



# Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic $\beta$ cell mass

井上, 妙

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5022

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005022>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	井上 妙
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5022 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic  $\beta$  cell mass(妊娠後期の  
子宮内低栄養が膵 $\beta$ 細胞量に及ぼす影響)

審 査 委 員

主 査	教 授	清野 進
	教 授	山崎 峰夫
	教 授	林 祥剛

(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic $\beta$ cell mass

妊娠後期の子宮内低栄養が膵 $\beta$ 細胞量に及ぼす影響

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

糖尿病・代謝・内分泌内科学

(指導教員：神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科学講座 糖尿病・代謝・内分泌分野

兼務教授 木戸良明)

井上 妙

## 要約

低体重出生が膵 $\beta$ 細胞に与える影響を検討した。妊娠した C57BL6J マウスを用いて、妊娠後期から 70%の食餌制限を行い、出生後のマウスの個体の表現型および膵 $\beta$ 細胞量を解析した。食餌制限群 (RG) の膵臓では、対照群 (CG) と比較して出生時の膵 $\beta$ 細胞量の著明な減少を認めた。RG の体重はいわゆる「catch-up-growth」のパターンを呈し、生後 7 日目には CG の体重に追いつき、その後 CG の体重を上回った。しかし、4 週齢の RG の膵 $\beta$ 細胞量はなお CG より減少したままであった。高脂肪食負荷により、12 週齢の RG の膵 $\beta$ 細胞量は CG と比較して有意な増加を認めたが、20 週齢では RG の膵 $\beta$ 細胞量は減少の傾向がみられた。血中インスリン値も 24 週齢以後には RG が CG よりも減少する傾向となった。これらの結果より、RG では膵 $\beta$ 細胞の発育が不十分なためインスリン抵抗性のもとでは容易に膵 $\beta$ 細胞不全を生じやすいことが示唆される。

## 目的

糖尿病・高脂血症・高血圧・肥満などの生活習慣病の発症に遺伝的要因や環境的要因が関与していることは広く知られているところであるが、1989 年に Barker らが糖尿病や心筋梗塞といった生活習慣病の発症が低体重出生と密接な関係があることを報告した。“Hunger winter”として知られる Dutch famine に関する 1994 年に発表された疫学的調査により、耐糖能異常の発症に関しては特に妊娠後期の低栄養状態が関連していることが明らかとなった。また、胎児期に低栄養状態に晒された影響が一生続くことの重要性が指摘された。後に Barker らは、胎児は子宮内で低栄養環境に適応するためのプログラミングを受けるという仮説 “the thrifty phenotype hypothesis”を提唱したが、そのメカニズムはいまだ明らかになっていない。

近年、このメカニズムを明らかにするために動物モデルを用いた実験が行われるようになった。由良らは妊娠マウスに 70%食餌制限を行った。低栄養にさらされた仔マウスは、インスリン感受性の低下を伴う耐糖能異常、肥満、diet induced thermogenesis の消失、レプチン感受性の低下を呈した。ほかに筋組織でのインスリン感受性低下、低体重出生個体の膵 $\beta$ 細胞のミトコンドリア機能異常の報告がある。しかしながら妊娠後期の低栄養状態が膵 $\beta$ 細胞に及ぼす影響に関しては、その結論は一定していない。今回、我々はマウスを用いて妊娠後期の低栄養状態を再現し、低栄養がマウスの膵 $\beta$ 細胞に及ぼす影響について検討した。

## 方法

### マウス

妊娠した C57BL6J マウスを胎生 10.5 日目 (dpc) に 2 群に分けた。対照群 (CG) には自由に餌を与えた。食事制限群 (RG) は 10.5 dpc から出産日までの毎日、前日に CG に与えた餌の量の 70% の食餌制限を行った。出産直前と考えられる胎生 18.5 日目の夕方に、RG の母には 2.5g の餌を仔の食殺を防ぐ目的で追加した。出生したマウスは生後 4 週齢まで通常どおりに母乳で飼育した。

4 週齢から、RG および CG マウスは脂肪 30% (w/w) (牛脂 14%、豚脂 14%、大豆油 2%) を含む高脂肪食で飼育した。午前 9 時～11 時にマウス尾静脈より採取した血液を用いて、随時血糖値および血清インスリン値を測定した。実験はオスのマウスだけを用いた。この実験は、神戸大学医学部動物実験委員会のガイドラインに沿って行った。

### 膵島の免疫染色および形態学的検討

膵臓を摘出、計量した後に、Bouin 液で一晩固定してパラフィンで包埋した。4  $\mu$ m 厚の連続切片をスライドガラス標本にした。脱水処理後、モルモット由来の抗インスリン抗体とウサギ由来の抗グルカゴン抗体 (いずれも Dako 社製) でインスリンとグルカゴンによる免疫染色を行った。免疫複合体は Cy3 または FITC で標識した二次抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) でそれぞれ検出した。膵 $\beta$ 細胞面積の定量には各週齢のマウスを両群とも 3～5 匹用い、パラフィン包埋した膵臓の切片は 200  $\mu$ m 間隔で免疫染色し、同じ膵島の重複計測を行わないようにした。膵島の画像を手動でトレースし、WinROOF (Mitani) ソフトウェアを用いて解析した。総膵 $\beta$ 細胞量は膵臓の総面積に対する膵 $\beta$ 細胞の総面積の百分率で示した。

### 経口糖負荷検査

マウスは前日夕より 16 時間絶食とした。ブドウ糖 (1.5 mg/g 体重) を経口負荷する直前、負荷後 15、30、60、120 分後に採血を行い、血糖値とインスリン値を測定した。

### 統計解析

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、分散分析を用いて比較した。 $P<0.05$  を有意とした。

## 結果

### 胎児期の低栄養が生後の成長曲線に及ぼす影響

RG の出生時体重は CG に比較して有意に軽い ( $1.13 \pm 0.06$  g 対  $1.40 \pm 0.01$  g;  $P<0.05$ ) が、RG はその後体重増加を認め、生後 7 日頃には CG と同程度となり、その後 RG の体重は CG を上回った。この体重の変化はヒトに

おける子宮内胎児発育遅延による低出生体重児でも観察されており、「catch up growth」と呼ばれている。

### 胎児期の低栄養が出生時の膵 $\beta$ 細胞量に及ぼす影響

RG の出生時の膵 $\beta$ 細胞量は CG と比較して約 25% に減少していた ( $0.51 \pm 0.20\%$  versus  $1.40 \pm 0.13\%$ ;  $P<0.05$ )。RG では膵島密度も約 40% に減少していた。RG では膵島の構造は不整形で、グルカゴン陽性細胞とインスリン陽性細胞が混在し、膵島のマントル構造が失われていた。さらに、RG の膵島ではインスリンとグルカゴンに共染する細胞もあり、膵島の分化にも異常がある可能性が示唆された。

### 食事制限群 (RG) の膵 $\beta$ 細胞量の経時的変化

4 週齢では依然として膵 $\beta$ 細胞量、膵島密度ともに RG で有意に低値であるが、膵 $\beta$ 細胞量は、その後 8～10 週齢で CG とほぼ同程度となり、12 週齢では逆に CG より増加した。しかし興味深いことに、20 週齢では RG の膵 $\beta$ 細胞量は再び CG より減少する傾向を示した。

### 食事制限群 (RG) の耐糖能の経時的変化

胎児期の低体重が糖代謝に及ぼす影響を調べるために、生後の随時血糖値と血清インスリン値の経時的変化を観察した。12 週齢と 20 週齢では RG と CG の間に随時血糖値の有意な差はみられなかった。随時の血清インスリン値も 4～12 週齢では RG と CG で差は認められなかったが、16 週齢以後 RG の血清インスリン値は CG と比較して高くなる傾向となり、逆に 24 週齢以降は低くなる傾向を示した。これらの結果は両群間で見られた膵 $\beta$ 細胞量の違いを反映している可能性が考えられた。経口糖負荷検査では、20 週齢で、RG の糖負荷後 120 分後の血糖値が CG に比べて有意に高値となった。同週齢におけるブドウ糖に対するインスリン分泌反応は両群間で有意な差を認めなかったが、RG で高値になる傾向がみられた。

これまでの結果から、RG では肥満による末梢のインスリン抵抗性に対する膵 $\beta$ 細胞の代償性肥大が CG に比べて早期に起こり、膵 $\beta$ 細胞不全が早期に生じる可能性が示唆された。

## 考察

今回の実験では、RG では CG と比較して出生時の膵 $\beta$ 細胞量の著明な減少を認めた。RG の出生時体重は CG と比較して有意に低体重であったが、生後 7 日目ごろには CG の体重に追いつき、その後は上回った。その一方で、RG の膵 $\beta$ 細胞量は 4 週齢においても依然として CG より有意な減少を示して

いた。これらの結果から、生後数週間の RG の膵β細胞量あたりの体重増加が RG の個々の膵β細胞にとって過剰な負荷になっている可能性が考えられる。

RG では 8~10 週齢で膵β細胞量は CG に追いつき、12 週齢では逆に CG に比べ有意な膵β細胞量の増加を認めた。その結果、RG では 20 週齢までは血清インスリン値が CG と比較して高値になる傾向を示した。一般に、肥満によるインスリン抵抗性が高インスリン血症を引き起こすことが知られている。しかし、子宮内胎児発育遅延の高インスリン血症の原因は、一般の肥満で観察されるインスリン抵抗性を引き起こすメカニズムとは異なるとする報告がある。また、インスリン抵抗性とは関係なく、膵β細胞不全が低体重出生に関連した 2 型糖尿病の主な原因であるとする報告もある。我々の実験系においては 12 週齢の時点では両群間におけるインスリン感受性に有意な差はみられないことを確認している。これらの結果から、RG ではインスリン抵抗性の増強とは異なるメカニズムで、高脂肪食による肥満に対する膵β細胞量の増大とインスリンの異常な分泌反応が起こっていることが考えられる。

膵β細胞に対してインスリン分泌の増加などの過剰な負荷が持続すると、膵β細胞不全を生じ、膵β細胞量が十分に増大できない、あるいは膵β細胞のグルコース応答性インスリン分泌不全の結果として、膵臓が十分なインスリンを分泌できず、糖尿病が発症する。RG においては、12 週齢で膵β細胞の肥大を認めたが、20 週齢になると RG の膵β細胞量は再び CG よりも減少する傾向がみられた。

これらの結果は、胎児期の低栄養によって膵β細胞の発育や分化が不十分になり、成熟後に受けるさまざまな負荷やストレスに対する膵β細胞の機能や脆弱性に影響を及ぼしている可能性が示唆される。その結果、胎児期に低栄養にさらされた胎児は成熟後に容易に膵β細胞不全に陥りやすいと考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲第 2058 号	氏 名	井 上 妙
論 文 題 目 Title of Dissertation	<b>Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic <math>\beta</math> cell mass</b> 妊娠後期の子宮内低栄養が膵 $\beta$ 細胞量に及ぼす影響		
審 査 委 員 Examiner	主 査 清野 進 Chief Examiner 副 査 山崎 峰夫 Vice-examiner 副 査 林 祥剛 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 22 年 3 月 16 日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【背景と目的】

1989 年に Barker らが糖尿病や心筋梗塞といった生活習慣病の発症が低体重出生と密接な関係があることを報告した。また、耐糖能異常の発症に関しては特に妊娠後期の低栄養状態が関連していることも報告されている。後に Barker らは、胎児は子宮内で低栄養環境に適応するためのプログラミングを受けるという仮説“the thrifty phenotype hypothesis”を提唱したが、そのメカニズムはいまだ明らかでなく、妊娠後期の低栄養状態が膵 $\beta$ 細胞に及ぼす影響も不明である。今回、我々はマウスを用いて妊娠後期の低栄養状態を再現し、低栄養がマウスの膵 $\beta$ 細胞に及ぼす影響について検討した。

【方法】

妊娠した C57BL6J マウスを胎生 10.5 日目 (dpc) に 2 群に分けた。対照群 (CG) には自由に餌を与えた。食事制限群 (RG) は 10.5 dpc から出産日まで 70% の食餌制限を行った。RG および CG マウスは生後 4 週齢から、高脂肪食で飼育した。これらのマウスの血糖値・血清インスリン値など代謝データ、膵切片の免疫染色を用いた膵島の形態を検討した。

【結果】

1. RG の膵臓では、CG と比較して出生時の膵 $\beta$ 細胞量の著明な減少を認め、膵島の構造も不整形であった。
2. RG の出生時体重は CG に比較して有意に軽い、生後 7 日目には CG の体重に追いつき、その後 CG の体重を上回った。
3. 4 週齢の RG の膵 $\beta$ 細胞量はなお CG より減少したままであったが、高脂肪食負荷により、12 週齢の RG の膵 $\beta$ 細胞量は CG と比較して有意な増加を認めた。しかし、20 週齢では RG の膵 $\beta$ 細胞量は再び減少の傾向がみられた。
4. 随時の血清インスリン値も 4～12 週齢では RG と CG で差は認められなかったが、16 週齢以後 RG の血清インスリン値は CG と比較して高くなる傾向となり、逆に 24 週齢以降は低くなる傾向を示した。
5. 経口糖負荷検査では、20 週齢で RG の糖負荷後 120 分後の血糖値が CG に比べて有意に高値となった。

【考察】

RG では CG と比較して出生体重と出生時の膵 $\beta$ 細胞量の著明な減少を認めた。RG の体重は、生後 7 日目ごろには CG の体重に追いつき、その後は上回ったが、RG の膵 $\beta$ 細胞量は 4 週齢においても依然として CG より有意な減少を示していた。これらの結果から、生後数週間の RG の膵 $\beta$ 細胞量あたりの体重増加が RG の個々の膵 $\beta$ 細胞にとって過剰な負荷になっている可能性が考えられる。RG においては、12 週齢で膵 $\beta$ 細胞量の増大を認めたが、20 週齢になると再び CG よりも減少する傾向がみられた。これらの結果は、胎児期の低栄養によって膵 $\beta$ 細胞の発育や分化が不十分になり、成熟後に受けるさまざまな負荷やストレスに対する膵 $\beta$ 細胞の機能や脆弱性に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

本研究は、妊娠後期の子宮内低栄養が膵 $\beta$ 細胞量に及ぼしうる影響を検討し、胎児期の低栄養によって膵 $\beta$ 細胞の発育が不十分なためインスリン抵抗性のもとでは容易に膵 $\beta$ 細胞不全を生じやすいという、II 型糖尿病の病因について新たな仮説を提唱した価値ある集積であると認める。

よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。

The candidate, having completed studies on “Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic  $\beta$  cell mass”, with a specialty in metabolism, and having advanced the field of knowledge in the area of diabetes, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D.(Medicine).