

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500718

研究課題名(和文)

糖尿病妊娠ラットより生まれた新生仔の異常を目安に食生活の効果を検討する

研究課題名(英文)

Effect of high-fat diet on the hearts of diabetic mother's pups.

研究代表者

小浜 智子 (KOHAMA TOMOKO)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：00364703

研究成果の概要(和文)：糖尿病妊娠モデルラットに高脂肪食を与え、生まれた仔や孫に与える食餌の影響を検討した。ストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルラット(D群)と生食を投与したコントロールラット(C群)を用いて実験を行った。普通食(C)、高脂肪ラード食(L)、高脂肪魚油食(F)をそれぞれ与え実験を行った。生まれた子供における高脂肪食の影響を検討した。高脂肪食の摂取により出生時高血糖や中性脂値高値を示した。また新生仔心臓におけるシグナリング解析により、母親が糖尿病であると生まれた仔は親の糖尿病の影響を受け、さらに胎生期の栄養状態がそれらに影響を及ぼす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

Newborn infants of diabetic mothers have abnormal circulatory organs. In this study, we explain this hypothesis on the basis of insulin signalling in the hearts of newborn rats. Pregnant rats were divided into streptozotocin-induced diabetic and control group. Rats were fed lard (DM-L; 21% fat), fish oil (DM-F; 21% fat) or control diet (DM-C; 7% fat). To examine the alterations in insulin signalling in the hearts of newborn pups of diabetic mothers in relation to diet, we isolated the hearts of the newborns from diabetic and control mothers and determined the phosphorylation levels of the Akt308, Akt473, p38, JNK and ERK, and expression levels of PDK1 and mTOR. The mean blood glucose level in the diabetic group (DM-C, DM-L and DM-F) was significantly higher than that in the control group (CM-C, CM-L and CM-F). The mean triglyceride levels in rats from the D-L group was higher than that in rats from the D-C group and lower than that in rats for D-F group. Phosphorylation levels of Akt308, Akt473 and expression levels of PDK1 and mTOR decreased in diabetic pups compared with control pups. Phosphorylation level of Akt473 and expression level of mTOR increased in diabetic pups fed the fish oil diet compared with fed the lard diet. These results show that the insulin signalling pathway of newborn pups is influenced by diabetes and the diets of their diabetic mothers. We conclude that features of diabetes can be intergenerational if mother rats are diabetic.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：糖尿病・妊娠・高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

胎生期の栄養状態は出生後の糖脂質代謝異常、心血管障害に関与することが知られている。正常妊娠において食事は母体の栄養状態、さらには胎児の栄養状態や母体の出産後の体力回復に影響する。妊娠期の栄養(胎児期)は出生後の一生の健康、あるいは次世代へ著しい影響を与えることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

著者が既に報告した糖尿病妊娠モデルラットに高脂肪食を与えた実験でも生まれた仔への脂質代謝異常が示した。そこで、本研究ではストレプトゾトシン(以下STZと略す)投与による糖尿病モデルラットを用い、そのモデルラットに高脂肪食(ラード、魚油)を摂取させた場合、それらが仔から孫へどのような影響を及ぼすか心臓のシグナル伝達系に着目して検討を行った。シグナル伝達系について検討する際、予備実験として骨格筋と心臓の2つの臓器について検討を行った。その結果、心臓にのみAktやJNKにおいてリン酸化レベルの変化が認められた。一方、臨床的には糖尿病の親より生まれた子供には巨大児や先天奇形、新生児低血糖症、心筋肥大などの心疾患が認められる。そこでシグナル伝達系の解析を行う臓器を心臓にしぼり、親の高血糖が子や孫のシグナル伝達系に与える影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1)実験動物

①妊娠1日目のWistarラット(200~250g、日本クレア)をランダムに2群に分け、糖尿病モデル群(D)とコントロール群(C)で実験を行った。糖尿病モデルラットは妊娠4日目にSTZ(ストレプトゾトシン、Sigma)を50mg/kgになるように200 μ lのクエン酸バッファーに溶解し、尾静脈投与することにより作成した。コントロールラットには同じ方法にて生理食塩水を投与した。糖尿病モデルラットはSTZを投与後48時間で血糖値が300mg/dl以上の個体を糖尿病とした。

②餌は普通食(C、日本クレア社、脂肪7%)、高脂肪ラード食(L、脂肪21%)、高脂肪魚油食(F、脂肪21%)それぞれ与え、C-C、C-L、C-F、D-C、D-L、D-Fの6群とした。孫ラッ

トは、メスの仔ラット(14週齢)と正常な雌ラット(14週齢)を交配させ、親、仔、孫の3代まで継代飼育した。ラットは室温25 $^{\circ}$ C、湿度60 \pm 5%、12時間周期の明暗サイクル下で、木製チップを敷いたプラスチックケージで個々に飼育した。動物の飼育は「実験動物の飼養及び保管に関する基準(総理府告示第6号)」を遵守して行った。

血液生化学的検査

血液は心臓より全採血し、3000g、10分遠心し血清を得た。血清は、測定まで-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。血糖値は、妊娠1、妊娠7、14、22日目に尾先端より採取した血液で測定した。血清中性脂肪は、トリグリセライドEテストワコー(和光純薬工業)を用いて測定した。

(2)インスリンシグナル解析

①心臓から全蛋白質の抽出

ラットの新生仔心臓は出生4日目に摘出し、液体窒素で凍結後粉碎した。心臓は1群あたり12~15匹より摘出し、可溶性蛋白質を抽出するため、心臓1mgあたり200 μ lのT-PERバッファー(PIERCE社)を加え、超音波でホモジナイズした。40000rpm、4 $^{\circ}$ C、30分間の超遠心により上清を分離し、分析を行うまで-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

②ウェスタンブロット

上清の全蛋白質濃度はBradford法で測定し、蛋白質量が30 μ g/10 μ lになるようにSDSサンプルバッファー(1%SDS, 40mM Tris-HCl pH6.8, 7.5% glycerol, 50mM DTT)で蛋白質量を調整した。新生仔心臓より抽出した蛋白質はシグナル伝達系に関わる種々の蛋白質の抗体を用いて以下に示すようにウェスタンブロット法により解析を行った。12.5%のSDSポリアクリルアミドゲルに電気泳動法により分離後、ニトロセルロースメンブレンにウエット式のGENIE Electrophoretic Transferを用いて24V 45分で転写した。メンブレンはTBSTで5分間3回洗浄後、ブロッキング溶液にて1時間振とうすることによりブロッキングを行った。一次抗体(抗Akt抗体、抗JNK抗体、抗p38抗体、抗ERK抗体、抗p-Akt473抗体、抗p-JNK抗体、抗p-ERK抗体、抗p-p38抗体、すべてCell

Signaling)は5%BSAを含むTBSTで1/1000に希釈し、メンブレンを4°Cで一晩反応させた。TBSTで未反応の一次抗体を洗浄した後、ブロッキング溶液で1/5000に希釈した二次抗体を室温で1時間反応させた。未反応二次抗体を除去した後、ECL試薬を用いて化学発光を行い、イメージアナライザーで検出し定量解析した。

4. 研究成果

(1) 親・仔の血糖値の推移 (図1)

親の血糖値はコントロールラットと比較すると糖尿病ラットの3群でも有意に高値を示したが、魚油食(D-F)では平均血糖値が 334 ± 39 mg/dlで、同量の脂肪を摂取しているラード食(D-L)の 414 ± 27 mg/dl、普通食(D-C)の 370 ± 26 mg/dlより低値を示した(図1A)。仔ラットの出生時血糖値は、糖尿病ラット(D-C、D-L、D-F)ではコントロールラットと比較してすべての群で有意に高値を示したが、成長に伴いするにつれて正常値まで低下した。

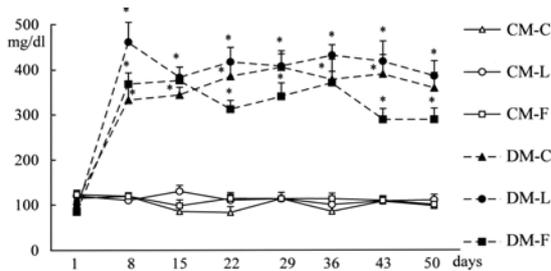


図1

(2) 親・仔の中性脂肪値 (図2)

親の中性脂肪はコントロールラットのラード食(C-L)では、普通食(C-C)と比較して影響は見られなかった。一方、糖尿病ラットのラード食(D-L)で有意に高値を示した(未記載データ)。仔の中性脂肪は糖尿病ラットのラード食(D-L)において、普通食(D-C)と比較して高値を示したのに対し、魚油(D-F)では低値を示した。コントロールラットにおいては、普通食(C-C)、ラード食(C-L)、魚油食(C-F)で中性脂肪値に差は認められなかった。

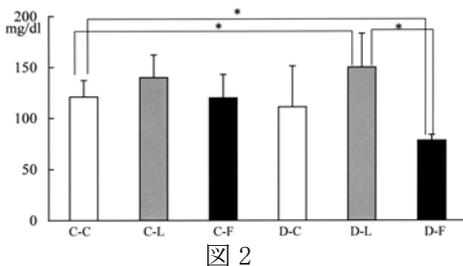


図2

(3) 仔ラット心臓におけるシグナル伝達系 (図3)

糖尿病ラット、コントロールラットの親から

生まれた仔ラットのインスリンシグナリングの1つであるAktやMAPキナーゼのp38、ERK、JNKのリン酸化レベルを解析した。

Aktのリン酸化レベルは、糖尿病ラットにおいて普通食(D-C)、ラード食(D-L)、魚油食(D-F)でコントロールラット(C-C)と比較して有意に低下した。その中でも、魚油食(D-F)はラード食(D-L)よりも高い傾向を示した(図3A)。一方、コントロールラットではラード食(C-L)で普通食(C-C)と比較して有意に低下した。

p38のリン酸化レベルは糖尿病ラットの普通食(D-C)ではコントロールラット(C-C)と比較して有意に増加し、ラード食(D-L)でも高い傾向が示されたが、魚油食(D-F)では逆に有意に低下した(図3B)。コントロールラット間での餌の違いではラード食(C-L)において有意に増加した。ERKのリン酸化レベルは糖尿病ラット、コントロールラットどちらにおいても餌の違いによる差は認められなかった(図3C)。JNKのリン酸化レベルでは、糖尿病ラットでは餌の違いによる差は認められなかったものの、普通食(D-C)でコントロールラット(C-C)より高い傾向が示された(図3D)。コントロールラット間の比較では、ラード食(C-L)は普通食(C-C)より有意に減少し、魚油食(C-F)で増加した。

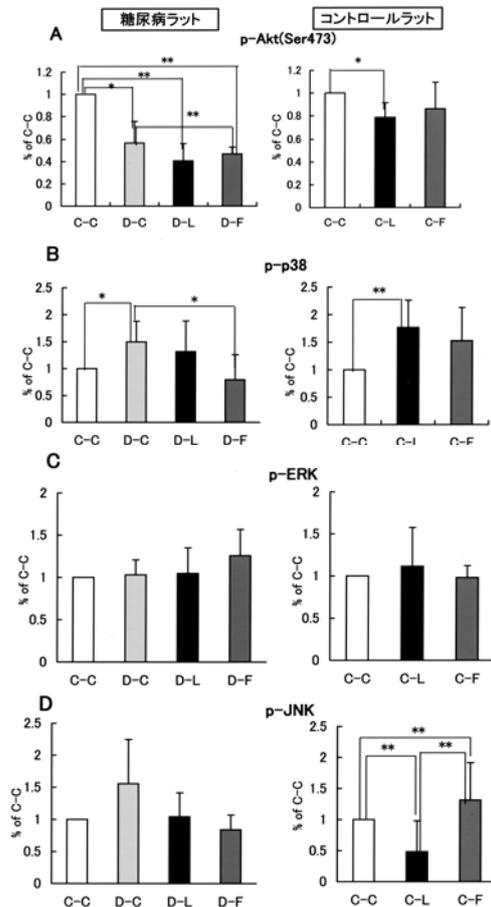


図3

(5) 孫ラット心臓におけるシグナル伝達系 (図 4)

孫ラットの糖尿病ラット心臓におけるインスリンシグナリングやMAPキナーゼのリン酸化レベルを仔ラットと同様の方法で調べた。Akt のリン酸化レベルは餌の違いによる差は認められなかった(図 4A)。

p38 のリン酸化レベルでは普通食(D-C)でコントロールラット(C-C)より有意に低下した(図 4B)。ERK のリン酸化レベルは普通食(D-C)と魚油食(D-F)で有意に低下した(図 4C)。また JNK のリン酸化レベルは普通食(D-C)、ラード食(D-L)でコントロールラット(C-C)と比較して有意に増加した(図 4D)。

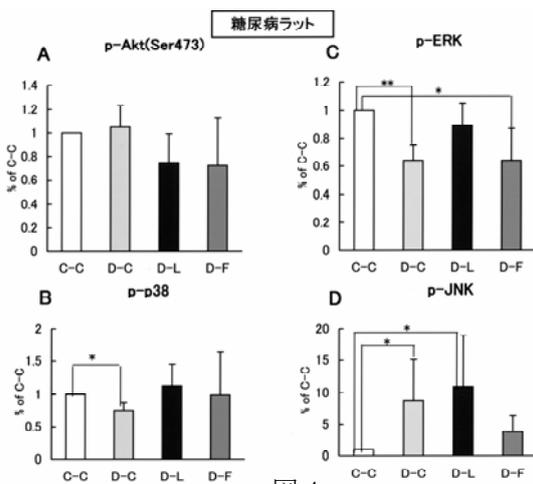


図 4

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

河原田(那須)律子、中村彰男、小濱一弘、小濱智子 高脂肪食を投与した糖尿病ラットの子孫における心臓のシグナル伝達系に与える影響, 糖尿病と妊娠, 査読有, 2010, 10(1), 97-104

[学会発表] (計 9 件)

1. Ritsuko Nasu-Kawaharada, Tomoko Kohama, Akio Nakamura, Effect of a high-fat diet on the skeletal muscle and the heart of diabetic mouse, American Society for Cell Biology, 2010.12 Philadelphia

2. 河原田(那須)律子, 中村彰男, 小濱智子, 高脂肪食を与えた糖尿病妊娠マウスの骨格筋や心臓におけるシグナル伝達の影響, 日本糖尿病・妊娠学会, 2010.11 埼玉

3. 河原田(那須)律子, 中村彰男, 小濱一弘, 小濱智子, 糖尿病母ラットより生まれた仔の心臓におけるインスリンシグナル変化, 日本糖尿病学会, 2010.5 岡山

4. Ritsuko-Kawaharada Nasu, Tomoko Kohama, Akio Nakamura, Eric R Blough and Kazuhiro Kohama, Insulin signaling of diabetic mother rats and their offspring, 日本薬理学会 Journal of Pharmacological Sciences 112(supple1)p, 151, 2010.3 大阪

5. 河原田(那須)律子, 小濱智子, 糖尿病親ラットから生まれた仔におけるインスリンシグナル変化に伴う抵抗性の検討, 日本糖尿病・妊娠学会, 2009.11 三重

6. 河原田(那須)律子, 小濱智子, 糖尿病妊娠ラットの食餌の違いにおけるインスリンシグナルの影響, 第 53 回日本糖尿病学会, 糖尿病 52 :supple1-320, 2009.5 大阪

7. Ritsuko-Kawaharada Nasu, Akio Nakamura, Sunil Kakarla, Eric Blough and Kazuhiro Kohama, Tomoko Kohama, Effect of a high-fat diet on diabetic mother rats and their offsprings and insulin signaling., American Society for Cell Biology, 2008.12 Sanfrancisco

8. 河原田(那須)律子, 小濱智子, 高脂肪餌摂取による糖尿病妊娠ラットの仔へのインスリンシグナル変化, 日本糖尿病学会, 糖尿病 51 :supple 140, 2008.5 東京

9. 河原田(那須)律子, 中村彰男, 小濱一弘, 小濱智子, 糖尿病妊娠ラットとその仔における高脂肪食の影響, 日本薬理学会, Journal of Pharmacological Sciences 106:supple1,p 249, 2008 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小濱 智子(KOHAMA TOMOKO)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号 : 00364703

(2) 研究分担者

河原田 律子(KAWAHARADA RITSUKO)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助教

研究者番号 : 60383147