹の妊娠マウスを用意し、採材の60分前に予め母体皮下にhypocypromeを60 mg/kg投与した。他の胎子脳と同様に採材, 凍結処理を行い, クリオスタットを用いて脳の新鮮凍結切片を作成した。マウス胎子脳地図 (100) を参考に胎子脳を薄切し, 側脳室周囲および脳梁部を評価対象とした。設定温度-17°C, 切片の厚さは8 μ mとした。標本は4°Cのアセトンで10分間固定, 風乾した後, PBS (-) で5分間洗浄を3回行い, 湿潤箱内で0.1% Triton X-100, 1%ウシ血清添加PBS (-) で20倍希釈したanti-pimonidazole antisera PAb2627を滴下, 4°Cで静置した。10時間後, PBS (-) で5分間洗浄を3回行い反応液を除去した後, 0.5 μ g/ml DAPI添加PBS (-) で500倍希釈したFITC-conjugated goat anti-rabbit antibodyを滴下, 室温で60分反応させた。PBS (-) で5分間洗浄を3回行い, 純水による脱塩洗浄5分間の後, 封入を行った。陽性対照として母体麻酔下で子宮動脈を5分間圧迫し, 低酸素状態に暴露された同胎齢のマウス胎子脳を用意した。

(3) 免疫組織学的検索

脳は構造が不均一であるため, 物質の局在を明らかにすることが必要になる。第二章で胎子心臓の評価に用いた Rabbit anti-HIF1 α antibodyに加えて, sheep anti-Olig.2 antibody (Abcam, Cambridge, UK) を 0.3% Triton X-100, 1%ウシ血清添加 PBS (-) で各 100 倍および 500 倍希釈した一次抗体液を用いた (表 9)。二次抗体溶液は anti-rabbit Cy-3 と anti-sheep IgG-H&L (DyLight®488; Abcam) を 0.5 μ g/ml DAPI 添加 PBS (-) でそれぞれ 500 倍希釈した溶液をとして用い, 表 2

の手順に従って免疫染色を実施した。

(4) RNA の抽出, cDNA の合成

RNA の抽出および cDNA の合成は第二章と同様の手法を用いて行った。

(5) リアルタイム RT-PCR

第三章では HIF1 α および HIF1 α の発現を非低酸素状態で亢進性に制御している mTOR を対象にリアルタイム RT-PCR を用いて遺伝子発現量の相関解析を行った。実験の手法は第二章に準じて行い、ハウスキーピング遺伝子の選択には予め予備的な検討の結果、最も発現量の変動が小さかった HPRT1 を採用した。使用したプライマーの配列を表 10 に示す。

(6) 網羅的遺伝子発現解析

第二章で母体低タンパク質食負荷によって L 群の胎子心臓で HIF1 α の遺伝子発現量が増加し、その下流遺伝子群も発現量の増加が認められた。これを受けて、同時期の脳でも HIF1 α および低酸素非依存的に HIF1 α の発現を刺激する mTOR とそれらの下流遺伝子群の発現量に変化が生じているかを確認するために 3D-Gene mouse chip 25k を用いたマイクロアレイ解析を行った。検体の比較方法は実験 2 の手順に従って実施した。

(7) データ解析と統計学的処理

全ての測定値は平均値 \pm 標準誤差で表した。臓器重量対体重比、リアルタイム PCR による各遺伝子の発現量は雌雄別に Mann Whitney test を実施し、同性の N 群と L 群を比較した。HIF1 α と mTOR 間の相互関係に関する検定では linear regression test を実施し、遺伝子間の発現パターンの類似性を推定した (27)。全ての統計処理は有意水準を 5% とし、Prism 5.0d for Mac (GraphPad Software Inc., San Diego,

CA) を用いた。

5-3 実験結果

(1) 胎子脳の評価

胎子脳重量が体重に占める割合は母体低タンパク質食負荷による影響を認めなかった (図 15a, b)。低酸素状態で発色する hypocyprobe-1 の染色性に性差はなく, N 群および L 群共に SVZ においては数個の細胞で発色を認める程度で差は見られなかった (図 15c-e)。

(2) リアルタイム RT-PCR

mRNA レベルでは母体低タンパク質食負荷によって HIF1 α と mTOR の発現量が有意に増加した (図 16a-d)。遺伝子の発現パターンに雌雄差を認めなかったため HIF1 α と mTOR の遺伝子発現量の線形解析は雌雄を同一の群として解析を実施した。2 つの遺伝子発現量の間に有意な正の相関を認めた ($R^2 = 0.7700$ $p < 0.0001$; 図 16e)。

(3) 免疫組織学的検索

N 群では HIF1 α 陽性細胞は白質と皮質で観察された (図 17a)。L 群では白質と皮質に加えて SVZ でも陽性細胞が観察された (図 17b)。L 群では SVZ における Olig.2 陽性細胞 (オリゴデンドロサイト前駆細胞) に HIF1 α 陽性細胞が多くみられた (図 17d)。

(4) 網羅的遺伝子発現解析

HIF1 α 下流遺伝子で L 群で N 群と比較して有意に発現量が増加している 10 遺伝子を図 18a と表 11 に示した。一方, transformation related protein 53 (p53) 発現量は L 群で有意な増加は確認出来なかった。

mTOR パスウェイ遺伝子群の内、有意な増加を示した遺伝子を図 18b と表 12 に示した。また、protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (ppp2r2c) は有意な発現量の減少を示した。

5-4 考察

この章では胎子脳における HIF1 α の mRNA 発現量が性差に関係なく母体低タンパク質食負荷によって増加したことを見出した (図 16a, b)。同時に、この HIF1 α の mRNA 発現量増加は低酸素状態に由来しないことを hypoxypoint-1 の染色で示した (図 15c, d)。

次に HIF1 α の発現量増加の機構を理解するために非低酸素状態で HIF1 α の発現量を亢進する mTOR (57, 63) と HIF1 α の mRNA 発現量の相関を評価した (図 16e)。HIF1 α と mTOR の mRNA 発現量は有意な正の相関 ($R^2 = 0.7700$, $p < 0.0001$) を示した。母体低タンパク質食負荷による HIF1 α と mTOR の mRNA 発現量が同様に増加した結果は、mTOR の発現量増加が HIF1 α の発現を刺激したことを示唆している。HIF1 α の発現量増加は低酸素状態 (60) に依存する機構と mTOR の mRNA とタンパク質が誘導する低酸素に依存しない経路 (57, 63) が知られている。この実験では胎子脳が低酸素状態ではないこと (図 15c, d) と mTOR の発現量が有意に増加したこと (図 16c, d) を確認している。さらに mTOR パスウェイの遺伝子群の発現量増加 (図 18b, 表 12) は母体低タンパク質食負荷によるタンパク質レベルでの mTOR の増加を示唆している。Ddit4 遺伝子の発現量は HIF1 α の mRNA とタンパク質レベルでの安定化を介した mTOR の発現量によって調整され、ネガティブフィードバックループを形成している (44)。つまり、マイクロアレイ解析が示した Ddit4 の発現量

増加は mTOR 発現増加による間接的な刺激に由来すると考えられる。同時に Ddit4 は mTOR を抑制するタンパク質をコードしている (93)。母体低タンパク質食負荷によって胎子脳で同時に Ddit4 と mTOR の発現量が増加している機構に関しては更なる研究が必要である。mRNA レベルでの mTOR の過剰発現が mTOR パスウェイを活性化し、それが mRNA とタンパク質レベルでの HIF1 α の過剰発現を誘導したと考えられる。

mTOR の発現量は細胞のエネルギーレベルに依存している (108)。この実験では母体が低栄養状態にもかかわらず mTOR の発現量が増加している。この実験で使用している L 餌はタンパク質含有量を減らす代わりに熱量を維持するために脂質などを増加している、それらの成分が mTOR の発現を亢進していると考えられる。IUGR 児の胎盤ではアミノ酸トランスポーターや mTOR の発現量が減少しており、これらの変化は胎児の成長制限に直接貢献していることが示唆されている (87)。mTOR の発現量は細胞のエネルギーレベルに依存しているので母体低タンパク質負荷により mTOR の発現量の低下が予想された。しかし、L 群と N 群の胎子体重の間に有意差がなく IUGR となっていないこと (図 10a, b) から、この実験ではタンパク質の代わりに補充した成分により mTOR の発現量が増加していると考えられる。

胎子脳における HIF1 α タンパク質の局在を免疫染色で検証した。HIF1 α 陽性の OPCs は L 群の SVZ で観察された (図 17d)。胎子脳の OPCs は低酸素に対して脆弱であり、そのことが脳障害の原因になると考えられている (102, 103)。HIF1 α タンパク質の蓄積は成人期の脳で低酸素に対する耐性を誘導する (15)。胎子脳で見出した HIF1 α タンパク質の OPCs への蓄積は OPCs の低酸素に対する耐性が母体低タンパク質食負荷によって変化する可能性を示唆している。しかしながら、胎子脳への

HIF1 α タンパク質の蓄積と低酸素耐性に関する報告はまだなく、更なる研究が必要である。いずれにせよ、HIF1 α タンパク質のOPCsへの局在はOPCsの低酸素耐性が変化している可能性を示めている。

母体低タンパク質食負荷によって発現量の増加が確認されたHIF1 α 下流遺伝子は全て低酸素でも発現量が増加する遺伝子である(図18a, 表11)。Egln1はHIF1 α を分解するタンパク質をコードしている遺伝子であり(48),この遺伝子は低酸素状態で発現量の増加が報告されている(43)。p53遺伝子は重篤な低酸素状態で発現量が増加する(3, 33, 39)。加えて、重篤な低酸素状態はIUGRや流産を引き起こす(88)。しかし、本研究では第二章で示したように母体低タンパク質食負荷によるIUGRも流産も確認出来なかった。このことから、母体低タンパク質食負荷に対する胎児脳の反応は低酸素様ではあるが重篤な低酸素状態とは異なる。つまり、母体低タンパク質食負荷によって誘導されたHIF1 α 下流遺伝子群の発現変化は非重篤な低酸素状態と類似であった。

母体低タンパク質食負荷は胎児脳でmTORパスウェイの活性化を介して低酸素様の遺伝子発現を誘導した。

6. 結論

本研究は母体低タンパク質食負荷とLPS投与の併用によって子のオリゴデンドロサイト分化が阻害されることを第一章で示した。このモデルでは、母体LPS投与によって誘導された新生子脳の反応性アストロサイトが占める割合が母体栄養条件による有意差を示さなかったことから、誘発された脳炎は同程度だったと推定できる。それにもかかわらず、母体低タンパク質食負荷とLPS投与の併用によって成熟オリゴデンドロサイトが減少した。これはLPS投与によって誘発された炎症に対して母体への低タンパク質食負荷によって胎子脳のオリゴデンドロサイトが脆弱となったことを示唆している。母体低タンパク質食負荷によるIGFなど成長因子の減少によりオリゴデンドロサイトの分化成熟が抑制され、その脆弱性に炎症という負荷がさらに加わることにより、後の成熟オリゴデンドロサイトの減少に影響している可能性が推定できるが、確認には今後の研究が必要である。

第二章では胎子の母体低タンパク質食負荷による遺伝子背景の変化を評価するために心臓と網羅的な遺伝子発現解析を行い、転写因子の一つであるHIF1 α の発現量増加を発見した。母体低栄養に暴露された児は成人後に循環器疾患の発症率が有意に増加することが知られている(12)。同時に、成人では循環器疾患発症患者の心臓でHIF1 α 発現量が増加していることが知られている(58)。母体低タンパク質食負荷に適応した胎子心臓におけるHIF1 α 発現量の増加が成人後の循環器疾患発症リスク増加に関与しているか、あるいは胎子期、新生子期の突然死のなど他の時期におけるリスク増加に関与しているのかは今後の検討が必要である。

一方で成人脳ではHIF1 α タンパク質の蓄積は虚血によって生じる脳出血を重症化することが報告されている(78)。第三章で示したように母体低タンパク質食負荷に

よって胎子脳においてmTORパスウェイの活性化によるHIF1 α の発現量が増加した。同時にOPCsにおけるHIF1 α タンパク質が蓄積していたことから、母体低タンパク質食負荷によってオリゴデンドロサイトの低酸素に対する性質が変化している可能性が示唆された。母体低栄養によって誘導されたHIF1 α の過剰発現は心臓では性差を見出した。一方、脳では性差を認めなかった。この臓器による性差の有無の原因となる機構は不明であるが、循環器疾患や脳血管障害および精神疾患の発症における性差の一因を示す可能性がある。今後の研究が必要である。

HIF1 α は炎症を増強する役割を果たしていることが報告されている(21)ことから、母体低栄養によって誘導されるHIF1 α の過剰発現は、子の脳における炎症に対する脆弱性に関与している可能性がある。一方、mRNAおよび/またはタンパク質レベルでのHIF1 α の発現増加は、脳血管および循環器疾患の発症や重症化に関与している。

DOHaDの概念によれば、母体の低栄養だけでなく、過剰栄養も同様に胎子の疾病リスクを上昇させる(22)。従って、母体の栄養管理は子の脳血管および循環器疾患、母体軽度感染症が誘導する子の精神疾患を防ぐために重要となる。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり、格段のご配慮を賜りました、帯広畜産大学基礎獣医学研究部門形態機能学分野獣医薬理学教室 石井利明教授、 岩手大学農学部獣医薬理学教室 古濱和久教授、東京農工大学農学部家畜薬理学講座 下田実教授、 岐阜大学応用生物科学部獣医薬理学研究室 海野年弘教授、 帯広畜産大学畜産学部基礎獣医学研究部門獣医解剖学教室 北村延夫教授ならびに岐阜大学連合大学院連合獣医係 牧野貴子様 に心より御礼申し上げます。

またご指導、ご高閲を賜りました東北大学国際高等研究教育機構国際融合領域研究所木村芳孝教授ならびに産科学婦人科学分野八重樫伸生教授に深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、様々な支援をして下さった木村研究室のスタッフの方々、実験動物の飼育環境維持に努めて頂いた東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設の笠井憲雪教授をはじめとするスタッフの方々に深く御礼申し上げます。

8. 参考文献

- 1) Agbor, T.A., Cheong, A., Comerford, K.M., Scholz, C.C., Bruning, U., Clarke, A., Cummins, E.P., Cagney, G. and Taylor, C.T. (2011). Small ubiquitin-related modifier (SUMO) -1 promotes glycolysis in hypoxia. *J. Biol. Chem.* 286, 4718~4726.
- 2) Almeida, S.S., Tonkiss, J. and Galler, J.R. (1996). Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. *Physiol. Behav.* 60, 197~201.
- 3) An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V. and Neckers, L.M. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature.* 392, 405~408.
- 4) Anderson, L.L., Mao, X., Scott, B.A. and Crowder, C.M. (2009). Survival from hypoxia in *C. elegans* by inactivation of aminoacyl-tRNA synthetases. *Science.* 323, 630~633.
- 5) Andrews, D.L., MacAlpine, D.M., Johnson, J.R., Kelley, P.M., Cobb, B.G. and Drew, M.C. (1994). Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Physiol.* 106, 1575~1582.
- 6) Anstead, G.M., Chandrasekar, B., Zhang, Q. and Melby, P.C. (2003). Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network, nuclear factor-kappaB activation, and nitric oxide production. *J. Leukoc. Biol.* 74, 982~991.

- 7) Aragones, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirkx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N.H., Lambrechts, D., Bishop, T., Lafuste, P., Diez-Juan, A., Harten, S. K., Van Noten, P., De Bock, K., Willam, C., Tjwa, M., Grosfeld, A., Navet, R., Moons, L., Vandendriessche, T., Deroose, C., Wijeyekoon, B., Nuyts, J., Jordan, B., Silasi-Mansat, R., Lupu, F., Dewerchin, M., Pugh, C., Salmon, P., Mortelmans, L., Gallez, B., Gorus, F., Buyse, J., Sluse, F., Harris, R.A., Gnaiger, E., Hespel, P., Van Hecke, P., Schuit, F., Van Veldhoven, P., Ratcliffe, P., Baes, M., Maxwell, P. and Carmeliet, P. (2008) . Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat. Genet.* 40, 170~180.

- 8) Armitage, J.A., Khan, I.Y., Taylor, P.D., Nathanielsz, P.W. and Poston, L. (2004) . Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J. Physiol.* 561, 355~377.

- 9) Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P. and Luheshi, G.N. (2006) . The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 11, 47~55.

- 10) Back, S.A., Luo, N.L., Borenstein, N.S., Levine, J.M., Volpe, J.J. and Kinney, H.C. (2001) . Late oligodendrocyte progenitors coincide

- with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J. Neurosci.* 15, 1302~1312.
- 11) Baharnoori, M., Brake, W.G. and Srivastava, L.K. (2009) . Prenatal immune challenge induces developmental changes in the morphology of pyramidal neurons of the prefrontal cortex and hippocampus in rats. *Schizophr. Res.* 107, 99~109.
 - 12) Barker, D.J., Bull, A.R., Osmond and C. Simmonds, S.J. (1990) . Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *B. M. J.* 301, 259~262.
 - 13) Beevers, C. S., Li, F., Liu, L. and Huang, S. (2006). Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *Int J Cancer.* 119, 757~764.
 - 14) Bell, M.J. and Hallenbeck, J.M. (2002) . Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain. *J Neurosci Res.* 70, 570~579.
 - 15) Bernaudin, M., Nedelec, A.S., Divoux, D., MacKenzie, E.T., Petit, E., Schumann-Bard, P. (2002). Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22, 394~404.
 - 16) Bertoli, C., Copetti, T., Lam, E.W., Demarchi, F. and Schneider, C. (2009) . Calpain small-1 modulates Akt/FoxO3A signaling and apoptosis through PP2A. *Oncogene.* 28, 721~733.

- 17) Blancher, C. and Harris, A.L. (1998). The molecular basis of the hypoxia response pathway: tumour hypoxia as a therapy target. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 187~194.
- 18) Bogdarina, I., Welham, S., King, P.J., Burns, S.P. and Clark, A.J. (2007). Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ. Res.* 100, 520~526.
- 19) Brown, A.S., van Os, J., Driessens, C., Hoek, H.W. and Susser, E.S. (2000). Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder. *Am. J. Psychiatry.* 157, 190~195.
- 20) Brown, A.S., Vinogradov, S, Kremen, W.S., Poole, J. H., Deicken, R.F., Penner, J.D., McKeague, I.W., Kochetkova, A., Kern, D. and Schaefer, C.A. (2009). Prenatal exposure to maternal infection and executive dysfunction in adult schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 166, 683~690.
- 21) Brooks, A.C., Menzies-Gow, N., Bailey, S.R. Cunningham, F.M. and Elliott, J. (2010). Endotoxin-induced HIF1 α stabilisation in equine endothelial cells: synergistic action with hypoxia. *Inflamm. Res.* 59, 689~698.
- 22) Bruce, K.D., Cagampang, F.R., Argenton, M., Zhang, J., Ethirajan, P.L., Burdge, G.C., Bateman, A.C., Clough, G.F., Poston, L., Hanson, M.A., McConnell, J. M. and Byrne, C. D. (2009). Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology.* 50, 1796~1808.

- 23) Brunet, J.F., Grollmund, L., Chatton, J.Y., Lengacher, S., Magistretti, P.J., Villemure, J.G. and Pellerin, L. (2004) . Early acquisition of typical metabolic features upon differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Glia*. 46, 8~17.
- 24) Buser, A.M., Erne, B., Werner, H.B., Nave, K.A. and Schaeren-Wiemers, N. (2009) . The septin cytoskeleton in myelinating glia. *Mol. Cell Neurosci*. 40, 156~166.
- 25) Cai, Z., Pan, Z.L., Pang, Y. Evans, O.B. and Rhodes, P.G. (2000) . Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr. Res*. 47, 64~72.
- 26) Cai, Z., Lin, S., Pang, Y. and Rhodes, P.G. (2004) . Brain injury induced by intracerebral injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in the neonatal Rat. *Pediatr. Res*. 56, 377~384.
- 27) Cui, Q., Liu, B., Jiang, T. and Ma, S. (2005) . Characterizing the dynamic connectivity between genes by variable parameter regression and Kalman filtering based on temporal gene expression data. *Bioinformatics*. 21, 1538~1541.
- 28) Duran, A., Diaz-Meco, M.T. and Moscat, J. (2003) . Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J*. 22, 3910~3918.
- 29) 江井俊英 (2010) . 母子保健の主なる統計. 財団法人母子衛生研究会, pp. 42~102母子保健事業団, 東京

- 30) El-Khattabi, I., Gregoire, F., Remacle, C. and Reusens, B. (2003) . Isocaloric maternal low-protein diet alters IGF-I, IGFBPs, and hepatocyte proliferation in the fetal rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E991~E1000.
- 31) Ergaz, Z., Avgil, M. and Ornoy, A. (2005) . Intrauterine growth restriction-etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models? *Reproductive toxicology.* 20, 301~322.
- 32) Eriksson, J.G., Lindi, V., Uusitupa, M., Forsen, T.J., Laakso, M., Osmond, C. and Barker, D. J. (2002) The effects of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on insulin sensitivity and insulin metabolism interact with size at birth. *Diabetes.* 51, 2321~2324.
- 33) Fan, X., Heijnen, C.J., van der Kooij, M.A., Groenendaal, F. and van Bel, F. (2009) . The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res. Rev.* 62, 99~108.
- 34) Floratos, A., Smith, K., Ji, Z., Watkinson, J. and Califano, A. (2010) . geWorkbench: an open source platform for integrative genomics. *Bioinformatics.* 26, 1779~1780.
- 35) Fortier, M.E., Joobar, R., Luheshi, G.N. and Boksa, P. (2004) . Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances

- amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring.
J. Psychiatr. Res. 38, 335~345.
- 36) Furusho, M., Ono, K., Takebayashi, H., Masahira, N., Kagawa, T., Ikeda, K. and Ikenaka, K. (2006) . Involvement of the Olig2 transcription factor in cholinergic neuron development of the basal forebrain.
Dev. Biol. 293, 348~357.
- 37) Garofano, A., Czernichow, P. and Breant, B. (1997) . In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. Diabetologia. 40, 1231~1234.
- 38) Hakak, Y., Walker, J.R., Li, C., Wong, W. H., Davis, K. L., Buxbaum, J.D., Haroutunian, V. and Fienberg, A.A. (2001) . Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4746~4751.
- 39) Hammond, E.M., Denko, N.C., Dorie, M.J., Abraham, R.T. and Giaccia, A.J. (2002). Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest.
Mol. Cell Biol. 22, 1834~1843.
- 40) Harville, E., Xiong, X. and Buekens, P. (2010). Disasters and perinatal health:a systematic review. Obstet Gynecol Surv. 65, 713~728.
- 41) Hay, N. and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR.
Genes Dev. 18, 1926~1945.

- 42) He, F.J. and MacGregor, G.A. (2003). Cost of poor blood pressure control in the UK: 62, 000 unnecessary deaths per year. *J. Hum. Hypertens.* 17, 455~457.
- 43) Henze, A.T., Riedel, J., Diem, T., Wenner, J., Flamme, I., Pouyseggur, J., Plate, K.H. and Acker, T. (2010). Prolyl hydroxylases 2 and 3 act in gliomas as protective negative feedback regulators of hypoxia-inducible factors. *Cancer Res.* 70, 357~366.
- 44) Hoek, H.W., Brown, A.S. and Susser, E. (1998). The dutch famine and schizophrenia spectrum disorders. *Soc. Psychiatry. Psychiatr. Epidemiol.* 33, 373~379.
- 45) Hofbauer, K.H., Gess, B., Lohaus, C., Meyer, H.E., Katschinski, D. and Kurtz, A. (2003). Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *Eur. J. Biochem.* 270, 4515~4522.
- 46) Holemans, K., Aerts, L. and Van Assche F.A. (2003). Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J. Soc. Gynecol. Investing.* 10, 392~399
- 47) Horak, P, Crawford, A.R., Vadysirisack, D.D., Nash, Z. M., DeYoung, M. P., Sgroi, D. and Ellisen, L.W. (2010). Negative feedback control of HIF1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 4675~4680/
- 48) Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M. and Lee, F.S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the

- prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem.* 277, 39792~39800.
- 49) Hudson, C.C., Liu, M., Chiang, G.G., Otterness, D.M., Loomis, D.C., Kaper, F., Giaccia, A.J. and Abraham, R.T. (2002) . Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell Biol.* 22, 7004~7014.
 - 50) Hulshoff Pol, H.E., Hoek, H. W., Susser, E., Brown, A.S., Dingemans, A., Schnack, H. G., van Haren, N.E., Pereira Ramos, L.M., Gispen-de Wied, C.C., and Kahn, R.S. (2000) . Prenatal exposure to famine and brain morphology in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 157, 1170~1172.
 - 51) Iyer , N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y. and Semenza, G.L. (1998) . Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149~162.
 - 52) Kaelin, W.G., Jr. and Ratcliffe, P.J. (2008) . Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 30, 393~402.
 - 53) Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M. and Richardson, W.D. (2006) . Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* 9, 173~179.
 - 54) Kim, S.Y. and Volsky, D.J. (2005) . PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *B. M. C. Bioinformatics*, 6, 144. *Cell Growth Differ.* 12,

137-145.

- 55) Kotch, L.E., Iyer, N.V., Laughner, E. and Semenza, G.L. (1999) . Defective vascularization of HIF1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol.* 209, 254~267.
- 56) Kunz, M., Ibrahim, S., Koczan, D., Thiesen, H.J., Kohler, H.J., Acker, T., Plate, K.H., Ludwig, S., Rapp, U.R., Brocker, E.B., van Muijen, G.N., Flory, E. and Gross, G. (2001) . Activation of c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma. *Cell Growth Differ.* 12, 137~145.
- 57) Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C. and Semenza, G. L. (2001) . HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell Biol.* 21, 3995~4004.
- 58) Lee, S.H., Wolf, P.L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S.W. and Thistlethwaite, P.A. (2000) . Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N. Engl. J. Med.* 342, 626~633.
- 59) Li, D., Bai, T. and Brorson, J.R. (2011) . Adaptation to moderate hypoxia protects cortical neurons against ischemia-reperfusion injury and excitotoxicity independently of HIF1alpha. *Exp. Neurol.* 230, 302~310.
- 60) Li, H., Ko, H.P. and Whitlock, J.P. (1996). Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J. Biol*

Chem. 271, 21262~21267.

- 61) Luna, G., Lewis, G.P., Banna, C.D., Skalli, O. and Fisher, S.K. (2010) . Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Muller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Mol. Vis.* 16, 2511~2523.
- 62) Luo, F., Liu, X., Yan, N., Li, S., Cao, G., Cheng, Q., Xia, Q. and Wang, H. (2006) . Hypoxia-inducible transcription factor-1alpha promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway. *BMC Cancer.* 6, 26~35.
- 63) Majumder, P.K., Febbo, P.G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L.M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T.J., Golub, T.R., Loda, M., Lane, H.A. and Sellers, W. R. (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF1-dependent pathways. *Nat Med.* 10, 594~601.
- 64) Maloyan, A., Eli-Berchoer, L., Semenza, G.L., Gerstenblith, G., Stern, M.D. & Horowitz, M. (2005) . HIF1 α -targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart. *Physiol. Genomics.* 23, 79~88.
- 65) Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. & Ratcliffe, P.J. (1999) . The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 399, 271~275.

- 66) Metzen, E. (2007) . Enzyme substrate recognition in oxygen sensing: how the HIF trap snaps. *Biochem J.* 408, E5~6.
- 67) Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W. Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W. and Acker, H. (2003) . Intracellular localisation of human HIF1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J. Cell Sci.* 116, 1319~1326.
- 68) Miller, J.T., Bartley, J.H., Wimborne, H.J., Walker, A.L., Hess, D.C., Hill, W.D. and Carroll, J. E. (2005) . The neuroblast and angioblast chemotactic factor SDF-1 (CXCL12) expression is briefly up regulated by reactive astrocytes in brain following neonatal hypoxic-ischemic injury. *BMC Neurosci.* 6, 63~73.
- 69) Munoz, G. and Bongiorno-Malave, I. (1979) . Influence of dietary protein restriction on ovulation, fertilization rates and pre-implantation embryonic development in mice. *J Exp Zool.* 210, 253~257.
- 70) Mussig, C., Fischer, S. & Altmann, T. (2002) .
Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol.*, 129, 1241~1251.
- 71) Nakagawa, T., Yabe, T. and Schwartz, J.P. (2005) . Gene expression profiles of reactive astrocytes cultured from dopamine-depleted striatum. *Neurobiol. Dis.* 20, 275~282.
- 72) Nakajima, A., Nishimura, K., Nakaima, Y., Oh, T., Noguchi, S., Taniguchi, T. and Tamura, T. (2009) . Cell type-dependent proapoptotic role of Bcl2L12 revealed by a mutation concomitant with the

- disruption of the juxtaposed Irf3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 12448~12452.
- 73) Neugebauer, R., Hoek, H.W. and Susser, E. (1999) . Prenatal exposure to wartime famine and development of antisocial personality disorder in early adulthood. *JAMA.* 281, 455~462.
 - 74) Ogata, E.S., Bussey, M.E. and Finley, S. (1986) . Altered gas exchange, limited glucose and branched chain amino acids, and hypoinsulinism retard fetal growth in the rat. *Metabolism.* 35, 970~977.
 - 75) Oliver, M.H., Hawkins, P., Harding, J.E. (2005) . Periconceptual undernutrition alters growth trajectory and metabolic and endocrine responses to fasting in late-gestation fetal sheep. *Pediatr. Res.* 57, 591~598.
 - 76) Olusanya, B.O., Wirz, S.L. & Renner, J.K. (2010) . Prevalence, pattern and risk factors for undernutrition in early infancy using the WHO Multicentre Growth Reference: a community-based study. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 24, 572~583.
 - 77) Osmond, C. and Barker, D.J. (2000) . Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ. Health. Perspect.* 108, 545~553.
 - 78) Ostrowski, R.P., Colohan, A.R. and Zhang, J.H. (2005) . Mechanisms of hyperbaric oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 25, 554~571.
 - 79) Paintlia, M.K., Paintlia, A.S., Barbosa, E., Singh, I. and Singh, A.K. (2004) . N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte

- progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *J Neurosci Res.* 78, 347~361.
- 80) Pang, Y., Cai, Z. and Rhodes P.G. (2005) . Effect of tumor necrosis factor- α on developing optic nerve oligodendrocytes in culture. *J. Neurosci. Res.* 80, 226~234.
 - 81) Park, H. (1999) . Aromatic hydrocarbon nuclear translocator as a common component for the hypoxia- and dioxin-induced gene expression. *Mol. Cells.* 9, 172~178.
 - 82) Paintlia, M.K., Paintlia, A.S., Barbosa, E., Singh, I. and Singh, A.K. (2004) . N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *J. Neurosci. Res.* 78, 347~361.
 - 83) Paxinos, G. and Franklin, K.B.J. (2001) . *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed., pp.75. Academic Press, San Diego, CA.
 - 84) Rees W.D, Hay S.M, Brown D.S, Antipatis, C. and Palmer, R.M. (2000) . Maternal protein deficiency causes hyperthylation of DNA in the livers of rat fetuses. *J. Nutr.* 130, 1821~1826.
 - 85) Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. Jr. (1993) . AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 123, 1939~1951.

- 86) Roos, S., Powell, T.L. and Jansson, T. (2009) . Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 295~308.
- 87) Rueda-Clausen, C.F., Morton, J.S. and Davidge, S.T. (2009) . Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood. *Cardiovasc Res.* 81, 713~722.
- 88) Ryan, H.E., Lo, J. and Johnson, R.S. (1998) . HIF1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 17, 3005~3015.
- 89) Saliba, E. and Marret, S. (2001) . Cerebral white matter damage in the preterm infant: pathophysiology and risk factors. *Semin. Neonatol.* 6, 121~133.
- 90) Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S. and Sabatini, D.M. (2010) . Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* 141, 290~303.
- 91) Seenath, M.M., Roberts, D., Cawthorne, C., Saunders, M.P., Armstrong, G.R., O'Dwyer, S.T., Stratford, I.J., Dive, C. and Renehan, A.G. (2008) . Reciprocal relationship between expression of hypoxia inducible factor 1alpha (HIF1alpha) and the pro-apoptotic protein bid in ex vivo colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* 99, 459~463.
- 92) Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., Hoet, J.J., (1990) . Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate.* 57, 107~118.

- 93) Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C.M. and Ellisen, L.W. (2005) . Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol. Cell Biol.* 25, 5834~5845.
- 94) Susser, E.S. and Lin, S.P. (1992). Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. *Arch Gen Psychiatry.* 49, 983~988.
- 95) Suzuki, R., Watanabe, J., Arata, S., Funahashi, H., Kikuyama, S. and Shioda, S. (2003) . A transgenic mouse model for the detailed morphological study of astrocytes. *Neurosci. Res.* 47, 451~454.
- 96) Suzuki, S., Dobashi, Y., Hatakeyama, Y., Tajiri, R., Fujimura, T., Heldin, C.H. and Ooi, A. (2010) . Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor (PDGF) -B and vascular endothelial growth factor-A expression, PDGF receptor-beta phosphorylation, and microvessel density in gastric cancer. *BMC Cancer.* 10, 659~668.
- 97) Takeda, K., Cowan, A. and Fong, G. H. (2007) . Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. *Circulation.* 116, 774~781.
- 98) Tkachev, D., Mimmack, M.L., Ryan, M.M., Wayland, M., Freeman, T., Jones, P.B., Starkey, M., Webster, M.J., Yolken, R.H. and Bahn, S. (2003). Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet.* 362, 798~805.
- 99) Torii, S., Kobayashi, K., Takahashi, M., Katahira, K., Goryo, K., Matsushita, N., Yasumoto, K., Fujii-Kuriyama, Y. and Sogawa,

- K. (2009) . Magnesium deficiency causes loss of response to intermittent hypoxia in paraganglion cells. *J. Biol. Chem.* 284, 19077~19089.
- 100) Uta , B.S. (2008) . *Prenatal Mouse Brain Atlas*, pp.462~463. Springer, New York, NY.
- 101) Vissers, M.C. and Wilkie, R.P. (2007) . Ascorbate deficiency results in impaired neutrophil apoptosis and clearance and is associated with up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1236~1244.
- 102) Volpe, J.J. (1997) . Brain injury in the premature infant--from pathogenesis to prevention. *Brain Dev.* 19, 519~534.
- 103) Volpe, J.J. (2001) . Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr. Res.* 50, 553~562.
- 104) Wigglesworth, J.S. (1964) . Experimental Growth Retardation in the Foetal Rat. *J Pathol Bacteriol.* 88, 1~13.
- 105) Wlodarski, P., Grajkowska, W., Lojek, M., Rainko, K. and Jozwiak, J. (2006). Activation of Akt and Erk pathways in medulloblastoma. *Folia Neuropathol.* 44, 214~220.
- 106) Woodall, S.M., Johnston, B.M., Breier, B.H. and Gluckman, P.D. (1996) . Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr. Res.* 40, 438~443.

- 107) Wright, J., Zhang, G., Yu, T.S. and Kernie, S.G. (2010). Age-related changes in the oligodendrocyte progenitor pool influence brain remodeling after injury. *Dev. Neurosci.* DOI: 10.1159/000322081.
- 108) Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 124, 471~484.
- 109) Yamauchi, Y., Furukawa, K. and Hamamura, K. (2011). Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling: induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen. *Cancer research*. 71, 4989~4997.
- 110) Ye, P. and D'Ercole, A.J. (1999). Insulin-like growth factor I protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor- α -induced injury. *Endocrinology*. 140, 3063~3072.
- 111) Ye, P., Li, L., Richards, R.G., DiAugustine, R.P. and D'Ercole, A.J. (2002). Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J. Neurosci.* 22, 6041~51.
- 112) Yuan, T.M., Yu, H.M., Gu, W.Z. and Li, J.P. (2005). White matter damage and chemokine induction in developing rat brain after intrauterine infection. *J. Perinat. Med.* 33, 415~422.
- 113) Zambrano, E, Martines-Samayoa P.M, Bautista, C.J, Deas, M, Guillen, L, Rodriguez-Gonzalez, G.L, Guzman, C, Larrea, F, and Nathanielsz, P.W. (2005). Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats

fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J. Physiol.* 566, 225~236.

- 114) Zhang, X., Lv, C.C., Tian, J., Miao, R.J., Xi, W., Hertz-Picciotto, I. and Qi, L. (2010). Prenatal and perinatal risk factors for autism in China. *J Autism Dev Disord.* 40, 1311~1321.

9.図表

表 1 餌の成分表

	AIN-93G (N 餌)	AIN-93G 改 (L 餌)	構成比 (L / N)
水分 (%)	9	10.41	1.16
粗タンパク質 (%)	17.9	8.67	0.48
粗脂肪 (%)	7	7.15	1.02
粗灰分 (%)	2.5	3.05	1.22
粗繊維 (%)	3	5	1.67
熱量 (kcal/100g)	60.6	65.2	1.08

表 2 免疫染色の手順

処置	試薬	時間	温度
固定	4%PFA	15-30 分	室温
洗浄	PBS (-)	5 分・3 回	室温
一次抗体反応	抗体希釈液*1	10 時間	4℃
洗浄	PBS (-)	5 分・3 回	室温
二次抗体反応	抗体希釈液*1	40 分	室温
洗浄	PBS (-)	5 分・3 回	室温
洗浄	純水	5 分・1 回	室温
封入	VECTASHIELD	-	-

表 3 胎子および新生子脳に対する使用抗体一覧

一次抗体			二次抗体		
抗体名 1	抗体名 2	希釈液	抗体名 1	抗体名 2	希釈液
希釈倍率	希釈倍率		希釈倍率	希釈倍率	
Rabbit anti-Olig.2	(TUNEL)	0.3% Triton X-100, 1% ウシ血清添加 PBS (-)	anti-rabbit Cy-3		0.5μg/ml DAPI 添加 PBS (-)
1/500			1/500		
Mouse anti-GFAP	Rabbit anti-nestin	0.1% Triton X-100, 1% ウシ血清添加 PBS (-)	anti-mouse Cy-3	anti-rabbit 488	0.5μg/ml DAPI 添加 PBS (-)
1/800	1/800		1/500	1/500	
Rabbit anti-MBP		0.1% Triton X-100, 1% ウシ血清添加 PBS (-)	anti-rabbit Cy-3		0.5μg/ml DAPI 添加 PBS (-)
1/800			1/500		

表 4 胎子心臓に対する使用プライマイー一覧

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer
HIF1 α	GCAGCAGGAATTGGAACATT	GCATGCTAAATCGGAGGGTA
PHD1	GACCAGATTGCCTGGGTTAGA	GATTGTCAACATGCCTCACG
GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	CACATTGGGGGTAGGAACAC

表 5 リアルタイム PCR 反応液の配合

溶液	容量 (μ l)
SYBR Premix	10.0
Primer (F+R)	1.6
Template (cDNA)	0.75
RNase freeH ₂ O	7.75
計	20.0

表 6 胎子心臓に対する使用抗体一覧

一次抗体		二次抗体	
抗体名 1	希釈液	抗体名 1	希釈液
希釈倍率		希釈倍率	
Rabbit ant-HIF1α antibody	0.3% Triton X-100, 1% ウシ血清添加 PBS (-)	anti- rabbit Cy-3	0.5μg/ml DAPI 添加 PBS (-)
1/200		1/500	

表 7 母体低栄養により発現が増加した HIF1 α 下流遺伝子

略称	遺伝子名	変化率
Senp2	senp2 specific peptidase 2	1.61
Plod1	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	1.55
Pgf	placental growth factor	1.27
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	1.25
Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	1.20
Mmp2	matrix metalloproteinase 2	1.20
Bid	BH3 interacting domain death agonist	1.18
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	1.15
Krt18	keratin 18	1.13
Krt19	keratin 19	1.12
Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1	1.10
Hk1	hexokinase 1	1.08
Slc2a1	solute carrier family 2	1.05
P4ha1	proline 4-hydroxylase, alpha 1 polypeptide	1.04
Car9	carbonic anhydrase 9	1.03
Gbe1	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	1.03
Bax	BCL2-associated X protein	1.03
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	1.02
Krt14	keratin 14	1.02
Sumo1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1	1.02
Egln1	EGL nine homolog 1	1.01

表 8 母体低栄養により発現が減少した HIF1 α 下流遺伝子

略称	遺伝子名	変化率
Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	0.98
Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha	0.98
Fn1	fibronectin 1	0.98
Cygb	cytoglobin	0.98
Eno1	enolase 1, alpha non-neuron	0.97
Ctsd	cathepsin D	0.96
Vegfa	vascular endothelial growth factor A	0.93
Plod2	procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	0.92
P4hb	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	0.92
Ep300	E1A binding protein p300	0.90
Angpt1	angiopoietin 1	0.88
Pdgfb	platelet derived growth factor, B polypeptide	0.85
Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	0.84
Plaur	plasminogen activator, urokinase receptor	0.83
Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	0.82
Trp53	transformation related protein 53	0.76
Map2k4	mitogen-activated protein kinase kinase 4	0.74
Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	0.73
Bhlhe40	basic helix-loop-helix family, member e40	0.71

表 9 胎子脳に対する使用抗体一覧

一次抗体			二次抗体		
抗体名 1	抗体名 2	希釈液	抗体名 1	抗体名 2	希釈液
希釈倍率	希釈倍率		希釈倍率	希釈倍率	
Rabbit ant-HIF1 α antibody	Sheep anti-Olig2 antibody	0.3% Triton X-100, 1% ウシ血 清添加 PBS (-)	anti- rabbit Cy-3	anti- sheep IgG-H&L 488	0.5 μ g/ml DAPI 添加 PBS (-)
1/100	1/500		1/500	1/500	

表 10 胎子脳に対する使用プライマイー一覧

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer
HIF1 α	GCAGCAGGAATTGGAACATT	GCATGCTAAATCGGAGGGTA
mTOR	CATCAGTGTCCCCACCTTCT	TGAGGCTTCTGCATTTCTT
HPRT1	GCCCCAAAATGGTTAAGGTT	TTGCGCTCATCTTAGGCTTT

表 11 母体低タンパク質食負荷により発現が増加した HIF1 α 下流遺伝子のまとめ

略称	遺伝子名	機能	引用文献
Vegfa	vascular endothelial growth factor A	angiogenesis	(97)
Pdgfb	platelet-derived growth factor	cell growth	(96)
Plod1	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	cell development	(45)
Senp2	SUMO/sentrin specific peptidase 2	glucose metabolism	(1)
Eno1	enolase 1, alpha non-neuron	glucose metabolism	(5)
Hk1	hexokinase 1	glucose metabolism	(62)
Bid	BH3 interacting domain death agonist	cell death	(91)
Map2k4	mitogen-activated protein kinase kinase 4	cell death	(56)
Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	mTOR inhibitor	(93)
Egln1	EGL nine homolog 1	HIF1 α degradation	(48)

表 12 母体低栄養により発現が増加した mTOR 下流遺伝子のまとめ

略称	遺伝子名	mTORとの関係	引用文献
Raga	Ras-related GTP binding A	activator	(90)
Ragb	Ras-related GTP binding B		
PI3k	phosphatidylinositol 3-kinase	positive feedback loop	(109)
Akt1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase		
ppp2r2c	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B	down regulated	(105)

図1 母体低タンパク質食負荷による胎子数への影響および胎子数による胎子体重への影響評価

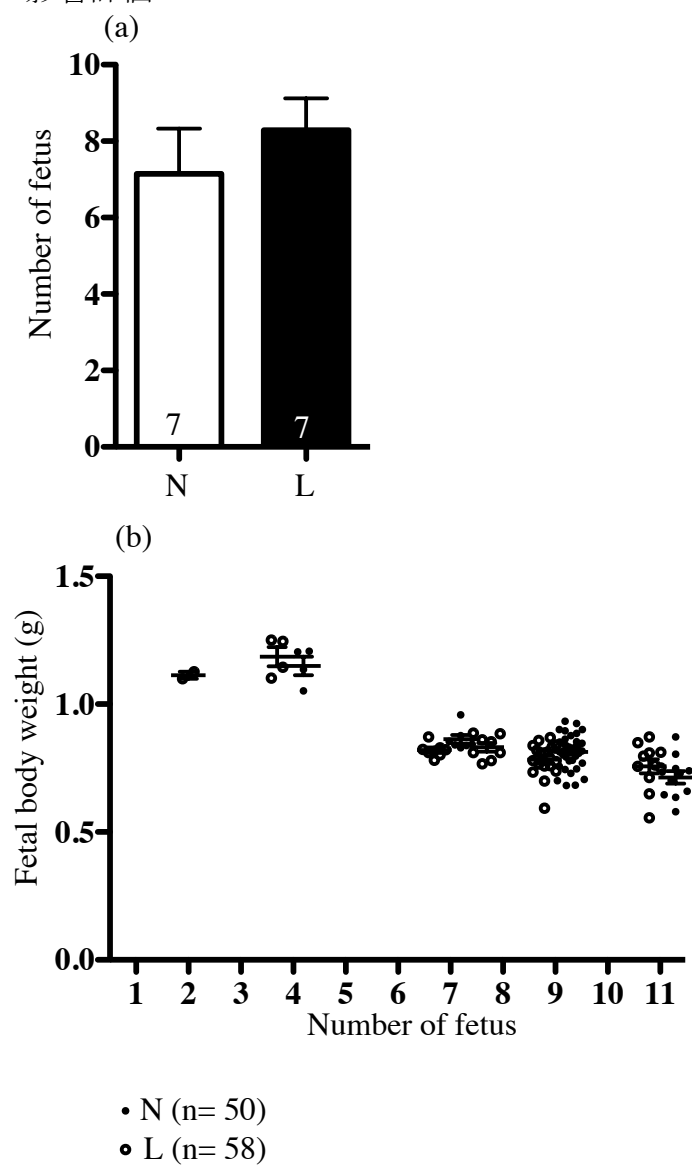


図 2 実験処置の概要

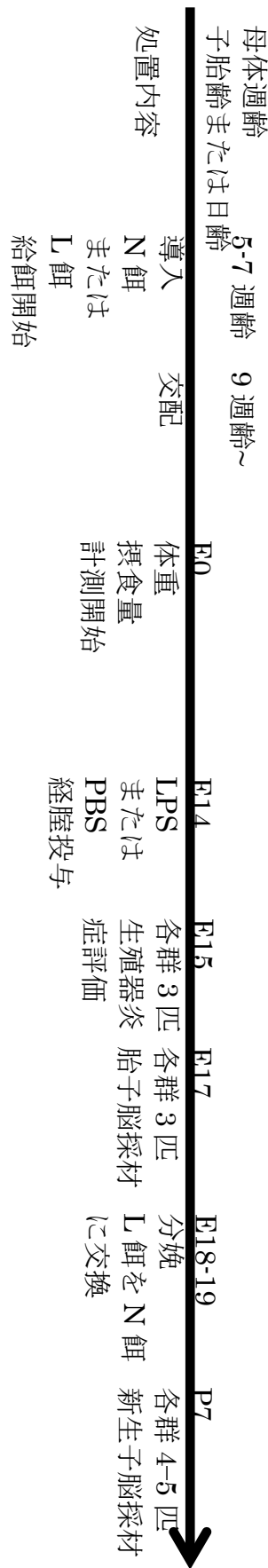


図 3 E15 における母体腔の炎症評価

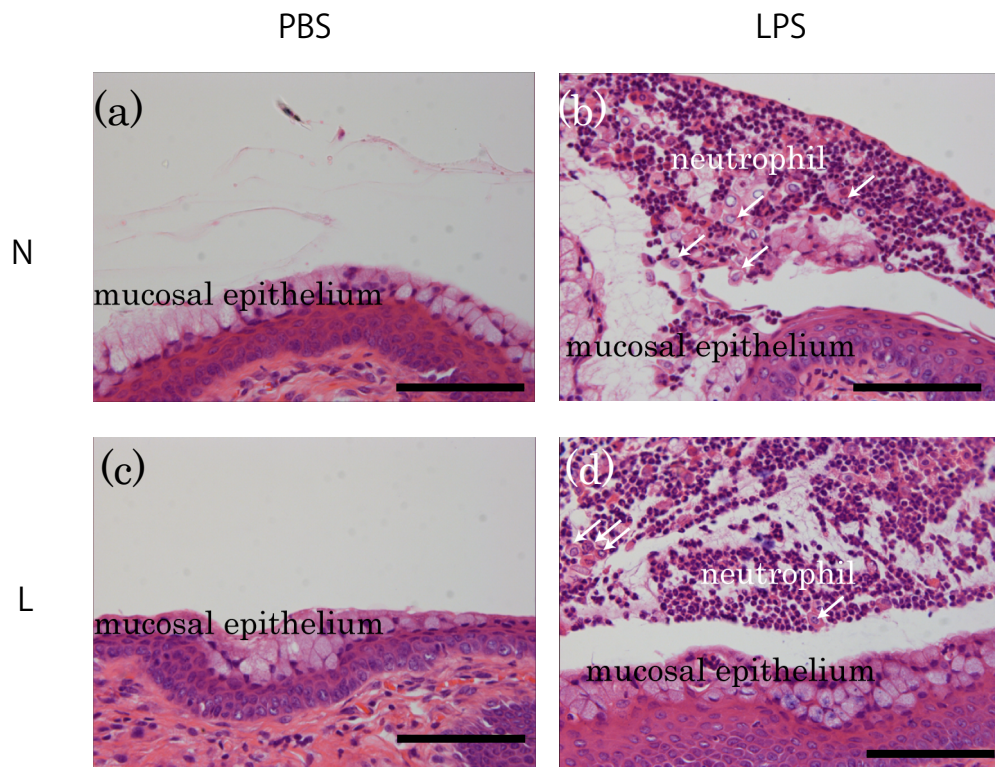


図4 妊娠状態の評価および胎子と新生子の成長

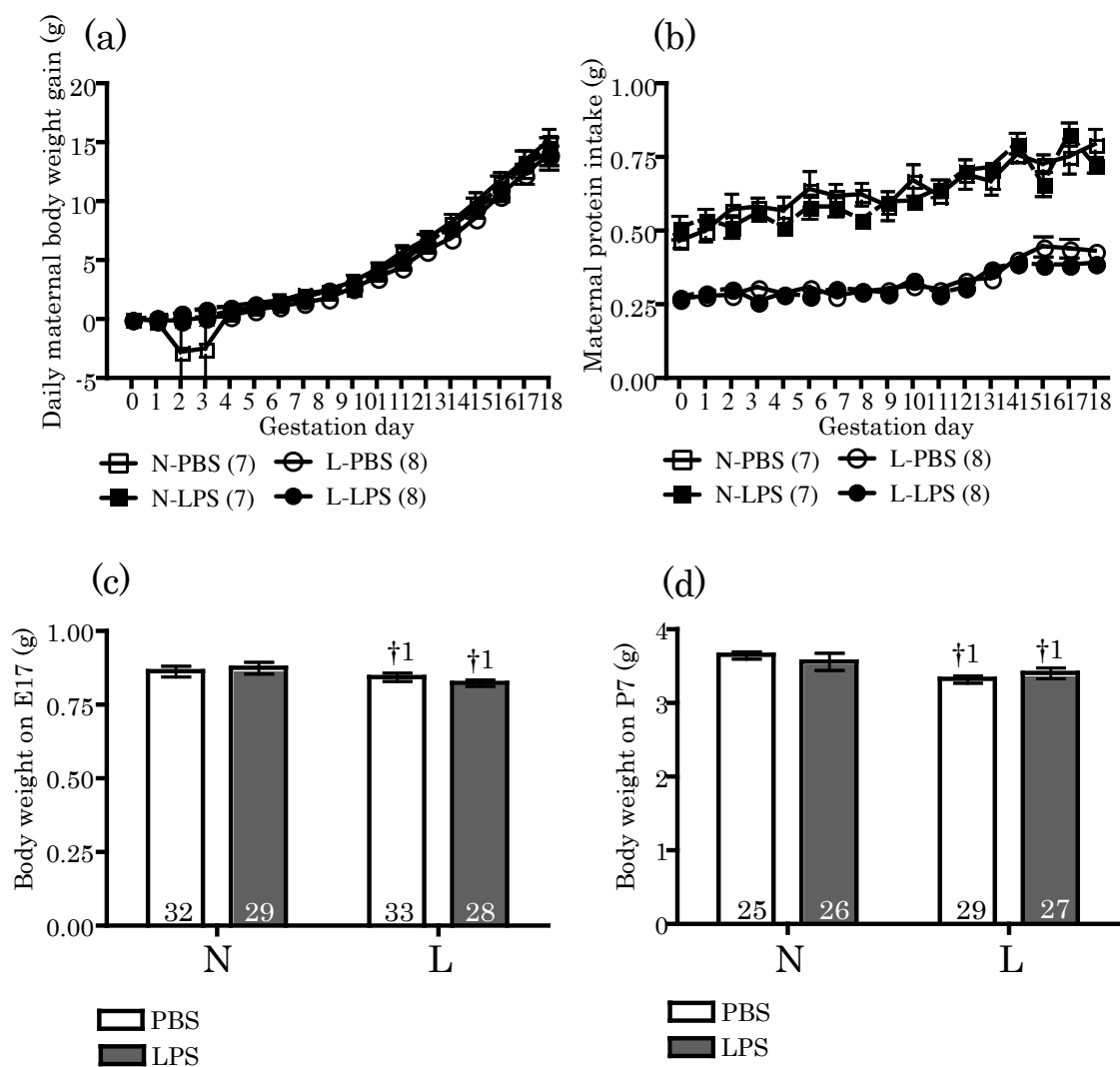


図 5 オリゴデンドロサイト前駆細胞(赤)とアポトーシス(緑)の検出

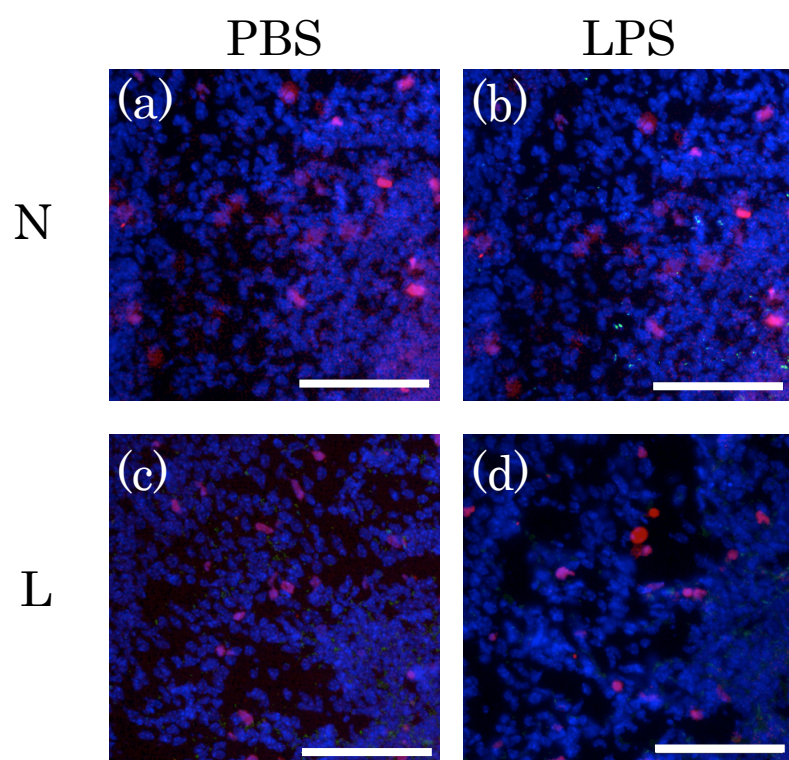


図6 オリゴデンドロサイト分化の評価

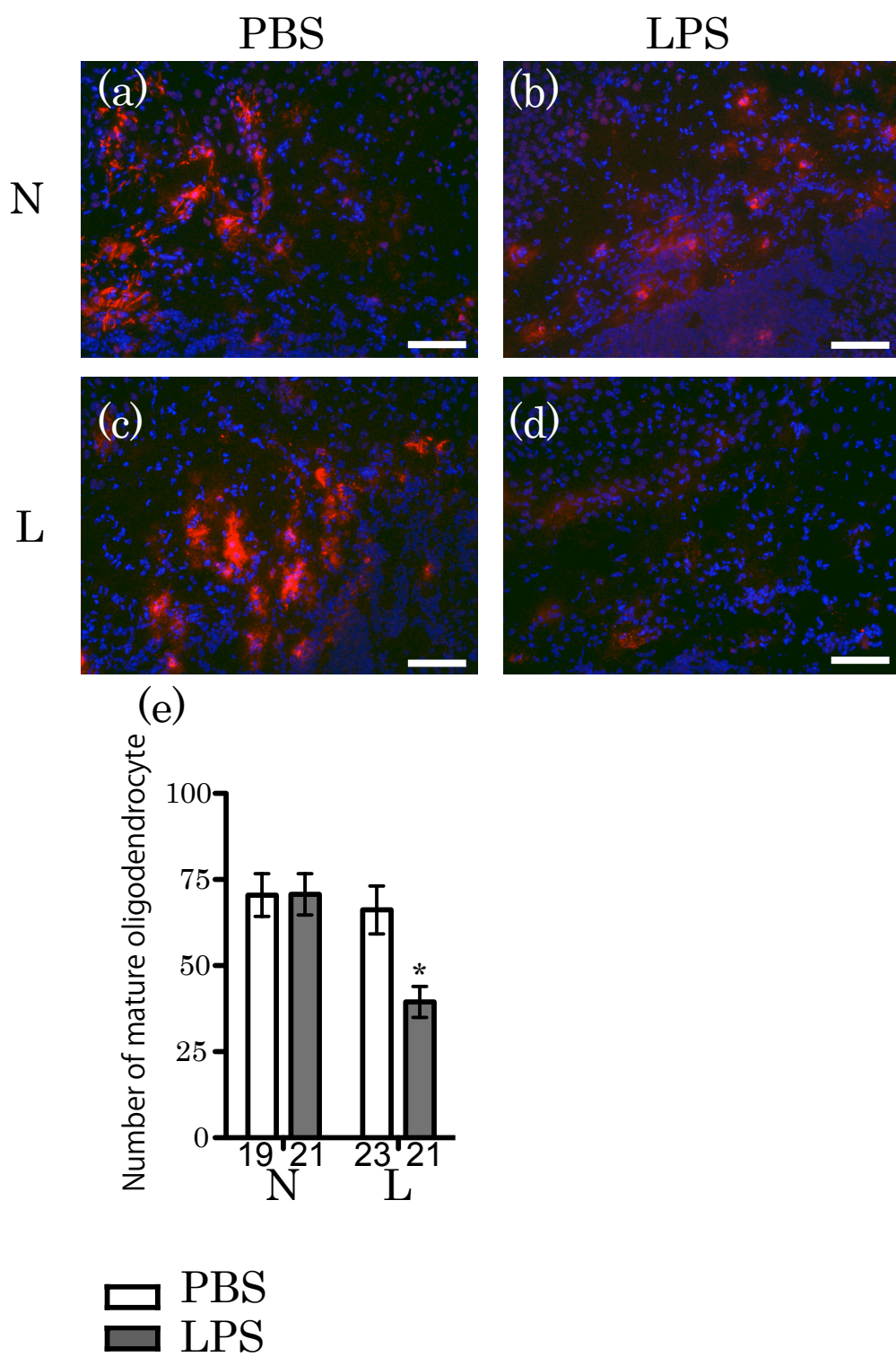


図 7 新生子脳の炎症評価

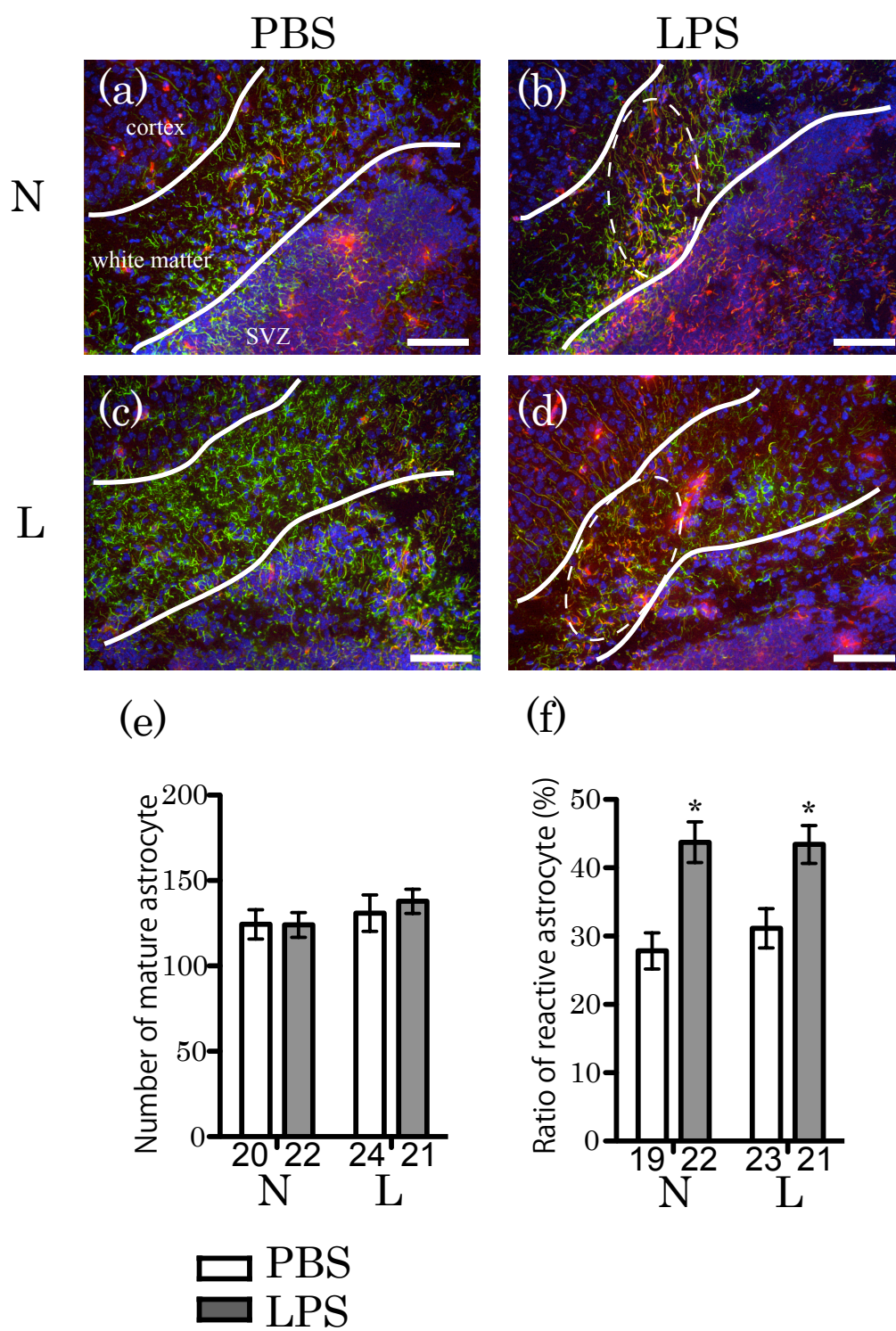


図 8 実験処置の概要

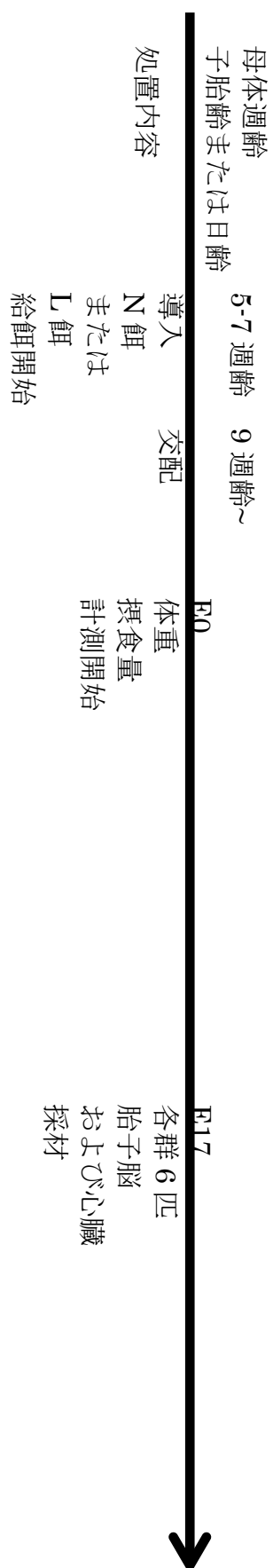


図 9 妊娠状態の評価

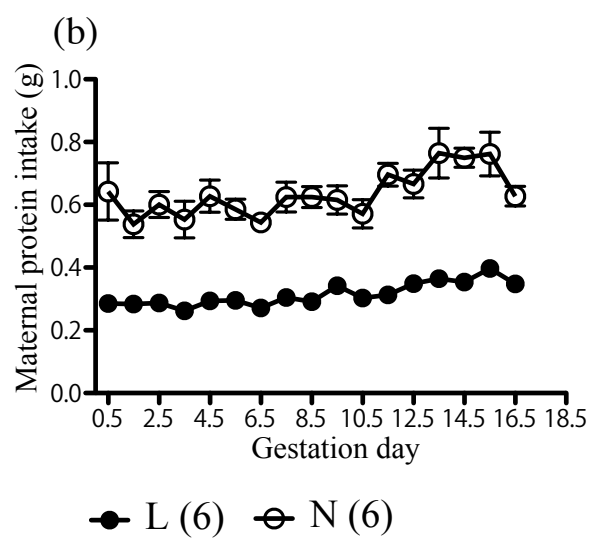
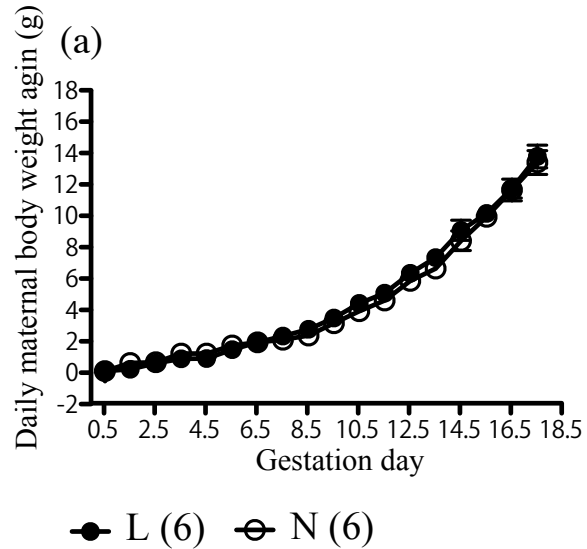


図 10 胎子体重と心臓重量

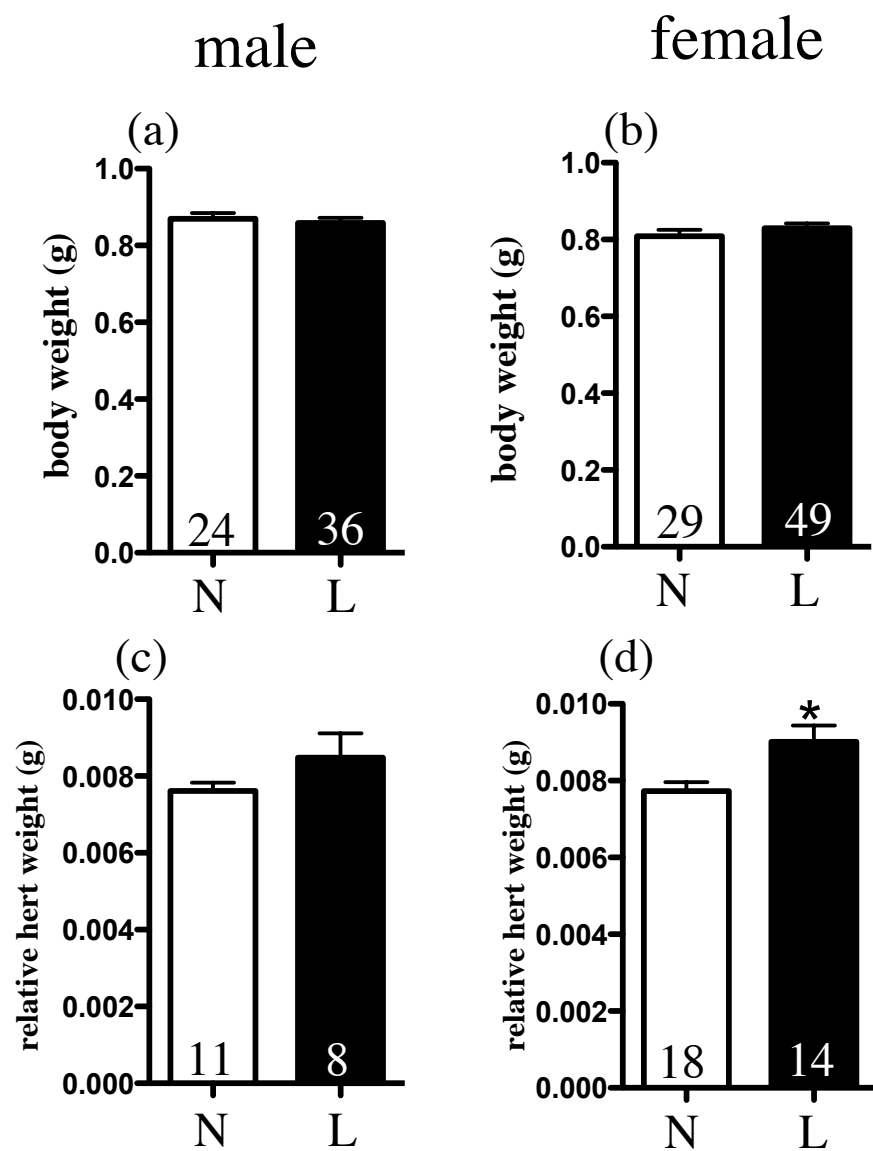


図 11 母体低タンパク質食負荷による胎子心臓の mRNA 発現量の変化

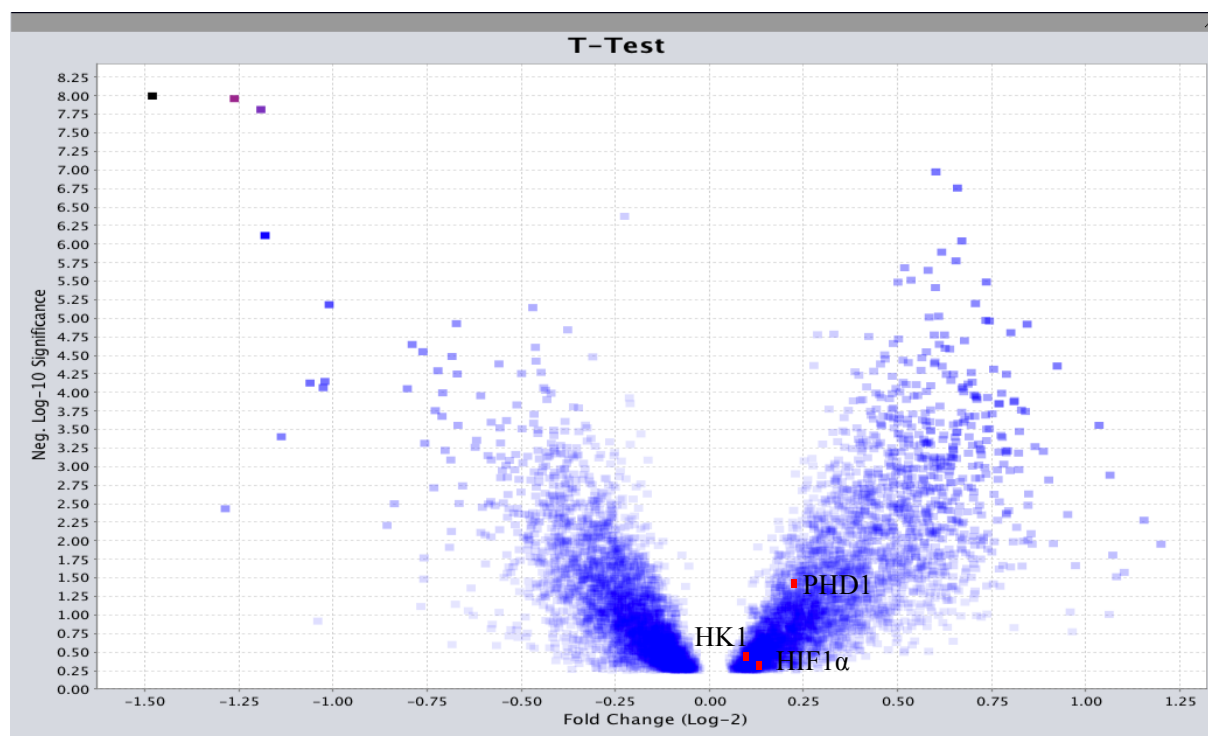


図 12 HIF1 α と PHD 1 の mRNA 発現量におよぼす母体低タンパク質食負荷の影響

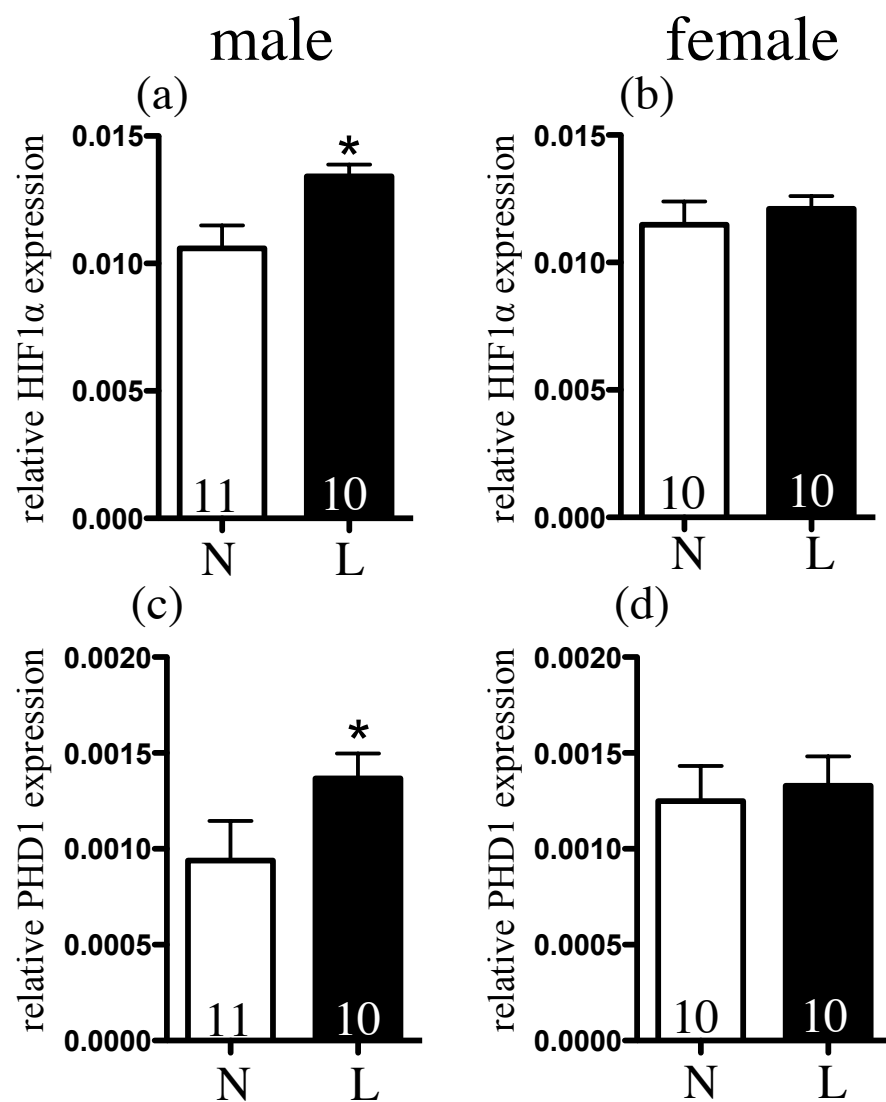


図 13 HIF1 α と PHD 1 の mRNA 発現量の相関

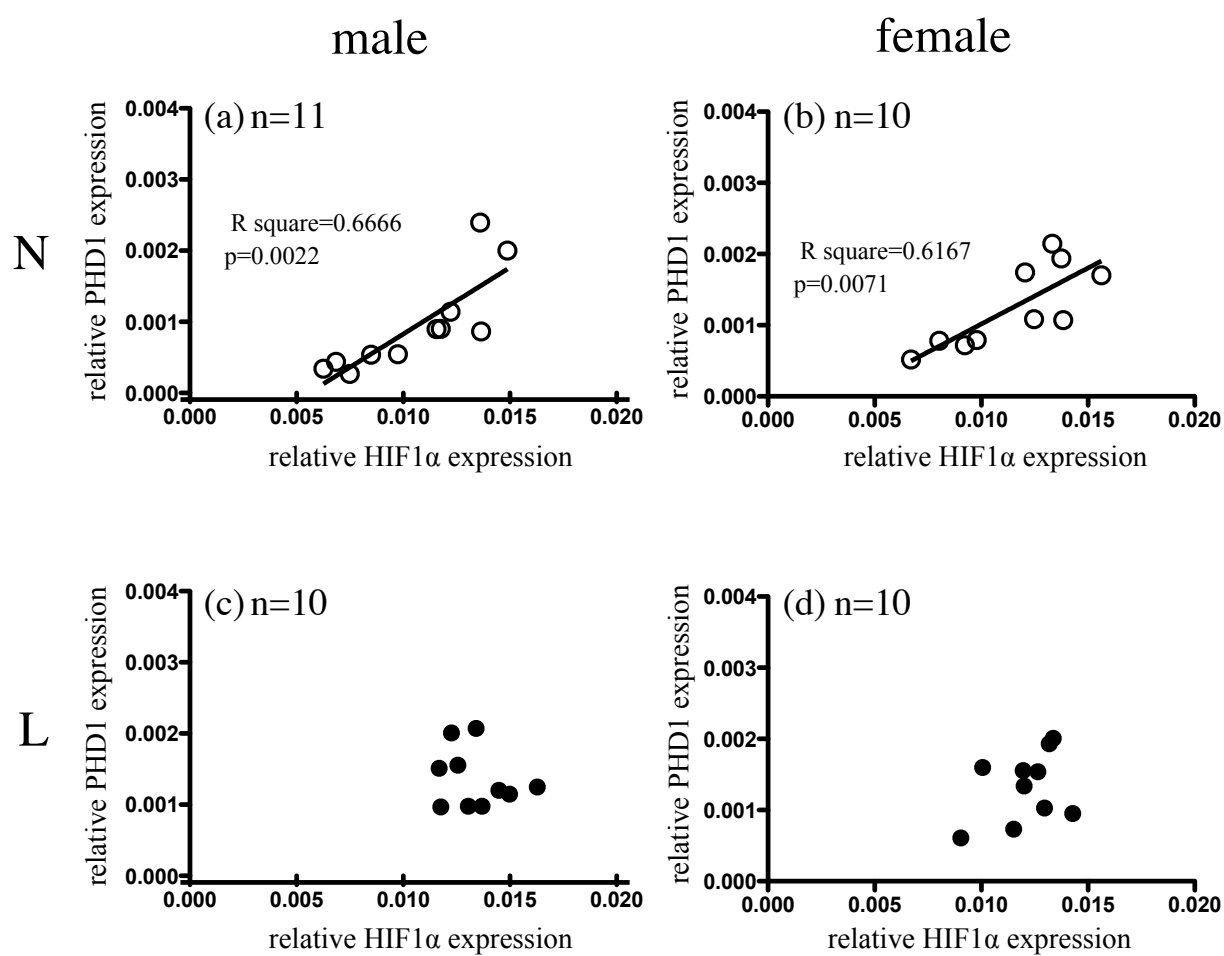


図 14 胎子心臓の病理像

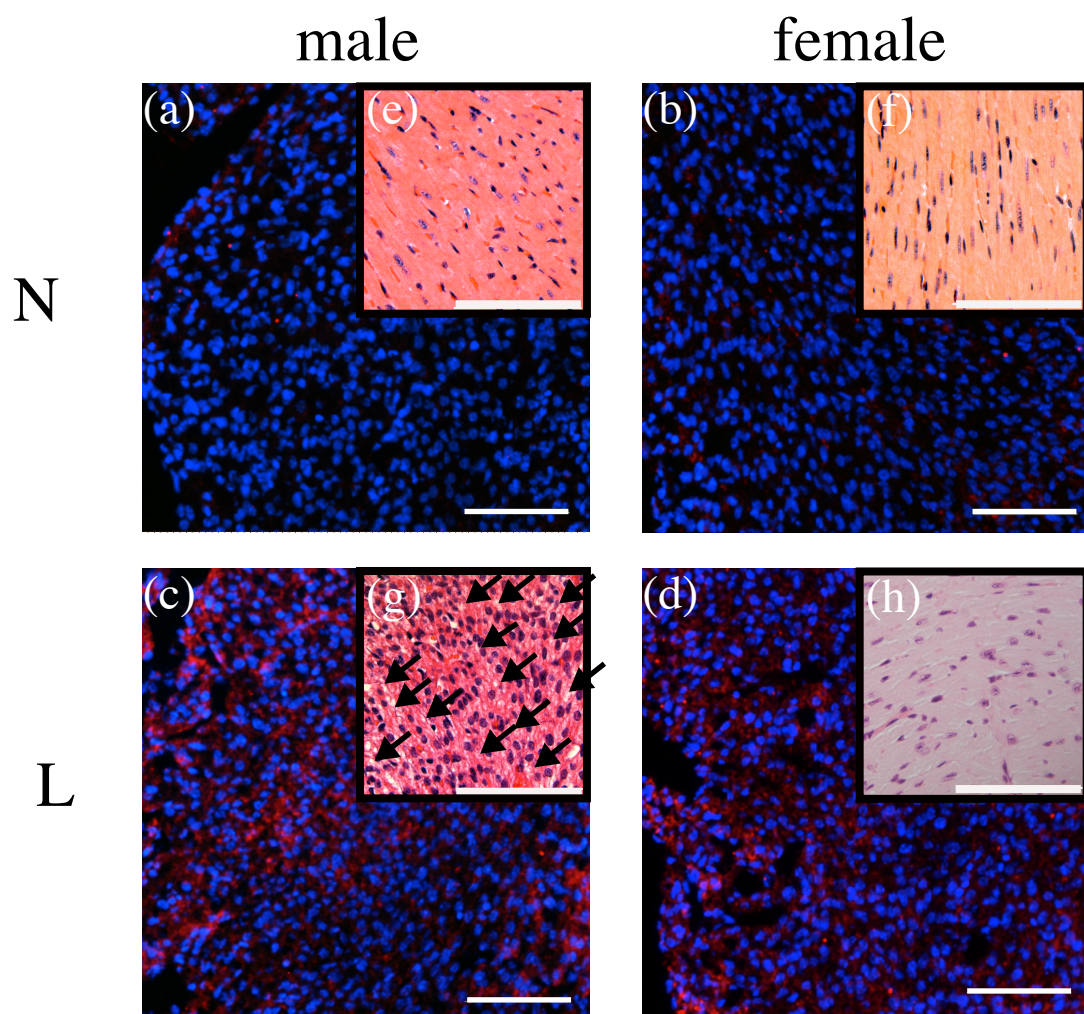


図 15 胎子脳の評価

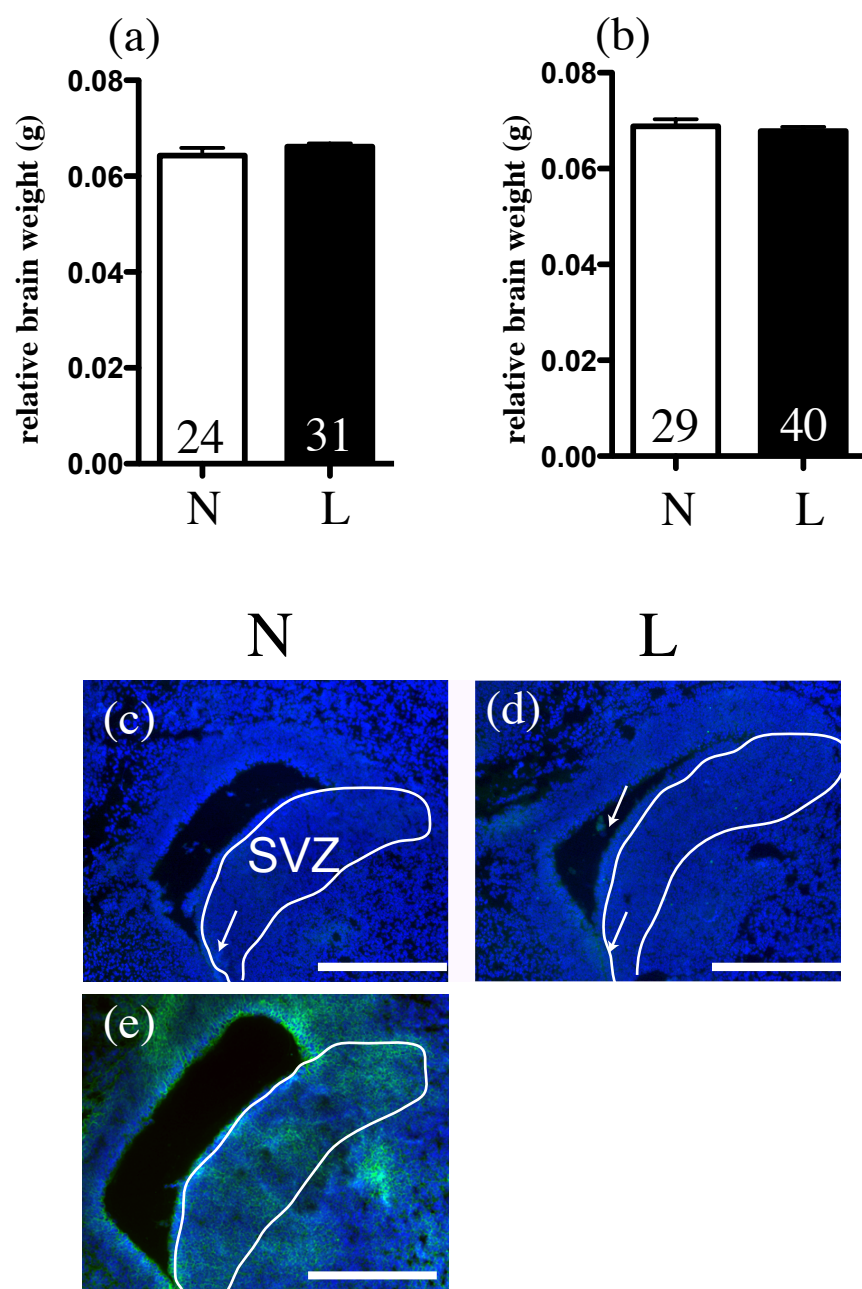


図 16 胎子脳遺伝子発現量に対する母体低タンパク質食負荷の影響

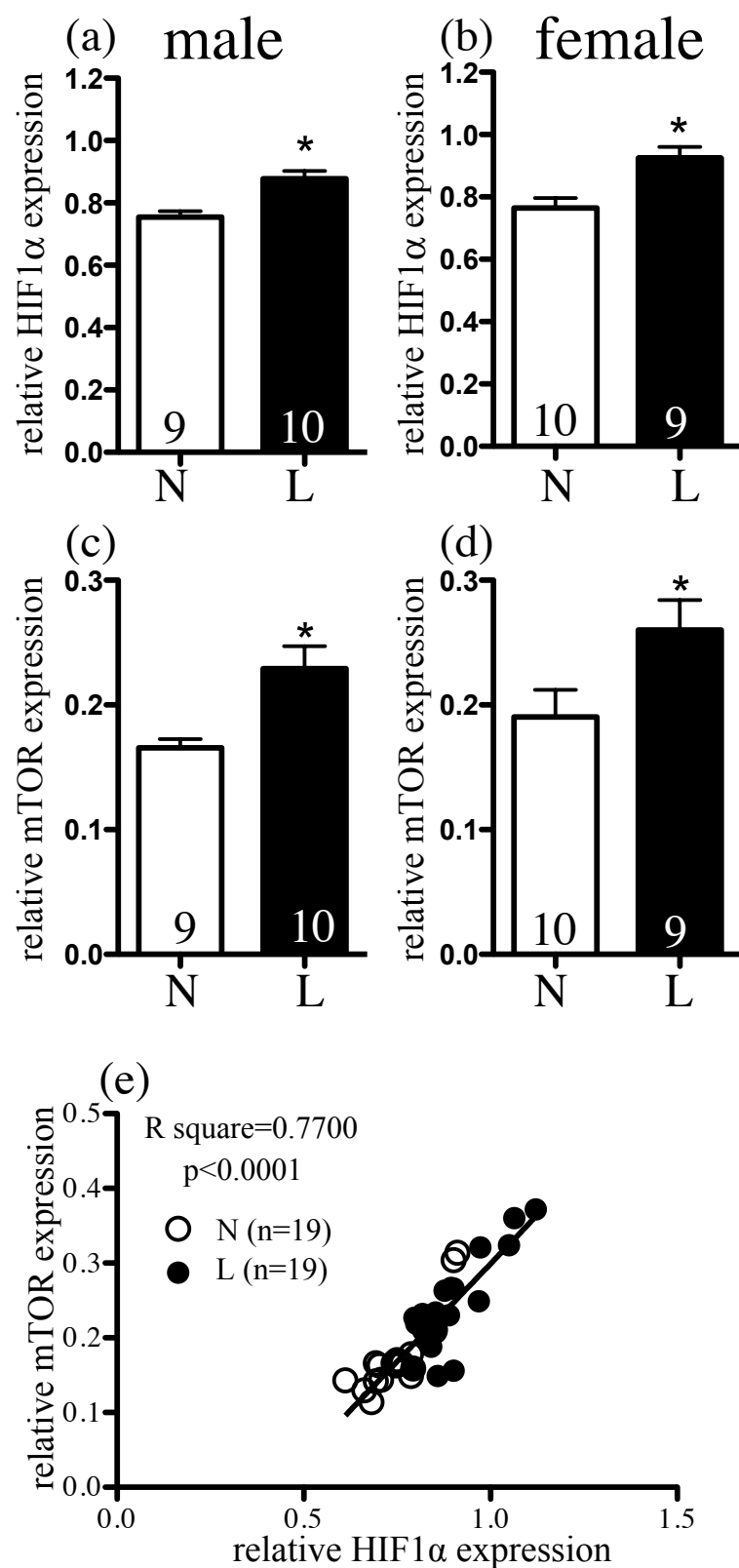


図 17 母体低タンパク質食負荷による胎子脳への HIF1 α タンパク質蓄積

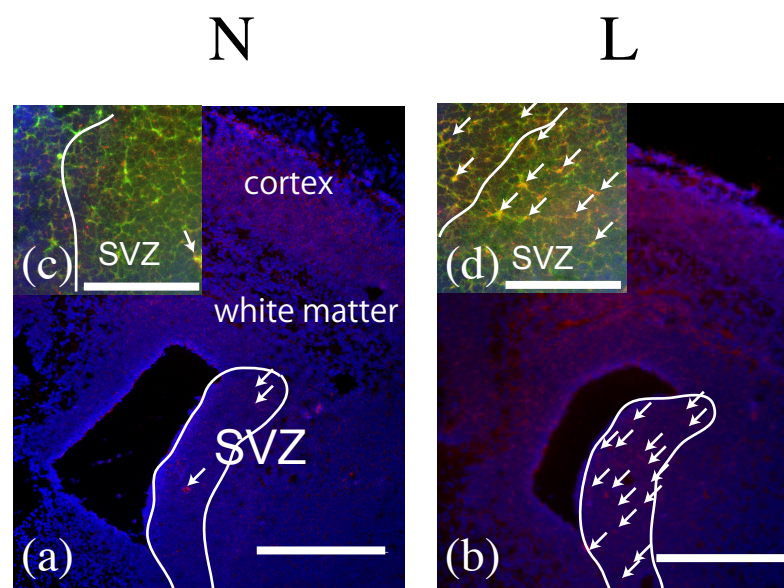
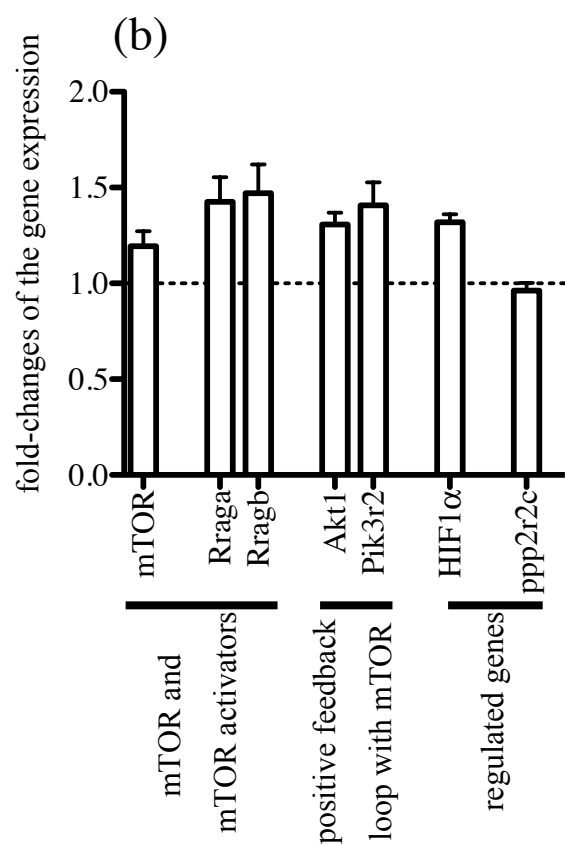
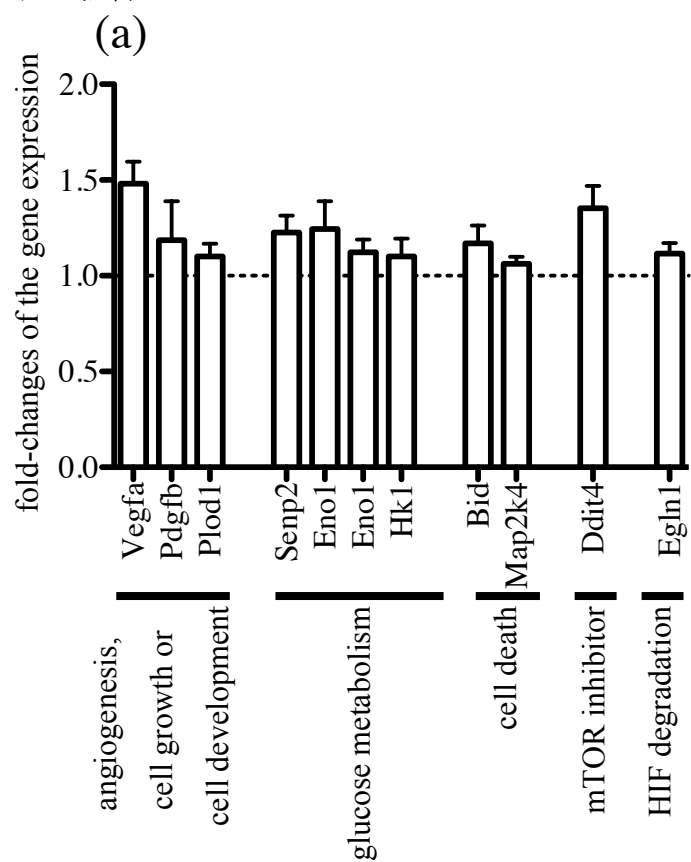


図18 母体低タンパク質食負荷による HIF1 α およびmTOR 下流遺伝子の発現量に対する影響



10.図表の説明文

表 1 餌の成分表

L 餌と N 餌の成分構成を重量%で,構成比を右側に示した。最下列には 100g 当たりの熱量を記した。L 餌と N 餌はほぼ同量の熱量を含有し、L 餌のタンパク質量は N 餌のほぼ 50%となっている。

表 2 免疫染色の手順

本実験で用いた免疫染色の手順を示す。固定時間は標本の厚さによって時間を調整した。*1: 抗体希釈液は表 3, 6 および 7 の使用抗体一覧を参照。

表 3 胎子および新生子脳に対する使用抗体一覧

実験 1 で用いた抗体の種類,希釈倍率と希釈溶液を示した。Olig.2 抗体は TUNEL との二重染色を行った。GFAP と nestin も二重染色を行い,反応性アストロサイトの検出に用いた。

表 4 胎子心臓に対する使用プライマイー一覧

HIF1 α と PHD1 の発現量を GAPDH をハウスキーピング遺伝子として相対的発現量を評価した。

表 5 リアルタイム PCR 反応液の配合

全てのリアルタイム PCR はこの反応液の配合に従い実施した。

表 6 胎子心臓に対する使用抗体一覧

実験 2 で用いた抗体の種類,希釈倍率と希釈溶液を示した。

表 7 胎子脳に対する使用抗体一覧

実験 3 で用いた抗体の種類,希釈倍率と希釈溶液を示した。HIF1 α 抗体と Olig.2 抗体の二重染色を行い,SVZ における HIF1 α タンパク質の局在の検出に用いた。

表 8 胎子脳に対する使用プライマイー一覧

HIF1 α と mTOR の発現量を HPRT1 をハウスキーピング遺伝子として相対的発現量を評価した。

表 9 母体低タンパク質食負荷により発現が増加した HIF1 α 下流遺伝子

HK1 を含む 21 遺伝子の mRNA 発現量が増加した。

表 10 母体低タンパク質食負荷により発現が減少した HIF1 α 下流遺伝子

19 遺伝子の mRNA 発現量が減少した。

表 11 母体低タンパク質食負荷により発現が増加した HIF1 α 下流遺伝子のまとめ

10 遺伝子の mRNA 発現量が増加した。低酸素状態における発現量増加に関する引用文献を右側に示した。

表 12 母体低栄養により発現が増加した mTOR 下流遺伝子のまとめ

4 遺伝子の mRNA 発現量が増加し, 1 遺伝子の mRNA 発現量が減少した。mTOR との関係を示した文献を右側に示した。

図1 母体低タンパク質食負荷による胎子数への影響および胎子数による胎子体重への影響評価

一腹あたりの胎子数は母体低タンパク質食負荷によって有意な変化を認めず(a), 一腹あたりの胎子数が 6-9 匹の範囲で母体の栄養条件に関係なく胎子の体重はほぼ一定の値 (N: 0.8026 ± 0.01021 , L: 0.8205 ± 0.009915) を示した (b)。

N: N 群, L: L 群

(a) 各カラム内の数値は母体数を表す。

(b) 数値は各群の胎子数を表す。

図2 実験処置の概要

実験処置の概要を経時的に示した。上段が母体の週齢, 中段が胎齢, 線を挟んだ下段が処置内容を表す。

図3 E15における母体腔の炎症評価

各パネルは(a) N-PBS 群, (b) N-LPS 群, (c) L-PBS 群, (d) L-LPS 群を示す。LPS または PBS(-)を経腔投与 24 時間後の腔組織像。LPS 投与群(N-LPS, L-LPS)で好中球およびマクロファージ (白矢印) が観察された。スケールバーは 100 μm を表す。

N: N 群, L: L 群, PBS: PBS 投与群, LPS: LPS 投与群

図4 妊娠状態の評価および胎子と新生子の成長

(a) 妊娠中の母体体重増加

4 群は同様の体重増加を示した。

(b) 母体タンパク質摂取量

毎日の餌の摂取量に各餌のタンパク質含有量を掛けて算出した。L 群の母体のタンパク質摂取量は N 群と比べて約半分に制限された。括弧内の数字は母体数を表す。

(c) 胎齢 17 日目の胎子体重

(d) 7 日齢の新生子体重

実験 1 では胎子期および新生子期共に母体低タンパク餌負荷で体重が減少した。

N: N 群, L: L 群, PBS: PBS 投与群, LPS: LPS 投与群

各カラム内の数字は胎子または新生子数を表し、棒グラフは平均値±標準誤差で表した。

†: p 値 < 0.05 二元配置 ANOVA で N 群と比較

図 5 オリゴデンドロサイト前駆細胞(赤)とアポトーシス(緑)の検出

胎齢 17 日目胎子脳の白質を Olig.2 抗体(赤)と TUNEL 法(緑)によって染色した。核は DAPI を用いて青色に染色した。

(a) N-PBS 群, (b) N-LPS 群, (c) L-PBS 群, (d) L-LPS 群を示す。TUNEL 陽性を示すアポト・シス細胞は観察されず, Olig.2 陽性細胞(オリゴデンドロサイト前駆細胞)の染色性に差を認めなかった。スケールバーは 50 μ m を表す。

図 6 オリゴデンドロサイト分化の評価

7 日齢の新生子脳の白質を MBP 抗体 (赤) によって染色した。核は DAPI を用いて青色に染色した。

(a) N-PBS 群, (b) N-LPS 群, (c) L-PBS 群, (d) L-LPS 群, (e) MBP 陽性細胞数

MBP 陽性細胞(成熟オリゴデンドロサイト)は L-LPS 群でのみ減少した。母体低タン

パク食負荷と LPS 投与の相互作用によって MBP 陽性細胞数は減少した。スケールバーは 100 μm を表す。N: N 群, L: L 群, PBS: PBS 投与群, LPS: LPS 投与群

*: p 値 < 0.05 Dunnett's Test で N-PBS, N-LPS, L-PBS と比較。

各カラム下の数字は胎子または新生子数を表し、棒グラフは平均値 \pm 標準誤差で表した。

図 7 新生子脳の炎症評価

7 日齢の新生子脳の白質を nestin 抗体(赤)と GFAP 抗体(緑)によって染色した。核は DAPI を用いて青色に染色した。

(a) N-PBS 群, (b) N-LPS 群, (c) L-PBS 群, (d) L-LPS 群, (e) GFAP 抗体陽性細胞, (f) GFAP 抗体・nestin 抗体二重陽性細胞が GFAP 抗体陽性細胞に占める割合

4 群間でアストロサイトの細胞数には有意差がなかったが、LPS 投与によって反応性アストロサイトを示す黄色い繊維（白矢印:特に白破線の楕円形内に注目）の割合が増加した。スケールバーは 100 μm を表す。

N: N 群, L: L 群, PBS: PBS 投与群, LPS: LPS 投与群, SVZ: 大脳腹側側脳室周囲胚細胞層

*; p 値 < 0.05 二元配置 ANOVA で PBS 投与群と比較。

各カラム下の数字は胎子または新生子数を表し、棒グラフは平均値 \pm 標準誤差で表した。

図 8 実験処置の概要

実験処置の概要を経時的に示した。上段が母体の週齢，中段が胎齢，線を挟んだ下段が処置内容を表す。

図 9 妊娠状態の評価

実験 2, 3 の妊娠中の母体体重増加およびタンパク質摂取量は実験 1 と同傾向を示した。

括弧内の数字は母体数を表す。

図 10 胎子体重と臓器重量

(a) 雄胎子体重, (b) 雌胎子体重, (c) 雄心臓重量比, (d) 雌心臓重量比

実験 2, 3 では実験 1 と異なり, 母体低タンパク餌負荷による胎子重量減少が見られなかった。雌では母体低タンパク餌負荷によって相対的な心臓重量の増加を認めた。

N: N 群, L: L 群

各カラム内の数字は胎子または新生子数を表し, 棒グラフは平均値±標準誤差で表した。

*: p 値 < 0.05 Mann Whitney test で N 群と比較。

図 11 母体低タンパク質食負荷による胎子心臓の mRNA 発現量の変化

マイクロアレイ解析による 7,242 遺伝子の有意 mRNA 発現量変化を volcano plot にて表した。X 軸は N 群と比較した L 群の mRNA 発現量の変化率を表し, Y 軸は p 値を表す。HIF1 α と PHD1 (HIF1 α 抑制因子), HK1 (解糖系調整遺伝子) を赤色で表示した。

図 12 HIF1 α と PHD 1 の mRNA 発現量におよぼす母体低タンパク質食負荷の影響

(a) 雄心臓 HIF1 α 発現量, (b) 雌心臓 HIF1 α 発現量, (c) 雄心臓 PHD1 発現量, (d) 雌心臓 PHD1 発現量

雄は L 群の HIF1 α , PHD1 の mRNA 発現量が有意に増加したが,雌では mRNA 発現量に有意な差を認めなかった。相対的な発現量は $2^{-\Delta Ct}$ 法で計算し、GAPDH の mRNA 発現量との相対値で表示した。

各カラム内の数字は胎子を表し,棒グラフは平均値 \pm 標準誤差で表した。

*: p 値 < 0.05 Mann Whitney test で N 群と比較。

図 13 HIF1 α と PHD 1 の mRNA 発現量の相関

(a) N 群の雄, (b) N 群の雌, (c) L 群の雄, (d) L 群の雌

N 群では両性で HIF1 α と PHD 1 の mRNA 発現量の間で強い正の相関関係を示した (雄: $R^2=0.6666$, $p=0.0022$, 雌: $R^2= 0.6167$, $p= 0.0071$)。L 群では両性で HIF1 α と PHD 1 の mRNA 発現量の間には有意な相関関係を認めなかった。各パネルの数字はサンプル数を表す。

図 14 胎子心臓の病理像

(a, e) N 群の雄, (b, f) N 群の雌, (c, g) L 群の雄, (d, h) L 群の雌

HIF1 α 抗体(赤)によって染色した。核は DAPI を用いて青色に染色した。

(a, b) N 群では両性共に心室中隔に HIF1 α タンパク質の蓄積を認めなかった。(c, d) L 群では両性共に心室中隔に HIF1 α タンパク質の蓄積を認めた。(g) HE染色でL群の雄にのみ空胞変性(黒矢印)が出現し,他の群と比べて高い細胞密度を観察した。スケールバーは 100 μ m を表す。

図 15 母体低タンパク質食負荷による胎子脳一般状態への影響

(a) 雄脳重量比, (b) 雌脳重量比

脳重量が体重に占める割合に母体低タンパク餌負荷による変化は認められなかった。
hypoxyprom 染色を用いて低酸素状態を評価した。両性の染色性に違いを認めなかった
ので雄の染色像を提示した。

(c) N 群雄の hypoxyprom 染色像, (d) N 群雄の hypoxyprom 染色像, (e) 陽性対照の
hypoxyprom 染色像

N 群, L 群共に低酸素状態を示す hypoxyprom 陽性細胞は殆ど観察されなかった。陽
性細胞を白矢印で示す。陽性対照には 5 分間低酸素状態を負荷した胎子脳を使用した。
スケールバーは 100 μm を表す。

図 16 胎子脳遺伝子発現量に対する母体低タンパク質食負荷の影響

(a) 雄脳 HIF1 α 発現量, (b) 雌脳 HIF1 α 発現量, (c) 雄脳 mTOR 発現量, (d) 雌脳
mTOR 発現量

性別に両性共に L 群の HIF1 α と mTOR の mRNA 発現量が有意に増加した。
相対的な発現量は $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 法で計算し、HPRT1 の mRNA 発現量との相対値で表示した。
各カラム内の数字は胎子を表し、棒グラフは平均値 \pm 標準誤差で表した。

*: p 値 < 0.05 Mann Whitney test で N 群と比較

(e) HIF1 α と mTOR の mRNA 発現量の相関

性別や母体栄養条件に関係なく HIF1 α と mTOR の mRNA 発現量の上に強い正の相
関($R^2=0.7700$, $p < 0.0001$)が確認された。

(f) 母体低栄養による HIF1 α 下流遺伝子の発現量に対する影響

PAGE 法にて検出した有意な増加を示した遺伝子群を機能ごとに分類し、N 群と比較
した発現量の変化率で表した。

図 17 母体低タンパク質食負荷による胎子脳への HIF1 α タンパク質蓄積

(a) N 群雄の HIF1 α 染色像, (b) L 群雄の HIF1 α 染色像

HIF1 α 抗体(赤) によって染色した。核は DAPI を用いて青色に染色した。両性の染色性に違いを認めなかったため雄の染色像を提示した。L 群では SVZ に HIF1 α タンパク質の蓄積が観察された。

(c) N 群雄の HIF1 α , Olig.2二重染色像, (d) L 群雄の HIF1 α , Olig.2二重染色像

HIF1 α 抗体 (赤) と Olig.2抗体 (緑) によって染色した。核は DAPI を用いて青色に染色した。(c, d) SVZ の拡大像。L 群の Olig.2陽性細胞 (オリゴデンドロサイト前駆細胞) で HIF1 α タンパク質の蓄積が観察された (白矢印)。スケールバーは 100 μ m を表す。

図 18 母体低タンパク質食負荷による HIF1 α およびmTOR 下流遺伝子の発現量に対する影響

(a) mRNA 発現量が有意に増加した HIF1 α 下流遺伝子

表11で示した遺伝子群の発現量の変化をN群との相対比で示した。

(b) mRNA 発現量が有意に増加した mTOR 下流遺伝子

表12で示した遺伝子群の発現量の変化をN群との相対比で示した。

いずれのグラフも平均値 \pm 標準誤差で表した。