

## 論文の内容の要旨

論文題目

Fetal low protein and vitamin B deficiency programs hypertension in mice

和訳 マウスにおける胎児期低蛋白およびビタミン B 欠乏暴露と高血圧

指導教官 水口 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

国際保健学専攻

大塚 里津子

### 1. 緒論

日本を含め世界的に、高血圧、高脂血症、動脈硬化、糖尿病などの成人病（生活習慣病）が著しく増加しており、この発症の予防が重要な課題となっている。現在、これらの原因として、遺伝的要因、生活習慣要因、外部環境要因が考えられている。予防として生活習慣の改善を中心とした一次予防、そして二次予防として病気の早期発見・早期治療が挙げられている。1989年英国サウザンプトン大学の疫学者 David Barker 達が生体体重と心疾患による死との間に強い関連性のある事を明らかとし、この生活習慣病には胎児期の環境が関係しているという説が提唱された。この説は成人病胎児期発症説と呼ばれ、現在では Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 学説に発展している。多くの疫学調査、動物実験から、妊娠中の母親の低栄養・過量栄養状態が児の発達および代謝大きな影響をおよぼす事が明らかとなってきた。

我々は、母親の低栄養が引き起こす、児の高血圧発症に着目し研究した。高血圧は、世界の死亡因の3分の1を占める、心循環器疾患を引き起こす。2000年には、世界中には10億人の高血圧患者がおり、2025年には、15億6千万人にも増えると予測されており、発展途上国、先進国に限らず、世界全体で今後も増加していく病気である。母親の栄養状態すなわち、胎児期の低栄養環境が引き起こす高血圧発症機序を明らかにする事は、予防方法の確立にも、有用であると考えられる。

母親の低栄養と児の高血圧の関連を調べる動物実験は、低蛋白モデルが一般的に使われている。1994年に Langley 達が行った、母親への投与蛋白を半分に制限する、低蛋白ラットモデルは、成長後の仔の血圧上昇を惹起した、多くの研究者達が、このモデルを用いてその血圧上昇機構について研究を進めた。

その中で、腎臓機能の変化が、高血圧を引き起こす一つの機序である事が明らかになってきた。腎臓は尿の量と成分を大幅かつ迅速に増減して体液の調節を行い、体液の量と組成の制御を行っている。また、血管と密接な繋がりを持ち、心拍出量の20%強の血液が供給されている。腎臓は血圧調節において、重要な役割を担っている臓器である。先行研究

では、腎臓に非可逆的な解剖学的構造変化が生じる事が明らかになっている。すなわち腎臓系球体ネフロンが形成される時期に低蛋白に曝されると、アポトーシスカスケードの活性化が起こり、ネフロンは減少する事が明らかとなっている。出生後にネフロン数は増える事はなく、このネフロン減少は高血圧発症の一因となる。また、グルココルチコイドや RAS (Renin Angiotensin system) のような、血圧調節機構も大きな変化を生ずる。細胞質内に  $11\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプ(HSD1)、2(HSD2)という酵素が存在し、HSD1 は不活性型のコルチゾンから活性型のコルチゾールに、HSD2 は逆に活性型のコルチゾールを不活性化する。不活性化されたコルチゾールはレセプターに結合することは出来ず、作用は発揮しない。腎臓では、活性型グルココルチコイドは、遠位尿細管や集合管の上皮細胞の核内レセプターに結合することでその作用を発揮する。ラットの低蛋白暴露モデルで、胎盤の  $11\beta$  HSD2 減少、腎臓の GR 発現増加が報告されている。もう一つの血圧調節機構としては RAS があり、アンジオテンシン II がアンジオテンシンレセプタータイプ 1(AT1R)、タイプ 2(AT2R)を介して起こす昇圧・降圧作用である。ラットの先行研究では、胎仔期の低蛋白暴露で AT1R、mRNA の発現増加が認められている。

ラットでは血圧上昇機構が明らかになりつつあるが、種差が大きくマウスの研究成果には見るべきものがない。しかし、マウスの研究技術は確立しており、ノックアウトなどの遺伝子操作の技術も進んでいる。それ故、胎児期の栄養と生後の高血圧発症の機序を分子生物学的に研究して行くに当たり、マウスモデルは大変有用であると考え。我々は、マウスの蛋白制限モデルでの高血圧発症の機序を腎臓に焦点をあて、明らかにすることを目的として研究を行った。遺伝子発現の調節機序としてエピジェネティクスがある。そのメチレーションに関与する代謝系のひとつとして One-carbon metabolism がある。One-carbon metabolism ではアミノ酸が重要な役割を担っている。胎児期の低蛋白はアミノ酸不足を引き起こし、One-carbon metabolism に影響を及ぼし、児の遺伝子発現変化、生後の高血圧を引き起こす。一方、葉酸や、VB12、VB6 は、重要なコファクターとして作用している。これらビタミン B 群が欠乏すると、この代謝系でホモシステインが上昇し、DNA のメチル度が減少する。我々は、この One-carbon metabolism の代謝不全が重要な役割を果たしている可能性を考え、胎仔期にこれらビタミン欠乏に曝された場合に、仔の代謝系の不全が生じると考え、ビタミン B 群欠乏の影響も検討した。

## 2.方法

プラグ確認後マウス (C57/BL6) を 4 群に分け、コントロール群(C)には 18%蛋白食を与え、低蛋白食群(PR)には 9%蛋白食を与え、妊娠 5 日目に、ビタミン欠乏群(CVR)には 18%蛋白に葉酸、VB12、VB6 を除いた食事を与え、低蛋白・ビタミン欠乏群(PRVR)には 9%蛋白に葉酸、VB12、VB6 を除いた食事を与えた。4 群共に出産直後より通常食を与え、4 週間の授乳後、児は離乳し、通常食を与えた。妊娠 18 日目に一部の母マウスを解剖し、母親の血液を採取、ホモシステインおよびメチオニン、グリシン、スレオニンを測定し、胎盤、胎児、胎児の腎臓・肝臓の重量を測定した。残りの母マウスより生まれた児は、離乳 4 週間後 12 週齢まで毎週体重を測定し、5 週齢から 12 週齢まで週に 1 回血圧を測定した。最も大きな血圧差を認めた C-G と PRVR-G のメスについて 12 週齢に解剖し、右腎より RNA を抽出、RT-PCR を用い、GR、 $11\beta$  HSD2、AT1R、AT2R の発現の比較を行った。また、左腎はパラフィン抱埋後、免疫染色にて GR および AT1R について 2 群間での比較を行った。

## 3.結果

低蛋白とビタミン欠乏は共に 6 週齢以降の仔に血圧上昇を引き起こした。12 週齢においては C に比べ、PR,CVR,PRVR それぞれ平均 7,6,12mmHg 程度血圧が高く、低蛋白およびビタミン欠乏の血圧への影響はそれぞれ  $p<0.0001$ , $p=0,0029$  と、共に有意であった。出生体重は C に比べそれぞれ、PR 7%、CVR 11%、PRVR 11%ほど低く、授乳時には急激な体

重増加が認められた。しかし、離乳後には肥満は認められず、CVR では成長阻害が認められた。低蛋白は、妊娠 18 日目の児の腎臓重量を 17%減少させた。一方ビタミン欠乏は妊娠 18 日目児の胎盤重量が 12%低かった。12 週齢ではビタミン欠乏のみ腎臓重量が 8%低かった。RT-PCR では PRVR 群の 12 週齢の腎臓において GR, 11 $\beta$  HSD2, AT1R, AT2R いずれの遺伝子においても発現変化が認められなかった。しかし、免疫染色では GR はメザンジウムおよび尿細管、AT1R はマクラデンサ細胞、ボウマン嚢の膜細胞、および一部遠位尿細管での局所的増加を認めた。母親の血中のホモシステイン濃度は、PR は C の 56%で最も低く、CVR は 1.7 倍で最も高かった。母親の血中のアミノ酸は CVR でメチオニンが C より 19%低く、PR ではメチオニン、グリシン、スレオニンそれぞれ 21,36,41%C に比べ低かった。

#### 4. 考察

母親のビタミン欠乏は仔の血圧上昇を引き起こした。そして、ビタミン欠乏の血圧上昇は低蛋白が引き起こした血圧上昇と同程度であった。

CVR では母親の血中のホモシステイン値が有意に上昇していたことから、ビタミン欠乏により引き起こされた高ホモシステインが高血圧発症に起因している事が示唆された。

低蛋白およびビタミン欠乏は共に仔の出生体重を低くしたが、生後 4 週齢にはコントロールと同じ、またはそれ以上に成長した。この低出生体重および授乳中の体重のキャッチアップはその後の血圧上昇に何らかの影響を及ぼしていると考えられた。しかし、血圧で一番高値を示したのは PRVR であったが、低出生体重および授乳中の体重増加では PRVR が最も顕著に傾向を示したわけではなかった。以上の事から、我々のマウスモデルでは低出生時体重および授乳中の体重増加は血圧を規定する因子ではあるが、第一の要因ではない事が示された。

我々はまた、低蛋白では腎臓、ビタミン欠乏では胎盤重量の減少を認め、胎仔期の臓器への影響が異なる事を明らかとした。

更に、低蛋白ではホモシステインおよびメチオニンの減少を認め、アミノ酸不足による、One-carbon metabolism の低下およびメチルドナーの不足が高血圧プログラミングに一因している可能性を示唆した。一方ビタミン欠乏におけるホモシステインの著しい増加は One-carbon metabolism の代謝不全を介し、仔の高血圧発症の機序となっている可能性もまた示唆された。これらの変化は、仔の腎臓で認められた局所的な GR、AT1R 発現増加を引き起こし、高血圧発症の機序となっている可能性が示唆された。

以上のように、我々は母親の摂取蛋白に加え、ビタミンの重要性を明らかとした。また、マウスを用いて、母親の低蛋白およびビタミン欠乏が仔の成長、臓器への影響は異なるものの、共に、高血圧発症を引き起こす事を明らかとした。