

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670491

研究課題名(和文) 環境要因としての糖尿病がもたらす先天異常の分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular etiology of congenital anomalies caused by diabetes as an environmental factor

研究代表者

目野 主税 (Meno, Chikara)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20311764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠前糖尿病では、胎児・新生児に先天異常の発症リスクが高まることが疫学調査から明らかになっている。しかしながら、そのような先天異常が引き起こされる分子機構の理解は不十分である。本研究では、妊娠前糖尿病において内臓錯位の発症リスクが亢進する現象に着目し、マウスにおいて高血糖が胚の左右軸形成に及ぼす影響を解析した。ストレプトゾトシン誘発の糖尿病マウスを用いた解析、及び高濃度グルコースの全胚培養によって、高濃度グルコースは左側側板中胚葉におけるNodal-Pitx2発現を阻害することが明らかになった。ヒト妊娠前糖尿病における右側相同は、このメカニズムによって説明できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Epidemiology has revealed that the risk of congenital anomalies is increased in offspring born from mothers with pregestational diabetes. The etiology of such congenital anomalies remains largely unknown, however. In this research, we examined the effect of hyperglycemia on left-right axis formation in mouse embryos, since pregestational diabetes increases the risk of heterotaxia in human. By analyzing streptozotocin-induced diabetic mice and embryos cultured in high glucose medium, we found that high glucose concentration inhibits the establishment of Nodal-Pitx2 expression in left lateral plate mesoderm. Right isomerism in human pregestational diabetes may be explained by this mechanism.

研究分野：発生生物学

キーワード：糖尿病 先天性心疾患 内臓錯位 左右軸

1. 研究開始当初の背景

ヒトでは約3%の新生児が先天異常を伴って出生すると報告されている。その原因の半数以上が不明であるが、染色体異常や遺伝子変異の「遺伝的要因」のみならず、「環境要因」が先天異常の発生に大きく関与することが知られている。母体の糖尿病は環境要因の一つであり、各国における疫学調査から、糖尿病に罹患した女性が妊娠する「妊娠前糖尿病」では、様々なタイプの先天異常が発生するリスクが亢進することが明らかになっている。世界的に糖尿病の罹患数が増加している現状を踏まえると、糖尿病による先天異常の発生メカニズムを理解し、これを予防することは大きな課題である。

妊娠前糖尿病は、中枢神経系の異常、先天性心疾患、骨格系の異常等に関連することが報告されている。このような先天異常の発生は母体の血糖レベルと相関しており、妊娠前から血糖値を厳密にコントロールできている1型及び2型糖尿病患者においては、先天異常の発生率を低く抑えられることが知られている。マウスやラットを使用した実験では、高濃度グルコースや糖尿病時の酸化亢進により発生するケトン体 β -ヒドロキシ酪酸が、催奇形を有することが報告されている。

従来、糖尿病における先天異常発症のメカニズムに関しては、高血糖による酸化ストレスに着目した解析が多かった。酸化ストレスは神経上皮や神経堤細胞のアポトーシスを引き起こし、その結果、神経管閉鎖不全や心臓形成においては動脈幹中隔形成異常が発生することになる。ただし、糖尿病によって発生する先天異常の種類は多様であり、これらが単純に酸化ストレスに伴うアポトーシスで説明できるとは考え難い。

妊娠前糖尿病で発症リスクが亢進する先天異常の一つに内臓錯位がある。内臓錯位は臓器形態の左右性に異常があることを意味し、左側相同(右側の形態が左側化する)や右側相同(左側の形態が右側化する)を含む。内臓錯位は様々な先天性心疾患を伴うことが多い。1型糖尿病のモデルマウス(NOD)を用いた解析では、ヒトと同様に糖尿病雌マウスの胎仔には内臓錯位の発生が報告されているが、何故このような特徴的な形態異常が出現するのかは不明であった。

内臓の左右非対称形態は、初期胚に確立される左右軸の位置情報に基づいて形成される。マウスでは、初期胚ノードにおける一次繊毛回転軸の後方への傾斜によって左向きの水流が発生し、これが局所的な左右非対称な遺伝子発現に繋がる。ノードに生じた左右非対称性は、続いて側板中胚葉における左右の遺伝子発現の差異に拡張され、この情報をもとに各臓器は左右非対称な形態形成を行う。左右軸形成のプロセスと、これに関与する主要な遺伝子は大方同定されており、糖尿病が内臓錯位を誘発するメカニズムを解明

するための準備は整っていた。

2. 研究の目的

ヒトにおいて妊娠前糖尿病が内臓錯位の発生に繋がるメカニズムを解明するため、糖尿病モデルマウスと高濃度グルコース培地を用いたマウス全胚培養の系で左右軸形成を解析した。これまでの先天異常発症メカニズムの解析では酸化ストレスによるアポトーシスに焦点が当てられてきたが、左右軸形成カスケードに着目することで妊娠前糖尿病に見られる多様な先天異常を理解する端緒となることを期待した。

3. 研究の方法

ICR系統の雌マウスを同系統の雄マウスと交配させ、3.5dpc(days post coitus)の雌マウスにストレプトゾトシンを腹腔投与することによって糖尿病を誘発した。6.5dpcまでは自由摂食とし、6.5dpc以降は1日当たり5gの餌(オリエンタル酵母CR-LPF)を与え、7.5dpc以降は5%グルコース溶液を給水に使用した。8.7dpcで胚を回収し、形態観察及び*Pitx2*発現の解析に供した。

ICR系統の雌マウスを同系統の雄マウスと交配させて7.75dpc胚を回収し、全胚培養に供した。培地は75%ラット血清+25%DMEMをベースにD-glucoseを添加し、高濃度グルコース培地とした。初期体節期もしくは9.25dpc相当まで胚を発生させて、形態観察、遺伝子発現解析及び免疫染色に供した。

4. 研究成果

ストレプトゾトシン投与による糖尿病雌マウスから8.7dpc胚を回収し、心臓ルーピングと胚ターニングの方向性に関して左右非対称性を評価した。胚回収の時点で血糖値が490mg/dL以上の個体で、心臓ルーピングの左右非対称性が逆転した胚が出現した($n=6/10$)。この6個体から回収された胚のうち、心臓ルーピングの発生ステージに達していた66匹の胚を評価すると、11匹で心筒が通常(d-loop)と反対の方向(l-loop)に屈曲していた。また、胚ターニングの発生ステージに達していた52匹を評価すると、7匹でターニングの方向が左右逆転していた。以上の結果から、重度の糖尿病雌マウスでは胚の左右軸形成が異常になることが示唆された。

心臓ルーピングと胚ターニングの方向性は、これらの現象の直前に左側側板中胚葉で発現する*Nodal*が制御する。*Nodal*発現は一過的であり、心臓ルーピングまでに発現が消失するが、*Nodal*シグナルによって誘導される*Pitx2*は左側側板中胚葉の細胞系譜で発現が持続する。そこで、上述の左右形態異常を示した胚が出現した6個体の同腹仔について、whole mount in situ hybridizationで*Pitx2*の発現を解析した。66匹中8匹の胚で左側側板中胚葉と心臓原基の両者における*Pitx2*発現が消失しており、8匹の胚で左側心臓流出

路のみで *Pitx2* 発現が消失していた。心臓ルーピングと胚ターニングを除く臓器の左右非対称形態形成は *Pitx2* が担っており、*Pitx2* を欠失した変異マウスには、臓器の左側形態が右側化する右側相同の先天異常と共に重篤な先天性心疾患が発生する。従って、ヒト妊娠前糖尿病で胎児に発生する内臓錯位のうち右側相同を伴う先天性心疾患は、同様のメカニズムによって引き起こされる可能性が示唆された。

ストレプトゾトシンによる糖尿病誘発実験では、相当な血糖値に達しないと左右異常が観察されず、また同腹仔においても一部の個体でのみ *Pitx2* 発現に異常を認めたため、高濃度グルコース培地を用いた全胚培養で左右軸形成の解析が可能かどうかを調べることにした。7.75dpc において通常飼育の ICR マウスから回収した胚のうち、頭褶期にあるものを全胚培養で発生させ、高濃度 D-グルコースの影響を解析した。*Pitx2* は D-グルコース濃度依存的に発現消失する個体が増加し、530mg/dL では 16 匹中 12 匹で発現が消失、720mg/dL では 21 匹中 21 匹で発現が消失した。L-グルコースをコントロール培地 (D-グルコース 140mg/dL を含有) に添加し 580mg/dL にした場合、7 匹中 5 匹で正常な *Pitx2* 発現が観察されたことから、高濃度 D-グルコースは浸透圧ではなく催奇形因子として直接的に胚に作用したと考えられる。そこで、D-グルコースを 720mg/dL に調整した培地で全胚培養を行い (以下、高濃度グルコース培地よる培養胚を高グルコース胚と呼称する) 左右軸の解析を進めた。

高濃度グルコース培地で頭褶期の胚を 48 時間全胚培養すると 9.25dpc 相当まで発生が進行した。高グルコース胚の左右非対称性を心臓ルーピングで評価すると、14 匹中 5 匹が d-loop、9 匹が l-loop を示した。胚ターニングを評価すると、14 匹中 7 匹の方向性が左右逆転しており、左右非対称形成がランダム化していることが示唆された。さらに、頭褶期の胚を最初の 14 時間を高濃度グルコースで培養し、その後コントロール培地で全胚培養を継続した場合、やはり心臓ルーピングと胚ターニングの左右非対称性はランダムになっていた。以上の結果から、ヒト妊娠前糖尿病においても胚子が左右軸形成期にある時期に、一過的でも血糖値が逸脱した場合、内臓錯位の先天異常が発生する可能性が示唆された。

胚ターニングと心臓ルーピングの方向性は、左側側板中胚葉に確立される *Nodal* 発現によって規定される。さらに、側板中胚葉の *Pitx2* 発現は *Nodal* シグナルによって誘導されるため、高グルコース胚では *Nodal* 発現が消失していることが予想された。初期体節期まで全胚培養した高グルコース胚の *Nodal* 発現を調べたところ、23 匹中 23 匹で側板中胚葉における *Nodal* 発現が検出されなかった。通常、側板中胚葉における *Nodal* 発現はノ

ド近傍の左側で局所的に開始し、自らの発現を誘導するポジティブループによって発現域が左側側板中胚葉全体に拡張される。高グルコース胚における *Nodal* 発現の消失が、この機構の破綻による結果であるか確認するために、右側側板中胚葉の局所で異所的に *Nodal* を発現させ、側板中胚葉の応答能を調べた。頭褶期胚の右側後方中胚葉に *Nodal* 発現ベクターを局所的にリポフェクションすると、初期体節期において異所発現部位から内在の *Nodal* 発現がポジティブループによって拡張する。高グルコース胚ではコントロール胚同様にトンスフェクト部位を中心とした右側の *Nodal* 発現が観察されたことから、高グルコース胚における *Nodal* 発現の消失はポジティブループの欠如では説明できず、側板中胚葉における最初の *Nodal* 発現誘導に異常を来したことが推察された。

Nodal は側板中胚葉に先立ってノード辺縁の crown 細胞で発現するが、ノードで産生された *Nodal* は恐らく側板中胚葉へと拡散し、そこで *Nodal* 発現を局所的に誘導する。ノードの *Nodal* 活性の制御には、*Nodal* とヘテロダイマーを形成する GDF1、*Nodal* の阻害因子として機能する *Cer12* の発現バランスが重要である。高グルコース胚のノード crown 細胞におけるこれらの遺伝子発現を whole-mount in situ hybridization で調べたところ、*Nodal* 及び *Gdf1* の発現域は狭くなり且つ短縮していた。一方で、*Cer12* 発現も減弱はしていたが、*Nodal* 及び *Gdf1* ほどの発現域の減少は見られなかった。次に、*Nodal* 活性をリン酸化 Smad2 の免疫染色で評価したところ、高グルコース胚では *Nodal* シグナルが大きく減少していることが明らかになった。従って、高グルコース胚ではノード産生の *Nodal* の活性が著しく減弱する結果、側板中胚葉で *Nodal* 発現を誘導できなくなったと考えられる。また、*Nodal* 活性の低下は、*Nodal* 及び *Gdf1* 発現の減少と *Cer12* 発現とのバランスの崩壊で説明が可能かもしれない。

以上、高濃度グルコースは頭褶期から初期体節期にかけてのノードに作用し、ノードの *Nodal* 活性を著しく減少させることが明らかになった。従って、左側側板中胚葉における *Nodal* 発現域が確立されず、同領域における *Pitx2* 発現も誘導されない。心臓ループの方向性はランダムとなり、*Pitx2* 発現を欠くことで、右側相同を伴う先天性心疾患を引き起こすと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Masahiro Hachisuga, Shinya Oki, Keiko Kitajima, Satomi Ikuta, Tomoyuki Sumi, Kiyoko Kato, Norio Wake, Chikara Meno: Hyperglycemia impairs left-right axis formation and thereby disturbs heart morphogenesis in mouse embryos.

Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America,
112 (2015), E5300-7, 査読有り
doi: 10.1073/pnas.1504529112.

〔学会発表〕(計 8 件)

目野 主税、高血糖はマウス胚の左右軸形成
を阻害することで心臓形態形成を攪乱する、
第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日～2014 年 11 月 27 日、「パシフィコ横浜
(神奈川県・横浜市)」

〔その他〕

報道関係情報

https://www.kyushu-u.ac.jp/f/6026/2015_09_09.pdf

<https://yomidr.yomiuri.co.jp/article/20150914-0YTEW50965/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

目野 主税 (MENO, Chikara)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20311764