

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22700760

研究課題名(和文) 糖尿病妊娠ラットの網羅的遺伝子解析とプロテオミクス - 魚油は疾患を改善出来るか -

研究課題名(英文) Effect of EPA on Cardiac Muscle Cells of Infants of Diabetic Mother Rats.

## 研究代表者

河原田 律子(那須律子)(KAWAHARADA, Ritsuko)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助教

研究者番号：60383147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病を合併した母親から生まれた子供への影響を検討してきたところ、妊娠期の食事が胎児に著しい影響を与えることが分かってきた。本研究では、心疾患に効果があるエイコサペンタエン酸(EPA)を与え検討を行った。その結果、糖尿病ラットから生まれた子供では血糖値などの生化学的所見は正常であったが、心臓においてシグナル異常が認められた。しかし、母親が妊娠期にEPAを摂取することにより、シグナル異常を改善することが示された。さらに、網羅的遺伝子解析及びタンパク質の糖化解析を行った結果、EPAは胎児期の子供の心臓の糖化の抑止および抗酸化防御機構の発現によりこれらのシグナル異常を改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that IDMs possessed abnormalities in insulin signaling and a fish oil-rich maternal diet improves cardiac Akt-related insulin signaling. In this study, we investigated the specific component in fish oil that was responsible for improving insulin signaling in primary cardiac muscle cells (PCMCs). Pregnant diabetic rats were fed via gastric tube eicosapentaenoic acid(EPA group) or a control DDW (control). To examine changes in insulin signaling in the cardiac muscle in IDM, we isolated the heart and cultured PCMCs. The insulin signalling of the heart of IDM decreased, insulin resistance was induced. However, the impaired signalling has been improved by EPA medication during a diabetes mother's pregnancy. The protein of the heart of IDM exposed to hyperglycemia was saccharified highly. The EPA in the fish oil may improve the impaired signaling pathway of the cardiac muscle of infants caused by a diabetic mother's hyperglycemia.

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：食と栄養 糖尿病 妊娠

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性の強い疾患の大半は、親のゲノム情報が子孫に伝わることにより発症すると考えられている。しかし、研究代表者はストレプトゾトシン処理により人工的に糖尿病を発症させた糖尿病妊娠モデルラットを用いた研究により、生まれた仔と孫にも糖尿病の特徴が現れるということを発見した。特に孫において、母体が全く正常であるにも関わらず糖尿病の特徴が出現し、まさにエピジェネティックによる何かが子孫に伝わっている可能性がある事を報告した(Nasu et al., Endocrine J 2007)。そこで、本研究ではこの糖尿病妊娠モデルラットを利用して、全遺伝子およびマイクロ RNA の網羅的発現プロファイリングを行う。更にゲノムのエピジェネティクス解析から、どのような作用機序で子孫に糖尿病の影響が伝わるか?を調べる。また、我々は魚油が糖尿病モデルラットにおいて、血糖値や中性脂肪を下げる効果があることを発見した。そこで、魚油が糖尿病疾患を改善する可能性を示す予備実験から、魚油に含まれる脂肪酸に関して、どのような脂肪酸がどのような作用機序で働くかを分子生物学的アプローチで挑む。

## 2. 研究の目的

糖代謝異常妊娠では母体に様々な合併症が生じるが、とりわけ、肥大型心筋症は糖尿病母体から生まれた子供(IDM)の40%にみられる。IDMの心筋肥厚は一過性で生後6ヶ月頃までには自然軽快する場合が多いが、中には死亡例の報告もある。現在、IDMに関する心疾患の臨床研究は数多く報告されているが、分子レベルでの研究はほとんど検討されていない。そこで、胎児期に高血糖に暴露される妊娠糖尿病モデルラットを作成して、生まれた子供の心臓のインスリグナリングを解析し、心疾患に関連した分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。さらに妊娠期の母親の食事が、子供に大きな影響

を与えることが報告されていることから、心疾患などに効果があると報告されている n-3 系不飽和脂肪酸を多く含むエイコサペンタエン酸(EPA)を、妊娠期に糖尿病母ラットに投与し、生まれた子供の心臓への影響を調べた。

## 3. 研究の方法

動物は、妊娠1日目の Wistar ラット(200~250g、日本クレア)を使用し、糖尿病妊娠ラットを作成した。妊娠4日目に STZ(ストレプトゾトシン、Sigma)を尾静脈投与することにより妊娠糖尿病ラットを作成した。

妊娠糖尿病ラットに、妊娠期間、n-3 系不飽和脂肪酸を含む魚油あるいは飽和脂肪酸を含むラードを投与し、生まれた仔への影響を検討した。次に、魚油の成分である EPA を経口投与し検討を行った。血糖値と血清脂質は、心臓より全採血し血清を用いて検討した。また、ラットの新生仔心臓は出生4日目に1群あたり12~15匹より摘出し、タンパク質を抽出した。抽出した全蛋白質を SDS 電気泳動後、ニトロセルロース膜にブロットし、Akt に関連したインスリグナル伝達系に関わる種々のタンパク質の抗体を用いて、ウェスタンブロット法により解析を行った。さらに、生後24時間以内に取り出した心臓より培養した初代心筋培養細胞を用いて、同様にインスリグナ伝達系の解析を行った。高血糖によるタンパク質の糖化(AGEs; Advanced glycation end products)を検討するために、抗 AGEs 抗体を用いて解析した。

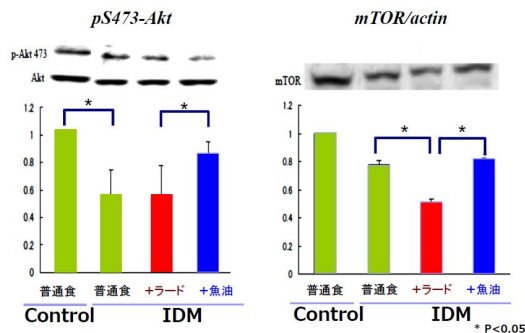
全 RNA は RNAeasy Plus(Qiagen 社)にて精製した。網羅的遺伝子解析は東レの 3-D Gene Human Oligo chip 25k チップを用いて単色法でラベルし、それぞれの群の遺伝子変動の比較はグローバル・ノーマライゼーション補正方法により行った。更に得られた変動遺伝子データを用いてパスウェイ解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)仔ラットの心臓における母親の魚油摂取の効果

生後1日目の仔ラットの血糖値は、コントロールラットと比較して有意に高値を示したが、生後2日目には正常値まで低下した。血清脂質は、ラード食を投与した仔ラットでは、普通食と比較して高値を示したのに対し、魚油では低値を示した。

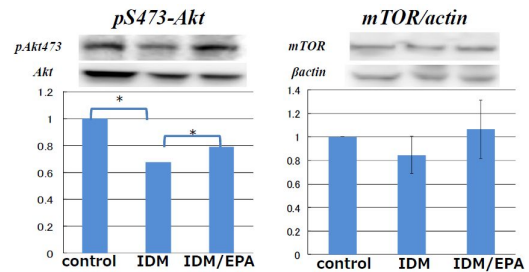
血糖値が正常値まで低下した生後4日目の心臓においてインスリンシグナルを検討したところ、Aktのリン酸化レベル(Akt Thr308とAkt Ser473)の低下や上流にあるmTORやPDK1のキナーゼの発現量の低下が示され、分子レベルではインスリン抵抗性が惹起された事を明らかにした。さらに、MAPキナーゼシグナル伝達系のJNK、ERKについては、IDMにおいてリン酸化レベルの増加が観察された。しかし、魚油を投与した群では、ラード群と比較してAktのリン酸化レベルやmTORの発現量が増加し、インスリン抵抗性の改善が示された。



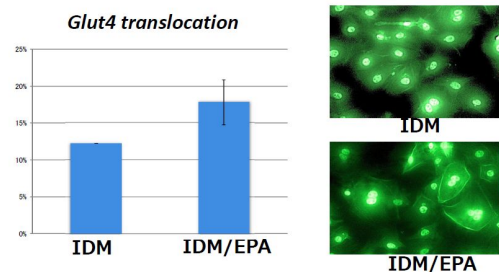
### (2)仔ラットの心臓における魚油に含まれるEPAの効果

魚油を投与した糖尿病母ラットから生まれたIDMの心臓において、Aktに関連したインスリンシグナリング異常が改善されたことから、魚油の成分であるEPAの効果を検討した。Aktのリン酸化レベルとAktの上流にあるmTORの発現量は、コントロールラットより低下したが、EPA投与により増加した。また、インスリン応答性のAkt経路への負のフィードバックがあるpRaptorのリン酸化レベルと発現量はコントロールと比較して低

下したが、妊娠期にEPAを投与した群では増加した。pFOXOのリン酸化レベルはコントロールと比較して低下した。



これらの生れた子供(IDM)から単離した初代心筋培養細胞においても、同様にAktのリン酸化レベルとmTORの発現量がEPA投与により増加した。Glut4のトランスロケーションは阻害されたが、母親のEPA摂取によりそれが改善した。さらにIDMの心臓のタンパク質において糖化は亢進したが、EPA摂取によりその糖化は抑制された。



また、網羅的遺伝子解析では心肥大、脂質代謝及び糖代謝に関わる遺伝子群が大きく変動しており、とりわけパスウェイ解析では抗酸化防御機構に関わるKeap1-NRF2シグナル経路が有位に惹起されている事が明らかになった。

これまで糖尿病に関してAktやMAPキナーゼに関連するインスリンシグナルの異常が報告されているが、糖尿病の母親から生れた子供の心臓への影響を分子レベルで検討した研究はほとんど行われていない。今回の結果では、糖尿病の親から生れた子供では、血糖値や血清脂質に異常が認められないにも関わらず、心臓においてインスリンシグナルの異常が認められ、インスリン抵抗性が惹起

されていた。これらのシグナル異常は、糖尿病の合併症である肥大型心筋症でも認められることが報告されている。

しかし、動脈硬化症をはじめ、糖尿病や炎症性疾患、心不全の予防効果が報告されている魚油を妊娠中に母親が摂取することで、インスリン抵抗性が改善することを明らかにした。さらに、魚油の主な成分であり循環器疾患の医薬品としても使用されている EPA について検討したところ、魚油と同様にインスリン抵抗性の改善が認められた。心臓より単離した初代心筋培養細胞においても、IDM ではインスリン抵抗性が惹起されていたが、EPA 摂取によりグルコースの取り込みが改善されていることが明らかになった。また、糖尿病などで、慢性の高血糖が続くことで AGEs の生成が促進すが、IDM においても AGEs 化が進行していることも明らかとなった。これは子宮内が長期間に渡り高血糖に曝されることで、タンパク質が糖化修飾と化学的架橋による複合体形成により、その機能を失っている可能性が示唆された。しかし、妊娠期の母親が EPA の摂取することにより、この AGEs 生成は抑制され、正常の母親から生れてくる仔の同程度になることが明らかになった。また DNA パスウェイ解析の結果、EPA の投与により、抗酸化防御機構で重要な働きをしている Keap1-NRF2 シグナル系が惹起されている事は、親が摂取した EPA が子供の心臓においても抗酸化防御機構を発現していることを示し、非常に興味深い。

分子レベルにおけるインスリンシグナル伝達系の解析により、EPA が糖尿病に関連するシグナル伝達経路やストレス抗酸化に関わる MAP キナーゼシグナル経路を改善する可能性が示された。糖尿病の母親が胎児期に摂取する脂質の違いが、次世代の子供の将来の健康の改善や合併症の予防に寄与している可能性を示した事は、今後の循環器疾患の研

究に新たな知見を提供できると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

A maternal diet rich in fish-oil may improve cardiac Akt-related signaling in the offspring of diabetic mother rats. R Nasu-Kawaharada, A Nakamura, S Kakarla, E Blough, K Kohama, T Kohama, *Nutrition*, 2013, 29, 688-692

DOI : // 10.1016/j.nut.2012.11.017.

### 〔学会発表〕(計7件)

Effect of EPA on cardiac muscle cell of infants of diabetic mother rats, Ritsuko Kawaharada, Haruna Masuda, Akio Nakamura, International diabetes federation (IDF), 2013.12, Melbourne

糖尿病ラットにおける妊娠期の EPA 摂取が仔へ及ぼす影響、河原田律子、増田春菜、中村彰男、日本糖尿病学会、2013.5、熊本

Effect of EPA on skeletal and cardiac muscle of infants of diabetic mother rats. Ritsuko Kawaharada, Akio Nakamura, *Journal of Pharmacological Sciences* 121(supple1), 2013.3, 福岡

EPA を投与した糖尿病妊娠ラットから生まれた仔への影響、河原田律子、増田春菜、中村彰男、小浜智子、日本糖尿病・妊娠学会、2012.11、東京

妊婦の栄養指導教材に関する検討、大友崇、篠崎博光、河原田律子、小浜智子、日本糖尿病・妊娠学会、2012.11、東京

Effect of fish-oil diet on heart of infant of diabetic mother rats, Tomoko Kohama, Ritsuko Kawaharada, Akio Nakamura, Kazuhiro Kohama, Diabetes Pregnancy Sstudy Group (DPSG), 2012.10,

France

高血糖の妊娠ラットが EPA を摂取した場合に生まれた仔へ与える影響、日本糖尿病学会、河原田律子、中村彰男、小浜智子、2012.5、札幌

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

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