

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462558

研究課題名(和文) 子宮内環境の世代を超えたメタボリック症候群発症への関与と新たな治療標的の検討

研究課題名(英文) Potential role of environment in utero on obesogenic and diabetogenic trait and a novel therapeutic target

研究代表者

増山 寿(Masuyama, Hisashi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30314678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：母体肥満下の子宮内環境により肥満や耐糖能関連遺伝素因が世代を超えて伝わるメカニズムを解明し、抗肥満・抗糖尿病受容体CARを標的とした治療法の可能性を検討した。高脂肪食飼育妊娠マウスからの出生仔は成長に伴い過体重、血圧上昇と耐糖能異常が発現し、アディポサイトカイン遺伝子promoter領域のエピゲノム変化を認めた。CARの活性化は母体への抗肥満・抗糖尿病作用を示し、出生仔のエピゲノム変化を抑え成長後のメタボリック症候群発症を抑制した。母体肥満下の子宮内環境は、アディポサイトカイン遺伝子エピゲノム変化を介して世代を超えてメタボリック症候群発症に関与している。CARは治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Obesity and insulin resistance in the mother might play a direct role in the transmission of an obesogenic and diabetogenic trait from generation to generation, but the role of genes and a shared environment are not completely understood. We observed that a high fat diet induced obesity in pregnant mice resulted in hypertension, proteinuria, and macrosomia with insulin resistance and abnormal adipocytokine levels and that the exposure to a high fat diet in utero might lead to a metabolic syndrome-like phenomenon through epigenetic modifications of the genes encoding adipocytokines, adiponectin and leptin in the offspring. We also demonstrated that activation of constitutive androstane receptor ameliorated the glucose metabolism in both mothers and adult offspring. Epigenetic changes of adipocytokine genes might play important roles in the origin of metabolic syndrome in adulthood of offspring and constitutive androstane receptor might be a potential therapeutic target.

研究分野：周産期

キーワード：肥満 子宮内環境 次世代への影響 メタボリック症候群 アディポサイトカイン 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

- (1) 母体肥満は世代を超えてメタボリック症候群や生活習慣病発症に關与する

本邦において MS は予備軍を含めると 2000 万人に上ると考えられており、国民病として様々な対策が講じられているが増加の一途をたどっている。母体の肥満は GDM や PIH といった妊娠合併症や胎児過剰発育をもたらすだけでなく、成長した児の肥満や MS 発症リスクを増加させ、更に糖尿病発症増加に關与していることが知られている。即ち母体肥満や高血糖下の子宮内環境は、肥満や耐糖能關連遺伝素因が世代を超えて伝わる継代的な影響において重要な役割を果たしている可能性がある。

- (2) MS の病態におけるアディポサイトカイン (AC) の重要性

近年の研究により脂肪組織は最大の内分泌器官として知られるようになり、脂肪細胞から分泌される AC は様々な病態に關与していることが知られている。肥満による内臓肥満の蓄積はアディポネクチン、レプチンなどの AC 分泌異常を認め動脈硬化、インスリン抵抗性 (IR) などを惹起し高脂血症、高血圧、糖尿病などの MS 病態形成の基盤を成している。我々は、PIH は胎盤由来血管新生因子の不均衡による血管内皮障害が病態の本質であるが、肥満妊婦では AC 異常、IR 亢進が病態に深く關与していることを報告してきた (BJOG, 2010)。このことは PIH に子宮内で暴露した児は将来 MS を罹患し易いという疫学結果をある程度説明出来る可能性がある。

- (3) AC 遺伝子のエピゲノムの変化が肥満や耐糖能異常発症に關与

ゲノムのエピジェネティックな制御 (エピゲノム) とは、DNA 塩基配列の変化を伴うことなく DNA のメチル化やヒストンタンパク質の修飾などクロマチンの化学修飾を介した遺伝子発現の制御であるが、近年子宮内環境に適應するためのエピゲノムの変化が、耐糖能異常、肥満、炎症や神経変性などの様々な疾患の病態に關与している可能性が報告されている。我々のこれまでの検討では、高脂肪食飼育妊娠マウスでは肥満、血圧上昇、耐糖能異常、脂質・AC 異常及び胎仔過体重を呈すること (Mol Cell Endocrinol, 2012)、出生仔は出生後早期より血中脂質・AC 濃度異常、脂肪組織での AC 遺伝子発現異常を認め、成長に伴い過体重、血圧上昇と耐糖能異常が発現し、AC 遺伝子 promoter 領域のヒストンアセチル化とメチル化 (H3K9, H4K20) に変化を認めたと報告してきた (Endocrinology, 2012)。この結果は子宮内環境による AC 遺伝子エピゲノム変化が児成長後の MS 発症リスクを増加させることに深く關連している可能性がある。

- (4) 抗肥満・抗糖尿病受容体 Constitutive androstane receptor (CAR)

脂溶性リガンドにはそれぞれ特異的な核

内受容体が存在し、標的 DNA 配列に結合し遺伝子発現を制御している。更に受容体の構造類似性から cloning されたりリガンド未知のオーファン受容体の中で薬物・ステロイド代謝酵素やトランスポーターなどを標的遺伝子として薬物や環境ホルモンなどの外因性物質や過剰な内因性物質に対応する Xenobiotics 受容体が報告されている。我々はこれまでに Pregnane X receptor について、環境ホルモン作用への關与や子宮体癌組織での薬物耐性への關与と治療標的として検討してきた (Mol Endocrinol, 2000, J Clin Endocrinol Metab, 2003, Mol Endocrinol, 2005, Mol Pharmacol, 2007)。更に抗肥満・抗糖尿病受容体として報告された CAR が妊娠中の IR 改善の治療標的となるか検討し、妊娠マウスでは糖新生・脂質合成律速酵素発現の増加と IR の亢進を認めるが、CAR のリガンドとして知られる TCPOBOP 投与により非妊娠時レベル近くまで IR を抑制し、また *in vitro* 実験ではリガンドの存在下で CAR 結合配列に糖新生促進転写因子の集積を認め、このことが糖新生抑制を惹起する可能性を示した (J Mol Endocrinol, 2011)。また CAR リガンド投与により、高脂肪食飼育妊娠マウスの IR や AC 分泌異常、更に母獣血圧、蛋白尿の症状を改善し、胎仔の過剰体重増加を抑制することも報告してきた (Mol Cell Endocrinol, 2012)。これらの結果は CAR が母仔への治療標的となる可能性を示している。

2. 研究の目的

これまでの結果を踏まえて本研究では、

- (1) 高脂肪食飼育肥満妊娠マウスを用いて母体肥満・耐糖能異常下の子宮内環境が出生仔の MS 発症に關与するか、またいかなる代謝エピゲノムの変化を介しているか、AC を中心に糖・脂質代謝律速酵素や關連転写因子などについて検討する。可能であれば孫世代への影響も検討したい。
- (2) 抗肥満・抗糖尿病作用の報告されている核内受容体 CAR のシグナリング活性化が母体、胎仔、出生仔の糖代謝、脂質代謝を改善し、出生仔の MS 発症を抑制し、治療標的となりうるか作用機序も含めて詳細に検討する。

これらの検討により母体肥満・耐糖能異常下の子宮内環境により肥満や耐糖能關連遺伝素因が世代を超えて伝わるメカニズムを *in vivo* で解明すると共に、CAR を標的とした治療法の可能性とその作用機序を検討し新たな治療戦略の開発へと研究を進めることを目的としている。

3. 研究の方法

実験 . 高脂肪食飼育子宮内環境が世代を超え MS 発症に影響するメカニズムの検討

高脂肪食飼育および通常食飼育妊娠マウスを用いて、

- (1) 高脂肪食飼育の母体及び出生仔(生後 2, 12, 24, 36 週)の血圧, 耐糖能(糖負荷試験, インスリン負荷試験), 脂質代謝(トリグリセリドなど脂質濃度)や AC(アディポネクチン, レプチン濃度など)分泌への影響を検討する。体組成分析装置(EcoMRI-100)を用いて体組成を測定し脂肪率の変化を検討する。
- (2) 肝臓や脂肪組織での糖・脂質代謝律速酵素(PEPCK, G6Pase, SREBP-1, SCD-1 など)や AC 遺伝子発現の変化を検討する。
- (3) 関連する糖・脂質代謝律速酵素や関連転写因子(FoxO1, HNF4α など)及び AC 遺伝子のエピゲノムの変化(DNA メチル化, ヒストン修飾)をクロマチン免疫沈降法やメチル化 DNA 濃縮後のマイクロアレイなどを用いて詳細に検討する。
- (4) 高脂肪食暴露時期や授乳(通常食, 高脂肪食飼育産褥マウス)の出生仔への影響を調べる。
- (5) 出生仔の飼育を継続し高脂肪食飼育子宮内環境が孫世代に影響を及ぼすか, エピゲノム変化が保存されるかどうか検討する。

実験 . Invitro での代謝エピゲノム変化の分子メカニズムの検討

マウス肝臓由来細胞を用いて

- (1) 高血糖, 高脂質培養の糖・脂質代謝律速酵素や関連転写因子及び AC 遺伝子発現及びそれら遺伝子エピゲノムへの影響を検討する。
- (2) DNA メチル化酵素やヒストン修飾酵素の発現の変化を検討し代謝エピゲノム変化のメカニズムを解明する。

実験 . 抗肥満・抗糖尿病受容体 CAR のリガンド投与の母体及び子孫への影響

高脂肪食飼育および通常食飼育妊娠マウスに対して CAR リガンドを投与し、

- (1) 母体及び出生仔(生後 2, 12, 24, 36 週)の血圧, 耐糖能, 脂質代謝, AC 分泌, 体組成への影響を検討する。
- (2) 肝臓や脂肪組織での糖・脂質代謝律速酵素, AC 遺伝子発現の変化を検討する。
- (3) 関連する糖・脂質代謝律速酵素や関連転写因子及び AC 遺伝子のエピゲノムの変化(DNA メチル化, ヒストン修飾)を検討する。
- (4) CAR リガンドの投与時期(妊娠初期, 中期, 後期や授乳中)による出生仔の糖・脂質代謝律速酵素や関連転写因子及び AC 遺伝子発現やそれら遺伝子のエピゲノムへの影響を調べる。
- (5) 出生仔の飼育を継続し CAR リガンド投与の有無が孫世代に影響を及ぼすか, エピゲノム変化が保存されるかどうか検討する。

4 . 研究成果

母獣は肥満, 血圧上昇, 耐糖能異常, 脂質・AC 異常及び胎仔過体重を呈した。出生仔は出生後早期より脂肪組織 AC 遺伝子発現や血中脂質・AC 濃度異常を認め, 成長に伴い肥満, 血圧上昇と耐糖能異常が発現した。また新生仔 AC 遺伝子 promoter 領域のヒストンアセチル化とメチル化に変化を認めた。更に授乳期母体 HFD 飼育は出生仔のレプチンサージを変化させ肥満・耐糖能異常発症に相加的に影響した。HFD 飼育は複数世代にエピゲノム変化を伴う影響を認め, 3 世代に渡る通常食飼育により肥満・糖尿病素因が消失した。

HFD 飼育による子宮内環境悪化は AC 遺伝子のエピゲノム変化を介して数世代に渡り児成長後の肥満・耐糖能異常発症リスク増加に深く関与すると考えられた。授乳期栄養もレプチンサージを介して影響する可能性が示された。

妊娠マウスでは糖新生・脂質合成律速酵素発現の増加と IR の亢進を認めるが, CAR のリガンドとして知られる TCPOBOP 投与により非妊娠時レベル近くまで IR を抑制し, また in vitro 実験ではリガンドの存在下で CAR 結合配列に糖新生促進転写因子の集積を認め, このことが糖新生抑制を惹起する可能性を示した。また CAR リガンド投与により, 高脂肪食飼育妊娠マウスの IR や AC 分泌異常, 更に母獣血圧, 蛋白尿の症状を改善し, 胎仔の過剰体重増加を抑制した。

CAR は出生仔の MS 発症抑制の治療標的となり得る可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 40 件)

N. Suzumori, H. Masuyama, M, et al: Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. J Hum Genet. 2016 Mar 17. [Epub ahead of print] 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2016.25.

K. Hayata, Y. Hiramatsu, H. Masuyama, E. Eto, E. Nobumoto, T. Mitsui: The Creation of a Cerebellar Diameter Reference Standard and its Clinical Application to the Detection of Cerebellar Hypoplasia Unique to Trisomy 18. J Obstet Gynecol Res 41(12): 1899-1904, 2015. 査読有
DOI: 10.1111/jog.12814

M. Sawada, H. Masuyama, K. Hayata, Y. Kamada, K. Nakamura, Y. Hiramatsu: Pregnancy complications and glucose intolerance in women with polycystic ovary syndrome. Endocrine J 62 (11): 1017-1023, 2015. 査読有
DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0364

T. Mitsui, H. Masuyama, E. Eto, E. Nobumoto, K. Hayata, Y. Hiramatsu: Different Fetal and Neonatal Growth

between Early- and Late-onset Preeclampsia. *Open J Obstet Gynecol* 5: 516-521, 2015. 査読有
DOI: 10.4236/ojog.2015.59074
E. Nobumoto, H. Masuyama, Y. Hiramatsu, T. Sugiyama, H. Kusaka, N. Toyoda: Effect of the New Diagnostic Criteria for Gestational Diabetes Mellitus Among Japanese Women. *Diabetology International* 6(3): 226-231, 2015. 査読有
DOI: 10.1007/s13340-014-0193-8
H. Masuyama, T. Mitsui, E. Nobumoto, Y. Hiramatsu: The effects of high-fat diet exposure in utero on the obesogenic and diabetogenic traits through epigenetic changes in Adiponectin and Leptin gene expression for multiple generations in female mice. *Endocrinology* 156(7): 2482-91, 2015. 査読有
DOI: 10.1210/en.2014-2020
S. Inoue, H. Masuyama, Y. Hiramatsu: Efficacy of Transarterial Embolisation in the Management of Postpartum Haemorrhage and its Impact on Subsequent Pregnancies. *ANZJOG* 54: 541-545, 2014. 査読有
DOI: 10.1111/ajo.12228
H. Masuyama, Y. Hiramatsu: Additive Effects of Maternal High Fat Diet during Lactation on Mouse Offspring. *PLoS ONE* 9(3): e92805, 2014. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0092805
T. Sugiyama, H. Metoki, H. Hamada, H. Nishigori, M. Saito, N. Yaegashi, H. Kusaka, R. Kawano, K. Ichihara, I. Yasuhi, Y. Hiramatsu, N. Sagawa; H. Masuyama as a collaborator in Japan Gestational Diabetes Study Group: A retrospective multi-institutional study of treatment for mild gestational diabetes in Japan. *Diabetes Res Clin Pract.* 103(3): 412-418, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.diabres.2013.12.017
S. Inoue, H. Masuyama, T. Akagi, Y. Hiramatsu: Pregnancy and delivery in patients with Fontan circulation; a report of 2 cases. *J Obstet Gynecol Res* 39(1): 378-382, 2013. 査読有
DOI: 10.1111/j.1447-0756.2012.01910

[学会発表](計116件)

牧 耐太, 平野友美加, 玉田祥子, 光井 崇, 早田 桂, 増山 寿, 平松祐司, 杉山 隆, 豊田長康、<ワークショップ>妊娠初期診断 GDM の特徴と診断における有用性と意義“JAGS trial による再検討”、第 31 回日本糖尿病・妊娠学会、リーガロイヤルホテル東京(東京都、新宿区)

2015 年 11 月 20 日

増山 寿、<シンポジウム>妊娠と糖尿病ー内科と産婦人科それぞれの立場からーGDM のフォローアップと次世代への影響、第 58 回日本糖尿病学会、海峡メッセ下関(山口県、下関市)、2015 年 5 月 21 日

平野友美加, 光井 崇, 洪川昇平, 衛藤英理子, 延本悦子, 早田 桂, 瀬川友功, 増山 寿, 平松祐司、<ワークショップ>GDM に対する SMBG の保険適応拡大に向けて、第 30 回日本糖尿病・妊娠学会、長崎ブリックホール(長崎県、長崎市)、2014 年 11 月 28 日

増山 寿, 平松祐司、<シンポジウム>周産期におけるアディポサイトカインの動態と病態生理への関与、第 38 回日本産科婦人科栄養・代謝研究会 広島プリンスホテル(広島県、広島市)、2014 年 8 月 21 日

[図書](計15件)

増山 寿: 76 妊婦糖尿病 周産期医学必修知識(第8版) 東京医学社、2016 (印刷中)

増山 寿: 102 巨大児 周産期医学必修知識(第8版) 東京医学社、2016 (印刷中)

増山 寿: 8 妊娠高血圧症候群 - 産科婦人科疾患最新の治療 2016-2018, 吉川史隆, 倉智博久, 平松祐司編, 南江堂, 東京, pp84-85, 2016

増山 寿: 産後の管理 9. 妊娠糖尿病があったらどれくらいの割合で将来糖尿病になるのですか? 妊婦の糖代謝異常 診療・管理マニュアル、日本糖尿病・妊娠学会編、メジカルビュー社、pp165-166, 2015

増山 寿: 産後の管理 産後の管理 10. 妊娠糖尿病患者が次回妊娠で妊娠糖尿病を繰り返す頻度は? 妊婦の糖代謝異常 診療・管理マニュアル、日本糖尿病・妊娠学会編、メジカルビュー社、pp167-168, 2015

増山 寿, 平松祐司: 2 基礎研究の進歩「妊娠と糖尿病」母児管理のエッセンス, 難波光義, 杉山 隆編, 金芳堂, 京都, pp91-95, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増山 寿 (MASUYAMA Hisashi)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・産科婦人科学・准教授

研究者番号: 30314678

(2) 研究分担者

平松 祐司 (HIRAMATSU Yuji)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・産科婦人科学・教授

研究者番号: 80218817