

令和元年6月13日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01834

研究課題名(和文) 体質と環境のミスマッチが生じる糖尿病発症の機構解明による先制医療の実現

研究課題名(英文) Realization of Preemptive Medicine by elucidating the onset mechanism of diabetes attributed to mismatch between Constitution and Environment

研究代表者

高 ひかり (TAKA, HIKARI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60338374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低出生体重児は体質と環境のミスマッチにより、大人になってからメタボリック症候群のみならず、耐糖能異常・高血圧・心疾患・精神疾患などの非感染性慢性疾患(NCDs)発症リスクが高まる事が知られている(DOHaD説)。しかしながら、低出生体重児がなぜこのような疾患発症リスクを負うのか、そのメカニズムについては明らかになっていない。そこで、この体質と環境のミスマッチにより生じるNCDs発症リスク因子を同定する為、低出生体重仔と標準出生体重仔ラットモデルに高脂肪食を負荷し、糖尿病に關係する代謝物変化の解析を行った。その結果、低出生体重仔において糖尿病に起因するリスク代謝物候補を見つける事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病は今や健康長寿の最大の阻害要因となるだけでなく、国民医療費にも大きな影響を与えている。特に糖尿病は重症化すると細小血管症(糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害)、大血管障害(脳卒中、心筋梗塞、抹消動脈性疾患)など様々な合併症を誘発し、生活機能低下がおこり介護が必要となる。医療費だけでなく、介護にも多大な費用が必要となる。この研究により糖尿病と相関性のある有益な早期バイオマーカーが確定できれば、発症リスクを持った子供たちが成人になる前に疾病の予防、治療が可能となり、国の医療費、介護費負担が軽減され、疾病リスクを負って産まれても健康で長生きできる健康長寿が結果とされる。

研究成果の概要(英文)：According to Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) theory, low birth weight is a risk factor for various Non-Communicable chronic diseases (NCDs), such as hypertension, heart disease, type 2 diabetes and mental illness. However, the mechanisms that increase the risk of NCDs in low birth weight infants have not been elucidated yet. In order to identify the risk factors for NCDs caused by mismatch between constitution and environment, offspring of rats were divided into two groups by their birth weight and then fed a high fat diet to both groups. We analyzed serum metabolites of each group with a capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS), followed by statistical analysis. As a result, we found several candidates for the risk factor of type2 diabetes in low birth weight group.

研究分野：質量分析計を用いたメタボローム、プロテオーム解析

キーワード：生活習慣病 2型糖尿病 DOHaD仮説 キャピラリー電気泳動質量分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病に係る遺伝子の働きを調節するメカニズムの多くは、受精時、胎児期から生後1年くらいまでの間に決まる。その間の胎児や新生児が低栄養で育つとこれらの児は儉約型体質となり、遺伝子発現調節機構であるエピジェネティクス修飾の変化により成長後に種々の疾病発症リスクが高くなる。儉約型体質を持った児が成長後に富栄養環境におかれると体質と環境のミスマッチが生じ、それが引き金となって生活習慣病(成人病)などの病気を発症する。このようにある種の疾病は、出生前のエピジェネティクスの変化と出生後の生活習慣の負荷という二段階を経て発症している。生活習慣病(成人病)胎児期発症起源説(DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease)に基づく大規模疫学調査で、出生体重が小さくなると、虚血性心疾患、二型糖尿病、本態性高血圧、メタボリック症候群、脳梗塞、脂質代謝異常症、神経発達障害のリスクが高くなるということが明らかになってきた。

現在、日本国内において出生数は年々減少しているが、低出生体重児の割合は増加している。日本における低出生体重児は、栄養状態の悪かった1970年代以前に比べて、国民の栄養状態がよくなった1980年代以降に増加しており、現在は全体出生数の約10%を占めるようになった。出生体重は間接的ではあるものの、子宮内環境を示す指標になるものであり、低出生体重児が増えているということは、それだけ生活習慣病のリスクを持つ子どもたちが増えていると推測される。

生活習慣では食習慣の欧米化に伴い食事の内容も大きく変化してきている。脂質の摂取源として、肉類、卵類、乳類および、油脂類の摂取量が大きく増加し、動物性食品としては魚介類と同じくらい肉類が摂取されるようになり、魚中心から、肉、卵、乳類分散型に変化している。特に肉類の摂取量の増加は、脂質摂取量増加、摂取脂肪酸の質の変化(-3脂肪酸から-6脂肪酸)につながっており、既に世界的な増加がみられる肥満やメタボリックシンドロームの一つの要因として考えられている。このように疾病のリスクを持った子供たちが増加し、更に食生活の欧米化により高脂肪食負荷の現代では生活習慣病は社会的に深刻な問題となっている。国際糖尿病連合(IDF)の発表によると、2014年の日本の現在の成人糖尿病人口は721万人で世界ランキングでは第10位となっている。2型糖尿病は生活習慣病の一つであるが、糖尿病はひとたび発症すると治癒することはなく、放置すると網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こし、末期には失明や透析治療が必要となることがある。さらに、糖尿病は脳卒中、虚血性心疾患などの心血管疾患の発症進展を促進することも知られている。また、最近では糖尿病がガンの罹患リスクも高めることが報告されており、日本糖尿病学会と日本癌学会の研究では、糖尿病患者はガンになるリスクが1.2倍に高まることを報告している。

生活習慣病は今や健康長寿の最大の阻害要因となるだけでなく、国民医療費にも大きな影響を与えているのが現状である。特に糖尿病は重症化すると細小血管症(糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害)大血管障害(脳卒中、心筋梗塞、抹消動脈性疾患)など様々な合併症を誘発し、生活機能低下がおこり介護が必要となる。医療費だけでなく、介護にも多大な費用がかかることとなる。以上のことより、生活習慣病のリスクを持った子どもたちが成人する前に明確な2型糖尿病発症リスクファクター化合物を同定し、疾病発症機序を明らかにする。これにより、代謝・栄養状態が逸脱した状態を判定し、疾病の予防、治療に役立てる先制医療の実現を目的としたバイオマーカーの開発を目指す。

### 2. 研究の目的

糖尿病に代表される生活習慣病に係る遺伝子の働きを調節するメカニズムの多くは受精時、胎児期から生後1年くらいまでの間に決まる。その間に胎児や新生児が劣悪な環境にさらされると、遺伝子の働きを調節するメカニズムであるエピジェネティクスが変化して、成人後に病気のリスクが高くなるという「生活習慣病(成人病)胎児期発症起源説」仮説が提唱されている。しかしこの仮説を裏付ける明確な疾病発症機序はまだ解明されていない。そこで、この仮説を裏付けるリスクファクター化合物を同定する事により、その発症機序を明らかにする。

高脂肪食負荷による生活習慣病の一つであるインスリン抵抗性2型糖尿病と出生時低体重という出生リスクについて鍵となる物質(化合物、ペプチド、タンパク質、翻訳後修飾)を探索・同定・定量し、成人期あるいは老年期における罹患リスクを予測し、治療、予防につなげる疾病発症機序の解明を目指した先制医療の実現につなげる事を目的とする。2型糖尿病の疾病作用機序と相関性のある有用な早期バイオマーカーが確定できれば、発症リスクを持った子供たちが成人する前にリスクファクター化合物をコントロールすることにより、成人期あるいは老年期における生活習慣病発症を予測した積極的介入による疾病の予防、治療ができる。延いては国の医療費、介護費負担が軽減されるだけでなく、疾病リスクを負って産まれても健康で長生きできる健康長寿へと導くことが可能となるであろう。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデルラットの作製

妊娠中に標準食自由摂餌母ラットからの仔(標準出生体重仔)と低糖質カロリー摂取制限した母ラットからの仔(低出生体重仔)に3週間母乳を与えた(授乳の間、各母ラットは標準食を自由摂餌させた)。離乳後1週間各出生仔群に通常食を与え、その後各ラット仔群に14週間(18週齢まで)通常食または高脂肪食を与えた計4つのモデルラット群を作製した。

図1.モデルラット

- cc : 標準出生体重仔 - 標準食
- cf : 標準出生体重仔-高脂肪食負荷
- lc : 低出生体重仔-標準食
- lf : 低出生体重仔-高脂肪食負荷

(2) 血清の前処理

ラット仔から採取した血清は凍結融解を避けるため小分けし、前処理まで-80 に保存しておいた。血清は代謝物抽出のため、メタノール/クロロホルムに水を加えて処理し、水層（上層）を限外ろ過フィルター(UltrafreeMC-PLHCC)で濾過し濾液を乾固し血中極性低分子代謝物サンプルとした。

(3) CE/MS(キャピラリーゾーン電気泳動質量分析)

乾固したサンプルは分析直前に水に溶解し CE/MS により分析を行った。110 種標準品の泳動時間と質量を基に検出された代謝物質の同定と定量を行った。

質量分析で得られた膨大なデータを Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェア(Agilent 社)を用い統計的に解析を行った。各仔群で血糖値の差異を確認し、分析結果を低出生体重仔(先天的要因)と高脂肪食負荷(生活習慣)と関連付けて統計結果を統合し、2 型糖尿病に起因するメタボリック症候群のリスクファクター化合物を疾病発症機序と関連付けてバイオインフォマティクス的手法で同定した。

(4) バイオインフォマティクス処理

生物学(biology)と統計解析を行った結果(情報学(information science))から血中生理活性物質からインスリン抵抗性 2 型糖尿病の発症機序を考察し、有益なインスリン抵抗性 2 型糖尿病の低体重児出生リスクファクター因子を絞り込み、同定した。

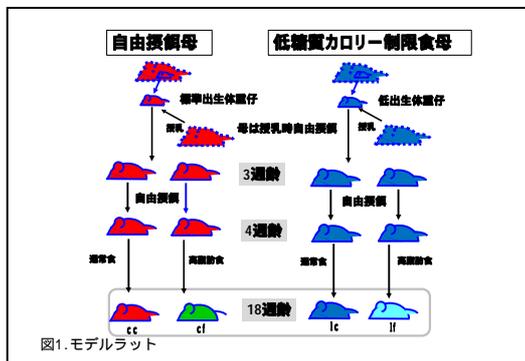


図1.モデルラット

4. 研究成果

(1) 糖代謝、インスリン抵抗性評価

18 週齢仔の絶食後経口糖負荷試験では各ラット仔群の血糖値に差は見られなかったが、低出生体重仔に高脂肪食を負荷したラット仔群(lf 群)では血中インスリン濃度が高くなり、糖尿病指数である HOMA インデックスが糖尿病領域まで変化した。この事より血糖値に差がなかったが、母体カロリー制限母からの低出生体重仔では環境に敏感に左右され生活習慣病に陥りやすい事が確認された。生活習慣病にかかりやすくなるなんらかの疾病リスク因子が存在するのではないかと推測された。

(2) CE/MS 分析

母体カロリー制限の有無に関わらず高脂肪食負荷により有意に変動した代謝物  
母体カロリー制限の有無に関わらず高脂肪食負荷により有意に増加した代謝物 5 個 (Threonine、2-Hydroxybutyric acid、3-Hydroxybutyric acid、Gluconic acid、Citric acid)  
有意に低下した代謝物が 8 個(Histidine、Alanine、Valine、Leucine、Isoleucine、Asparagine、Tryptophan、Tyrosine) 観察された。(図 2)

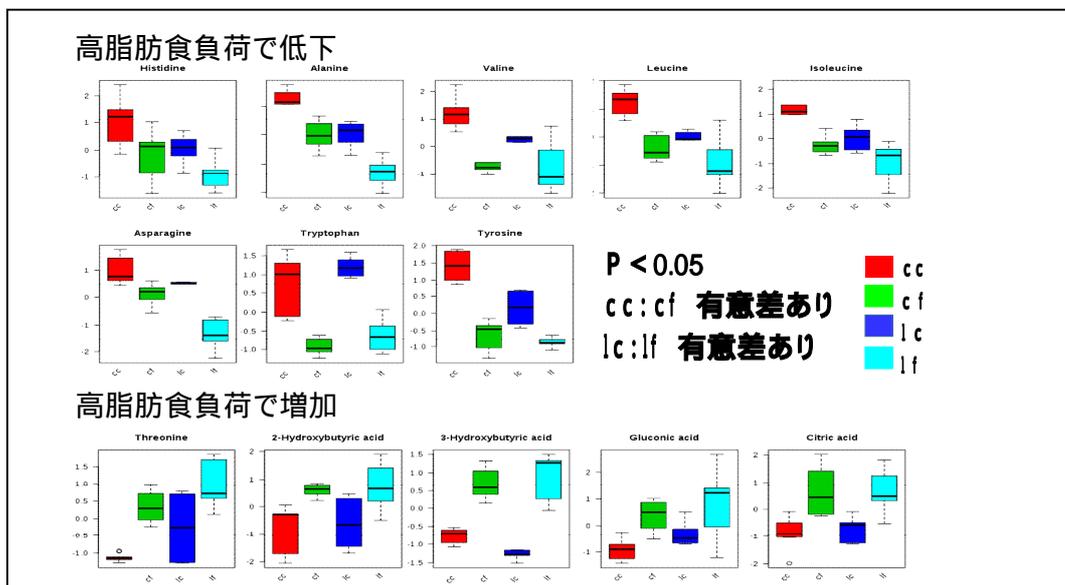


図 2. 母体カロリー制限の有無に関わらず高脂肪食負荷により有意に変化した代謝物

この 13 の代謝物で PCA (Principal Component Analysis) 解析を行った。その結果、母体カロ

リー制限有りの低出生体重仔-標準食 (lc) 群は標準出生体重仔 - 標準食 (cc) 群に比べ高脂肪食食負荷群〔標準出生体重仔-高脂肪食負荷 (cf) 群、低出生体重仔-高脂肪食負荷 (lf) 群〕により近くなった。低出生体重仔は生まれながらに高脂肪食を摂取しなくても、なんらかの高脂肪食負荷様の代謝物の変動が起こっていると推測される。さらに、13 代謝物の中で cf 群と lc 群が同レベルであり且つ lf 群で更に変動する代謝物を低出生体重仔における高脂肪食負荷に起因するリスク代謝物であると考えた。そこで cc 群対 cf、lc、lf 群間で有意差があり、cf 群対 lc 群間で有意差がなく、lc 群対 lf 群間で有意差ある代謝物を抽出した。その結果 6 個の代謝物が検出された。6 個の代謝物で PCA 解析を行った結果、cf 群と lc 群は分離せず、lf 群は cc 群と一番離れたところに位置した。この結果より、この 6 個の代謝物 (Histidine、Alanine、Leucine、Isoleucine、Asparagine、Threonine) は低出生体重仔が生まれながらにもつ生活習慣病発症リスクになっており、且つ環境ミスマッチ (高脂肪食負荷) に起因する 2 型糖尿病発症のリスク因子である可能性を示唆した。

母体カロリー制限の結果高脂肪食負荷に応答しなくなった代謝物

母体カロリー制限の結果、高脂肪食負荷に応答しなくなった 13 の代謝物 (Lysine、Phenylalanine、Proline、Hydroxyproline、Glycine、Glutamine、Serine、Malic acid、Lactic acid、Pyruvic acid、Citrulline、Uric Acid、3-phosphoglyceric acid) において PCA 解析を行った。その結果 cf 群、lc 群、lf 群は分離する事ができなかった。これらの代謝物は標準出生体重仔においては、高脂肪食負荷の影響を受けるが低出生体重仔では応答しなくなった。すなわちこれらの代謝物は、低出生体重仔における高脂肪食負荷による生活習慣病発症リスク因子ではなく、出生体重の低下に起因するものであると考えられる。

母体カロリー制限・高脂肪食負荷条件下で有意差の観察された代謝物

3 個の代謝物 (Methionine、Cytidine、Glyoxylic acid) は、低出生体重と高脂肪食負荷の 2 つが揃わないと変動が見られなかった。よって高脂肪食負荷による生活習慣病発症リスク因子ではなく、低出生体重のような先天的要因があって初めて高脂肪食負荷により 2 型糖尿病の様な生活習慣病発症リスクとなる代謝物であると考えられる。

低出生体重仔においてすでに高脂肪食負荷様の変動をおこしており、且つ高脂肪食負荷により更に有意に変動し、低体重出生仔においては高脂肪食負荷によるリスクが高くなる事が示唆された 6 個の代謝物 (Histidine、Alanine、Leucine、Isoleucine、Asparagine、Threonine) を同定した。また、有意な変動には低出生体重と高脂肪食負荷の両方の条件が必要であった 3 個の代謝物 (Methionine、Cytidine、Glyoxylic acid) は低出生体重という先天的な要因が高脂肪食負荷という生活習慣において 2 型糖尿病の様な生活習慣病発症を導く鍵となる代謝物ではないかと考えられた。

これらの 9 個の候補代謝物で PCA 解析を行った結果、cf 群と lc 群は分離せず、lf 群 (インスリン抵抗性が発症していた) は cc 群と一番離れたところに位置した。(図 3)

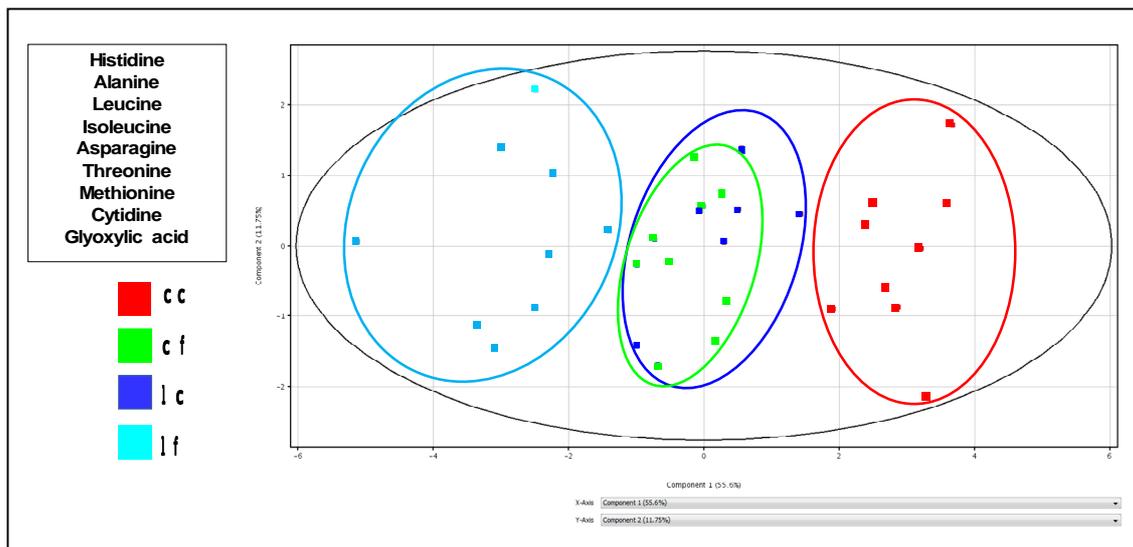


図 3. 候補代謝物 9 個の PCA 解析

以上の結果より、体質と環境のミスマッチにより生じる 2 型糖尿病の様な生活習慣病発症リスク因子となる 9 個の候補代謝物を見つける事ができた。

今後、これらの代謝物がどのようなメカニズムで惹起され生活習慣病発症へと反映されるのか詳細な解析を進めていく必要がある。

更に測定代謝物を脂質代謝やタンパク質解析に幅を広げ、ここで候補となった代謝物との関係や表現型とあわせてリスク因子の探索および発症機序の解明を試み、低出生体重児における発症リスク回避の糸口をみつきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Tabé Y, Saitoh K, Yang H, Sekihara K, Yamatani K, Ruvolo V, Taka H, Kaga N, Kikkawa M, Arai H, Miida T, Andreeff M, Spagnuolo PA, Konopleva M. Inhibition of FAO in AML co-cultured with BM adipocytes: mechanisms of survival and chemosensitization to cytarabine. *Sci Rep*. 査読有、8(1):16837. 2018 doi: 10.1038/s41598-018-35198-6.

Shoji H, Taka H, Kaga N, Ikeda N, Hisata K, Miura Y, Shimizu T. Choline-related metabolites influenced by feeding patterns in preterm and term infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 査読有、1-6. 2018 doi: 10.1080/14767058.2018.1488165.

Fujimaki M, Saiki S, Li Y, Kaga N, Taka H, Hatano T, Ishikawa KI, Oji Y, Mori A, Okuzumi A, Koinuma T, Ueno SI, Imamichi Y, Ueno T, Miura Y, Funayama M, Hattori N. Serum caffeine and metabolites are reliable biomarkers of early Parkinson disease. *Neurology*. 査読有、30;90(5):e404-e411. 2018 doi: 10.1212/WNL.0000000000004888.

〔学会発表〕(計 2 件)

加賀 直子、高 ひかり、上野 隆、根本 崇宏、低出生体重児における非感染性慢性疾患発症機序の解明、第 10 回メタボロームシンポジウム、2016

高 ひかり、加賀 直子、上野 隆、三浦 芳樹、根本 崇宏、低出生体重児への高脂肪食負荷による非感染性慢性疾患(NCDs)発症リスクへの影響、第 91 回日本生化学会大会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 加賀 直子

ローマ字氏名: KAGA, naoko

所属研究機関名: 順天堂大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 80338342

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 根本 崇宏

ローマ字氏名: NEMOTO, takahiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。