

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26750054

研究課題名(和文) 高血糖の母親から生まれた仔の心臓におけるエピジェネティクスコードの解析

研究課題名(英文) Intrauterine hyperglycemia-induced inflammatory signalling via the receptor for advanced glycation end products in the cardiac muscle of the infants of diabetic mother rats.

研究代表者

河原田 律子(那須律子)(RITSUKO, KAWAHARADA)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・講師

研究者番号：60383147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中に母親が糖尿病であると子宮内は高血糖状態にさらされ、生まれた子は心血管合併症が発症する確率が高くなる。そこで妊娠期に高血糖を呈する糖尿病妊娠モデルラットを作成し、生まれてくる仔の心臓における影響を検討した。その結果、生まれた仔の心臓では糖化が亢進し、NF- κ BやIL-6などの炎症シグナルが増加することでAktなどのインスリンシグナル異常やGLUT4の膜への取り込みが抑制されており、インスリン抵抗性が起きていることが明らかになった。しかし、糖尿病母ラットが妊娠中にエイコサペンタエン酸を摂取することで、これらの異常が改善されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Gestational diabetes is associated with increased risk to the health of the mother and her offspring. We have previously reported that IDMs showed abnormalities in cardiac Akt-related insulin signalling, and that these deficiencies in Akt-related signalling were attenuated by supplementing the maternal diet with fish-oil. Pregnant diabetic rats were administered streptozotocin before receiving EPA. Insulin resistance as determined by diminished GLUT4 translocation following insulin stimulation, the levels of AGEs and ROS were elevated in the neonatal hearts of IDM/W compared with that seen in the offspring born from non-diabetic control animals. Similarly, the RAGEs mRNA levels, ROS and the amount of NF- κ B mRNA were higher in the hearts from the IDM/W when compared to that observed in the hearts of offspring born to non-diabetic animals. These deleterious effects of gestational diabetes were significantly decreased in the offspring of diabetic mothers receiving EPA supplementation.

研究分野：糖尿病

キーワード：妊娠 エイコサペンタエン酸

1. 研究開始当初の背景

妊娠中に母親が糖尿病であると、子宮内は高血糖状態にさらされる。その結果、胎児は発生段階で酸化ストレスによりインスリン抵抗性が惹起され、心血管合併症が発症する確率が高くなる¹⁾。とりわけ、心血管系の合併症として心筋肥大症が報告されている²⁾。糖尿病母体から生まれた児で見られる心血管系の合併症の臨床報告は数多くあるものの、分子レベルでの機能解明に至る研究はほとんど行われていない。

そこで、我々は妊娠期に高血糖を呈する動物モデルを作成し、妊娠中に母親が高血糖に曝されることで、生まれてくる仔の心臓にどのような異常が見られるかについて分子レベルでの研究に取り組んできた³⁾。また、それらの異常を改善する為にどのような食事を摂取すれば良いのかを分子栄養学的に探索を行った。

2. 研究の目的

これまでの報告や我々の研究結果より魚油にはシグナル異常を改善する効果がある。では、糖尿病妊娠ラットから生まれた仔の心臓のシグナル伝達系の異常がなぜ発生するか？また、魚油を摂取させることでなぜ心臓のインスリンシグナル伝達系の異常が改善されるのか？に関しては今のところよくわかっていない。そこで、我々は魚油のどのような成分にこれらの改善効果があるかについて検討した。魚油に豊富に含まれる ω -3系不飽和脂肪酸にはEPAとDHAが知られている。DHAは体内で容易にエロンガーゼによりEPAから変換されることと、EPAには心血管系イベント抑制効果があることを考慮して、まず初めにEPAに着目し検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験 . 糖尿病妊娠モデルラットの作成と飼育:

妊娠15週齢のWistarラット(妊娠2日目)にストレプトゾトシン(40mg/kg)を静脈注射して糖尿病を誘発した。糖尿病ラットにEPA(0.5g/kg/日)または水(W)を胃ゾンデにより投与した。糖尿病妊娠ラットから生まれた仔のEPA投与群をIDA/EPA、水投与群をIDM/W、正常妊娠ラットの仔をICM/EPAとし、3群の仔ラットの心臓について検討した。

(2) 実験 . 新生児心臓からの初代心筋培養細胞:

正常妊娠ラットと糖尿病妊娠ラットにEPAを投与し、生まれた生後3日目の仔の心臓をトリプシンおよびコラゲナーゼ処理して得られた細胞群から differential adhesion 法により分離して得た初代心筋細胞をM199培地にて培養する。仔の心臓および仔の心臓から単離培養した

初代心筋培養細胞について、インスリンシグナル伝達系に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 糖尿病妊娠ラットから生まれた仔の心臓およびその心臓から単離培養した初代心筋培養細胞では、インスリンシグナルの異常が認められた。しかし、妊娠中にEPAを摂取した妊娠ラットから生まれた仔の心臓および初代心筋培養細胞では、それらの異常が改善された(図1)。

更に、糖尿病妊娠ラットの仔から単離した初代心筋培養細胞をインスリンで刺激した際に、インスリンシグナル伝達系が阻害されることで、Glut4の細胞膜へのトランスロケーションが阻害され、インスリン抵抗性が惹起されていることがわかった。そして、妊娠中にEPAを摂取した糖尿病妊娠ラットの仔の心臓から単離された初代心筋培養細胞ではインスリンシグナルが改善される事でGlut4の細胞膜へのトランスロケーションが促進されていた(図2)。このように魚油に含まれる成分の中で、EPAがシグナル異常を改善する可能性が高いことが明らかとなった。

図1

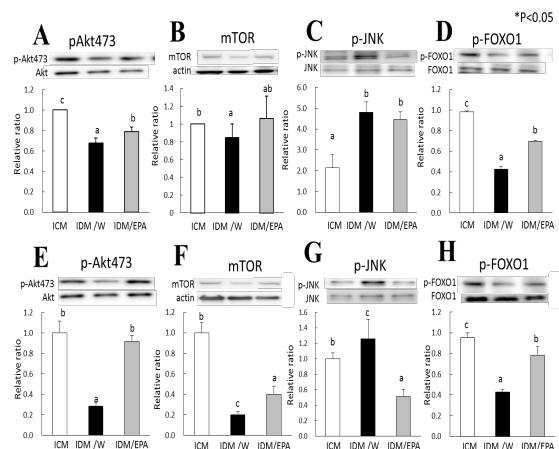


図1: 心臓および初代心筋培養細胞におけるEPAがインスリンシグナルに与える変化

A ~ D: 心臓 E ~ F: 初代心筋培養細胞

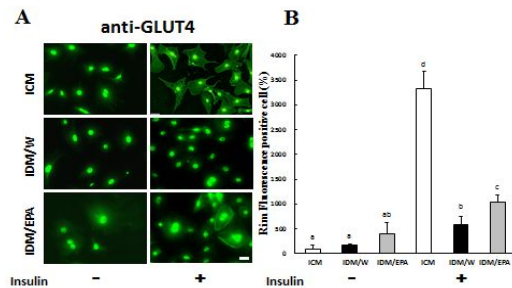


図2

図2: 初代心筋培養細胞においてEPAがGlut4のトランスロケーションに与える影響

(2)なぜ子宮内高血糖環境が仔の心臓のシグナル異常を引き起こしているのかについて検討をした。

私達はこの初代心筋培養細胞をさらに詳細に検討した。子宮内では慢性的に高血糖が続くことにより、多くのタンパク質が終末糖化産物 (AGEs: Advanced Glycation End Products) を形成している可能性が考えられる。酸化ストレスにより産生される AGEs は老化や疾患の原因となっている。糖尿病の診断基準の一つであるヘモグロビンA1cやグルコアルブミンもその一例である。そこで、抗AGEs抗体を用いてタンパク質の糖化を調べてみたところ、糖尿病妊娠ラットの仔の心臓そして単離した初代心筋培養細胞において、様々なタンパク質がAGEs化されていることが明らかになった(図3)。このタンパク質のAGEs化によりインスリンシグナル伝達系に関わる酵素の活性阻害や酸化ストレスによる慢性炎症が引き起こされた可能性は高いと考えられる。ところが興味深い事に、EPAを摂取した仔の心臓および初代心筋培養細胞ではこれらのタンパク質のAGEs化が有意に抑制されていた。

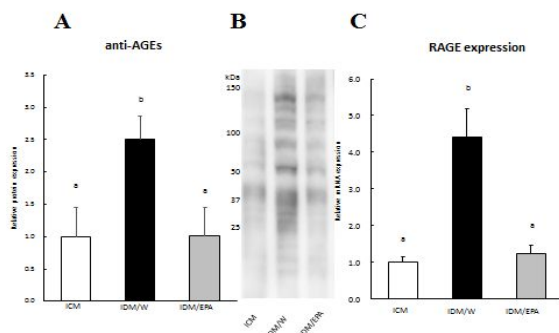


図3

図3：初代心筋培養細胞においてEPAが糖化やAGE受容体(AGEs)レベルに与える影響

(3)糖化を引き起こす酸化ストレスの主な原因物質の一つである活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species)が細胞内で発生しているかを調べるために、ROSの検出蛍光試薬であるCellROX® Greenを用いて染色した。糖尿病妊娠ラットの仔の心臓から単離した初代心筋培養細胞では、ROSの発生が認められた(図4)。更に、炎症性シグナル分子のNF- κ B、TNFやIL-6の遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRで調べたところ、正常な母ラットから生まれた仔と比較して有意に上昇していた。そしてEPAの摂取はこれらを有意に抑制した(図5)。

図4

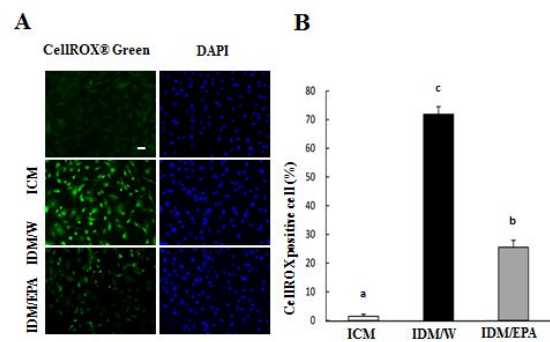


図4：EPAが初代心筋培養細胞におけるROSに与える影響

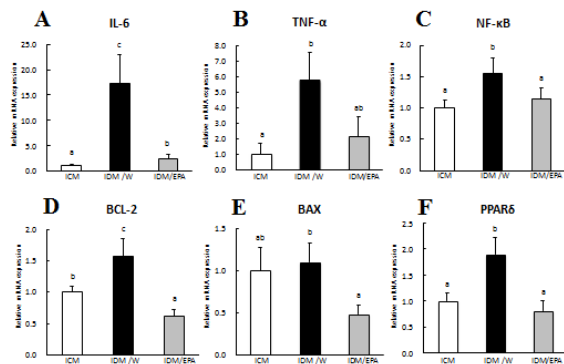


図5

図5：EPAが初代心筋培養細胞の炎症関連遺伝子レベルに与える影響

(4)初代心筋培養細胞におけるユビキチン化について検討した。ユビキチン化にはNF- κ Bp65が関わっている。通常、NF- κ Bp65は、核へのNF- κ B転座を抑制するIKKと安定な複合体を形成する。しかし、IKKを介したIKKのリン酸化は、そのユビキチン化およびその後のプロテアソームによる分解を促進する。IKK/NF- κ Bとp-I κ B/I κ Bの比は、IDM/Wにおいて増加した(図6AおよびB)。逆に、IKK/NF- κ Bp65の比は、ICMと比較してIDM/WおよびIDM/EPAにおいて減少した(図6、C)。特定のE3ユビキチン結合酵素のFボックスタンパク質は、ユビキチンタンパク質リガー複合体の4つのサブユニットの1つを構成する。タンパク質のユビキチン化レベルは、ICMまたはIDM/EPAと比較してIDM/Wにおいてより高かった(図6、DおよびE)。同様に、MAFbx発現は、ICMで観察されたものと比較して、IDM/WおよびIDM/EPAにおいて増加した。IDM/EPAにおいてMAFbx発現を減少させた(図6、F)。

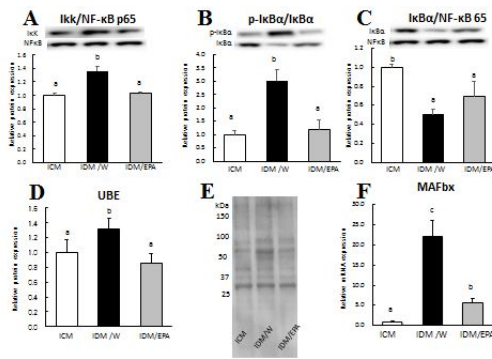


図 6

図 6：初代心筋培養細胞における EPA がユビキチン化に及ぼす影響

(5)まとめ

子宮内における高血糖は、心臓の炎症や細胞内の ROS の上昇によりインスリンシグナル異常を引き起こしたが、EPA を摂取することで改善された。今後は、これらのシグナル異常や糖化が他の臓器にどのような影響を与えているか検討し、EPA の効果を検証していきたい。

<引用文献>

- 1) Driscoll SG, Benirschke K, Curtis GW: Neonatal deaths among infants of diabetic mothers. Postmortem findings in ninety - five infants. *Am J Dis Child*, 100: 1960,818-35.
- 2) Hay WW Jr: Care of the infant of the diabetic mother. *Curr Diab Rep*, 12:2012, 4-15.
- 3) Nasu-Kawaharada R, Nakamura A, Kakarla SK, Blough ER, Kohama K, Kohama T. A maternal diet rich in fish oil may improve cardiac Akt-related signaling in the offspring of diabetic mother rats. *Nutrition*, 29:2013, 688-92,

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7件)

Kawaharada R, Masuda H, Chen Z, Blough E, Kohama T, Nakamura A, Intrauterine hyperglycemia-induced inflammatory signalling via the receptor for advanced glycation end products in the cardiac muscle of the infants of diabetic mother rats.査読有, *Eur. J. Nutr.* 2017, doi: 10.1007/s00394-017-1536-6.

中村彰男、河原田律子,子宮内高血糖環境

より胎児の心臓を保護する -3 系不飽和脂肪酸の役割,査読有, *化学と生物*, 2017, 55(5), 319 - 325.

河原田律子,小浜智子,中村彰男,妊娠中の -3 系不飽和脂肪酸の摂取とその有益な効果,査読有, *糖尿病と妊娠*, 2017, 17(1), 7-14.

R Kawaharada, A Nakamura, K Takahashi, H Kikuchi, Y Oshima, Y Kubohara.Oral administration of Dictyostelium differentiation-inducing factor 1 lowers blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats.査読有, *Life Sciences*, 2016, 155, 56-62.

河原田律子,小浜智子,中村彰男.胎児期の糖尿病母ラットの EPA 摂取は新生仔心臓のシグナル異常を改善できるか? 査読有, *糖尿病と妊娠*, 2015, 15(1): 91-95.

大友崇,河原田律子,篠崎 博光,小浜 智子,妊娠尿糖尿病患者に対する新しい栄養指導法の検討,査読有, *医学と薬学*, 2014, 71(12), 2331-2336.

Yoshiyama S, Chen Z, Okagaki T, Kohama K, Nasu-Kawaharada R, Izumi T, Ohshima N, Nagai T, and Nakamura A, Nicotine exposure alters human vascular smooth muscle cell phenotype from a contractile to a synthetic type, 査読有, *Atherosclerosis*, 2014, 237, 464-470.

[学会発表](計11件)

河原田律子,小浜智子,中村彰男,糖尿病母ラットから生まれた仔の心臓のタンパク質糖化を EPA は改善する、日本糖尿病妊娠学会、2017年12月、宮崎

Kawaharada R and Nakamura A, Intrauterine hyperglycaemia induced inflammatory signalling via the receptor for advanced glycation end products in the cardiac muscle of the infants of diabetic mother rats, International symposium on diabetes, hypertension, metabolic syndrome and pregnancy, 2017年3月, Barcelona, Spain

野口礼於奈,大沢湧雅,齋藤和真,河原田律子,中村彰男,高グルコース培地中でのラット心筋芽細胞における EPA の影響,日本分子生物学会,2016年12月,横浜

Kawaharada R and Nakamura A, EPA improved the infants of diabetic mothers, World congress of food science and technology, 2016年11月, Dublin

河原田律子, 中村彰男, 高血糖環境のラット心筋細胞における EPA の影響, 日本栄養改善学会, 2016 年 9 月, 青森

河原田律子, 中村彰男, ラット心筋細胞における EPA の影響, 日本糖尿病学会, 2016 年 5 月. 京都

Kawaharada R, Nakamura A. Eicosapentaenoic acid supplementation during pregnancy improved the insulin signalling pathway in the cardiac muscles of infants of diabetic mothers. International Conference on Lipid Science & Technology 2015, Sanfrancisco, USA, 2015 年 11 月.

河原田律子, 飯塚祐里, 石川春香, 中村碧乃, 横山未歩, 小浜智子, 中村彰男, 高グルコース状態でのラット心筋芽細胞の分化過程における EPA の影響. 第 31 回日本糖尿病・妊娠学会, 東京, 2015 年 11 月.

Kawaharada R, Ichikawa S, Kofude C, Yajima M, Muramoto M, Nakamura A. Eicosapentaenoic acid may improve the impaired signaling pathway of the cardiac muscle of infants. 12th Asian Congress of Nutrition, 横浜, 2015 年 5 月.

河原田律子, 小浜智子, 中村彰男, 妊娠中の EPA 摂取は糖尿病母ラットの仔から単離した初代心筋培養細胞のシグナル異常を改善する, 第 30 回日本糖尿病・妊娠学会, 2014.11, 長崎.

河原田律子, 橋爪愛佳, 前山幸代, 増田春菜, 中村彰男, 母親の妊娠期の EPA 摂取が新生仔心臓に与える影響, 日本糖尿病学会, 2014.5, 大阪

〔図書〕(計 2 件)

Nakamura A and Kawaharada R. Fish Oil and Cardiac Akt/mTOR-Mediated Insulin Resistance in Infants with Maternal Diabetes. In: "Nutrition and Diet in Maternal Diabetes: An Evidence-Based Approach (Nutrition and Health)". Edited by Rajkumar Rajendram, Victor R. Preedy, Vinood B. Patel. Springer Press, 2017, 161-174, ISBN 978-3-319-56438-8

Nakamura A and Kawaharada R. The Long-Term Cardiovascular Effects and Safety of Fish Oil among Women with Diabetes and Their Infants. In Fish Oil: Uses, Properties and Role in Human Health, Edited by Frankie Burton. Nova Science Publishers, Inc. New York, 2016.

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・講師

研究者番号：60383147