

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01571

研究課題名（和文）糖尿病が攪乱する発生プログラムとそのメカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of developmental programs that diabetes mellitus disturbs and the mechanism

研究代表者

目野 主税（Meno, Chikara）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：20311764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,670,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病に罹患した女性が妊娠すると、その子供に内臓錯位症候群などの様々な先天異常が発生するリスクが高まる。本研究では糖尿病雌マウスの胚に発生する左右軸異常を解析した。その結果、糖尿病雌マウスに給餌する餌の種類や給餌方法で、左右軸異常のタイプが変動することが明らかになった。また、糖尿病に由来する先天異常とWntシグナルの関連の解明を目指して、新たなWntレポーターマウスを作成し、同定済みのエンハンサーを欠失させたマウスを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な糖尿病患者の増加から、糖尿病に罹患した女性の子に発生する様々な先天異常について理解し、予防することの重要性が高まっている。本研究では、普段摂取する食事が内臓錯位症候群のタイプに影響することがマウスの実験によって示唆された。また、胚発生に必須の役割を果たすWntを解析するための、新しいマウスを作成した。

研究成果の概要（英文）：When females with diabetes become pregnant, the risk of their infant developing various congenital anomalies, including heterotaxy syndrome, increases. In this project, we analyzed the abnormal left-right axis in embryos derived from diabetic female mice. We found that the type of abnormal left-right axis changes depending on the feed components and feeding methods of diabetic female mice. Additionally, to understand the relationship between diabetic embryopathy and Wnt signaling, we created a new Wnt reporter mouse and analyzed a new mutant mouse lacking Wnt3a enhancer that we identified.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右軸 糖尿病 先天異常

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病に罹患した女性が妊娠すると(妊娠前糖尿病、糖尿病合併妊娠)、その子供に先天異常が発生するリスクが高まる。疫学調査の結果、妊娠前糖尿病と関連した先天異常の種類は多岐に渡り、中でも神経系や心臓の先天異常が多く発生することが明らかになっている。さらに、稀な先天異常である尾部退行症候群や内臓錯位症候群の発生リスクが高まることも一つの特徴である。妊娠前糖尿病において発生する先天異常は、アポトーシスや幾つかのシグナル経路の異常で説明されている。私たちは、これまでにヒト妊娠前糖尿病と内臓錯位症候群の関連に着目し、高血糖がマウス初期胚の左右軸に及ぼす影響を解析した。高濃度グルコースは初期胚の一過的構造であるノードに作用し、左右軸形成の初期イベント(NotchシグナルによるNodalシグナル関連遺伝子の発現とNodal活性制御)を阻害するため胚には左右軸が確立されず、内臓錯位症候群の一形態である右側相同が発生することが明らかになった。一方で、ヒトでは妊娠前糖尿病で左側相同の症例も報告されており、その原因は不明である。

(2) 哺乳類の初期胚は暫く左右対称に発生が進行し、ファイロタイプック段階に向けて胚体制を確立しながら左右軸を形成する。胚体制の確立を担う因子の一つがレチノイン酸であり、Aldh1a2によるレチノイン酸合成とCyp26a1によるレチノイン酸分解によって、胚にはレチノイン酸分布の勾配が生じる。ヒト妊娠前糖尿病で尾部退行症候群が発生する原因を尾芽領域のアポトーシスで説明する報告の他、糖尿病雌マウスの胚(以下、糖尿病胚と記載する)はレチノイン酸に対する感受性が亢進し、尾芽の*Wnt3a*発現が減少することで尾部退行症候群が発生するとの報告がある。さらに、レチノイン酸を添加した全胚培養やレチノイン酸の母体投与によって、内臓錯位症候群の左側相同が引き起こされることが知られている。

### 2. 研究の目的

(1) 妊娠前糖尿病で、正反対の左右異常である右側相同と左側相同が発生する原因は不明である。本研究では、左側相同の異常が発生するメカニズムを明らかにすることを試みた。解析の手がかりとして、疫学調査では妊娠糖尿病に肥満が加わると、先天異常の発生リスクが高まることが報告されている。肥満の原因が過剰な栄養摂取によるものであるとすると、糖尿病は特定の栄養素に対する許容摂取量を引き下げ、先天異常が発生する一因となっている可能性が考えられる。また、糖尿病マウスの胚ではレチノイン酸に対する感受性が亢進することが報告されているため、左右軸形成期にレチノイン酸シグナルを検出する。

(2) マウス胚が体制を確立するには、胚後方でWntシグナルの入力が持続することが重要であると考えられる。糖尿病胚の尾芽では、外部のレチノイン酸に反応して*Wnt3a*発現が抑制されることが報告されており、本研究では糖尿病と*Wnt3a*の関係づけを目指して、*Wnt3a*発現制御のメカニズムを明らかにすることを試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖尿病胚の作出：

ICR雌マウスをICR雄マウス(もしくはレポーター雄マウス)と交配させ、膣栓を確認した雌マウスにembryonic day (E)3.5の時点で10mg/mlストレプトゾトシン(STZ)を200mg/kg体重で腹腔投与した。餌の影響を解析するため、E3.5から特定ロットの餌(オリエンタル酵母CR-LPF)を給餌した。E8.5の時点の随時血糖を計測し、安楽死後の雌マウスからE8.5胚を回収し、解析に使用した。

#### (2) 遺伝子発現解析：

(whole-mount *in situ* hybridization) 常法に従って胚を処理し、ジゴキシゲニン標識した各種プローブでハイブリさせた。胚の洗浄後にALP標識抗ジゴキシゲニン抗体で処理し、NBT/BCIPの基質で発色反応を行った。

(X-gal染色) *LacZ*レポーターマウスに由来する胚を固定し、X-galによる発色反応によってガラクトシダーゼ活性を検出した。

#### (GFP蛍光観察)

GFPレポーターマウスに由来する胚を固定し、蛍光実体顕微鏡、および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (3) レポーターマウスの作出：

過排卵処理したC57BL/6雌マウスから採卵し、体外受精を行った。Cas9タンパク/crRNA/tracrRNA/ssDNAを前核へのマイクロインジェクション、またはエレクトロポレーションにより受精卵へ導入した。翌日2細胞期に至った胚を麻酔下にある偽妊娠マウスの背側から卵管移植し、産仔を得た。ノックインマウスは、PCRによる判定とシーケンズ解析により確認し

た。

#### (4) 変異マウスの作出：

同定した *Wnt3a* エンハンサー、および *Wnt3a* エクソン 1 に対する crRNA を合成し、Cas9 タンパク/crRNA/tracrRNA 溶液中の受精卵にそれぞれエレクトロポレーションを行った。翌日 2 細胞期に至った胚は、上述したように移植して産仔を得た。

### 4. 研究成果

(1) 糖尿病胚に生じる左右軸異常の解析：本研究では、オリエンタル酵母 CR-LPF の複数のロットを摂食制限することなく糖尿病マウスに給餌した。STZ 投与マウスの血糖値を non-diabetes (ND; <300 mg/dL), mild diabetes (MD; 300-400 mg/dL), severe diabetes (SD; >400 mg/dL) に分類し、これらのマウスに由来する胚を回収したところ、SD 胚では心臓ループの方向が逆転している個体 ( $n = 50/188$ ; 21 litters) と、心臓ループが左右非対称な個体 ( $n = 33/188$ ; 21 litters) が出現した。一方の ND 胚および MD 胚では、このような異常は観察されなかった (ND:  $n = 102/102$ ; 7 litters, MD:  $n = 75/75$ ; 5 litters)。さらに、胚ターニングの方向が確認できた SD 胚を観察すると、一部の個体でターニング方向の逆転が認められた ( $n = 46/167$ ; 21 litters)。

側板中胚葉における転写因子 *Pitx2* の発現は、Nodal シグナルによって誘導され、その細胞系譜で発現が持続する。糖尿病胚で *Pitx2* の発現部位を解析したところ、ある特定のロットを給餌した SD マウスの胚では、[左側,  $n = 65/114$ ; 消失,  $n = 36/114$ ; 両側,  $n = 10/114$ ; 右側,  $n = 3/114$ ; 9 litters]であった。また、別の特定のロットを給餌した SD マウスの胚では、[左側,  $n = 26/30$ ; 消失,  $n = 2/30$ ; 両側,  $n = 2/30$ ; 3 litters]のパターンであった。両飼料における *Pitx2* 発現異常のパターンには有意差があり ( $p < 0.01$ )、製造ロットが変わるだけで糖尿病胚に生じる左右軸異常のタイプが変動することが明らかになった。また、以前の私たちの解析 (Hachisuga et al., PNAS 2015) では、糖尿病に伴う過食の影響を排除するために、糖尿病マウスの給餌 (オリエンタル酵母 CR-LPF) を制限し、グルコース添加水を与えている。この研究では、SD 胚で *Pitx2* 発現の消失だけが観察されており、糖尿病母体が摂取する餌が胚における左右軸形成に大きく影響することが示唆された。

(2) 糖尿病胚におけるレチノイン酸シグナルの解析：胚におけるレチノイン酸シグナルを可視化するレポーターマウスとして RARE-*LacZ* が知られている。レチノイン酸シグナルの強弱を感度良く検出することができる新たなレポーターマウスの作出を試みた。Wnt シグナルを可視化するレポーターマウスとして ROSA26 領域に TCF/LEF-H2BGFP が挿入された WntVis マウスが報告されているため、このシステムを利用して TCF/LEF 結合配列と RARE を入れ替えたレポーターマウスを作成した。複数のラインを得たが、いずれも蛍光および GFP をプローブとした *in situ* hybridization では E8.5 胚全体にシグナルが発生し、レチノイン酸シグナルの強弱を検出できているとは考えられなかった。このレポーターコンストラクトを受精卵へ注入したトランスジェニック胚も胚全体でシグナルが観察されたことから、RARE と WntVis プロモーターの組み合わせが不適合であることが示唆された。

既存の RARE-*LacZ* レポーターマウスを使用して母体の糖尿病が胚のレチノイン酸シグナルに与える影響を調べた。すると、E8.2 (左右軸形成期) 及び E9.5 において、正常胚と糖尿病由来胚の間で X-gal 染色の明白な違いは観察されなかった。糖尿病胚ではレチノイン酸代謝酵素 *Cyp26A1* の発現が抑制されることが報告されている。私たちの実験系でも、様々な発生ステージの糖尿病胚で *Cyp26A1* の発現を *in situ* hybridization で解析した。先行研究と異なり、SD 胚でも明白な *Cyp26A1* の発現減少は認めなかった。以上の結果から、SD 胚ではレチノイン酸シグナルの劇的な変化は認められないが、RARE-*LacZ* では検出困難な僅かなシグナル差が存在する可能性は現在のところ排除できない。

(3) *Wnt3a* 発現制御の解析：糖尿病胚の尾芽では *Wnt3a* の発現が抑制され、尾部退行症候群に至ることが示唆されている。私たちは *Wnt3a* のシス解析によって胚後方で活性を有するエンハンサーを同定しており、糖尿病と関連づける目的で CRISPR/Cas9 法によってエンハンサーのコア配列を欠失したマウスを作成した。この変異の表現型を調べるために初期胚における *Wnt3a* 発現と胚形態を観察したところ、野生型とホモ変異胚で明白な違いは観察されなかった。そこで、*Wnt3a* エクソン 1 を CRISPR/Cas9 によって欠失させたマウスを作成し、これをエンハンサー欠失マウスと交配させた。*Wnt3a* エンハンサー<sup>-/-</sup>胚における *Wnt3a* 発現は、野生型胚および *Wnt3a* +/-胚と比較して E8.0 原条における発現が減弱することが明らかになった。同定したエンハンサーは、E8.0 胚の原条で活性を持ち、通常飼育の生理的環境下では欠失しても影響がないが、*Wnt3a* 発現が抑制される状況では発現の亢進に働くものと考えられた。

(4) Wnt レポーターマウスの作製：Wnt カノニカル経路の TCF/LEF が結合するシス配列には Sox が結合しうるタイプがあり、このタイプをエンハンサーとして H2BGFP を発現するレポーターマウスを作製した。この WntSoxVis レポーターマウスの胚を E8.5 で観察したところ、Wnt カノニカル経路のシグナル領域である原条および頭部神経堤細胞で蛍光が検出された。このレポーター

マウスによって、Sox 結合の有無による Wnt カノニカル経路の修飾を解析できるものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Saba R, Kitajima K, Rainbow L, Engert S, Uemura M, Ishida H, Kokkinopoulos I, Shintani Y, Miyagawa S, Kanai Y, Kanai-Azuma M, Koopman P, Meno C, Kenny J, Lickert H, Saga Y, Suzuki K, Sawa Y, Yashiro K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Endocardium differentiation through Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48321-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oki S, Ohta T, Shioi G, Hatanaka H, Ogasawara O, Okuda Y, Kawaji H, Nakaki R, Sese J, Meno C	4. 巻 19
2. 論文標題 ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e46255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201846255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nabeshima R, Nishimura O, Maeda T, Shimizu N, Ide T, Yashiro K, Sakai Y, Meno C, Kadota M, Shiratori H, Kuraku S, Hamada H	4. 巻 7
2. 論文標題 Loss of Fam60a, a Sin3a subunit, results in embryonic lethality and is associated with aberrant methylation at a subset of gene promoters.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e36435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.36435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Semba Y, Harada A, Maehara K, Oki S, Meno C, Ueda J, Yamagata K, Suzuki A, Onimaru M, Nogami J, Okada S, Akashi K, Ohkawa Y	4. 巻 45
2. 論文標題 Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 8758-8772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkx475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 目野 主税
2. 発表標題 マウス胚の左右軸形成と糖尿病による攪乱
3. 学会等名 第19回日本心臓血管発生研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鄒 兆南、北島 桂子、本田 瑞季、目野 主税
2. 発表標題 糖尿病合併妊娠における栄養素摂取と胎児先天異常との関連性の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鄒 兆南、北島 桂子、目野 主税
2. 発表標題 母体糖尿病における内臓錯位発症のメカニズムの解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 目野 主税、蜂須賀 正紘、鄒 兆南、沖 真弥、北島 桂子
2. 発表標題 高血糖がマウス胚の左右軸形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第57回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ChIP-Atlas https://chip-atlas.org
--------------------------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	北島 桂子  (Kitajima Keiko)  (00332784)	九州大学・医学研究院・助教   (17102)	
連携研究者	沖 真弥  (Oki Shinya)  (90452713)	九州大学・医学研究院・助教   (17102)	令和2年4月に京都大学に異動
連携研究者	大川 恭行  (Ohkawa Yasuyuki)  (80448430)	九州大学・生体防御医学研究所・教授   (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------