

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07880

研究課題名(和文) 高血糖曝露により生じる胎児の左右軸形態異常に関する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the fetal left-right axis malformations induced by maternal hyperglycemia.

研究代表者

北島 桂子 (Kitajima, Keiko)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00332784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高グルコース濃度に曝露された8.0日胚の原始結節では、NodalとCer12の発現が低下しており、この要因がノードにおける活性型NOTCHの減弱によることを見出した。8.0日胚の原始結節周囲のNOTCHの発現に必要なWnt3aのシス解析を行って、2カ所の原条エンハンサー(PSE1, PSE2)を特定した。CRISPR-Cas9法によりPSE1に点変異を導入したマウスを作成したが、Wnt3aの原条での顕著な発現低下は見られず、ホモ個体も生存可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は先天異常を引き起こすリスク要因であり、形態学的には妊娠7週までに糖尿病による先天異常が生じると考えられている。疫学調査によって糖尿病による胎児の左右形態異常が裏付けられており、実験的には糖尿病モデルマウスの胎児にヒトと同様の左右形態異常が発生することが報告されているが、その発生機序については未だ不明である。我々の研究成果は、妊娠糖尿病が左右軸関連の先天異常発生を引き起こす要因を特定することで、エビデンスに基づいた妊婦への血糖管理や栄養指導に役立てることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：The expression of Nodal and Cer12 was decreased in the node of 8.0-day embryo exposed to high glucose concentration, and it was due to the reduction of active form of NOTCH (NICD) in the node. We focused on Wnt3a which is required for the expression of NOTCH around the node in 8.0-day embryo, and identified two enhancers, PSE1 and PSE2, for primitive streak specific expression of Wnt3a. We first introduced point mutation in Wnt3a PSE1 by CRISPR/Cas9 system, but there was no significant decrease in expression of Wnt3a in the primitive streak, and the obtained homozygote pups were viable.

研究分野：Developmental Biology

キーワード：糖尿病母体 左右軸 心臓発生 高血糖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1990 年前後からの疫学調査によって、糖尿病により左右形態を含む種々の先天異常が生じることが報告されている。実験的には糖尿病モデルマウス NOD の胎児にヒトと同様の左右形態異常が発生し、表現型が胎児の遺伝子型によって修飾されることが報告されているものの、その詳細については未だ不明である。また Notch シグナル、Wnt シグナル、Ca²⁺シグナル、レチノイン酸シグナルが左右軸に影響を与えることが明らかになってきているが、糖尿病母体の胎児では左右軸形成のどのステップに変化が生じているかは解明されていない。

我々は 2015 年に発表した論文で、妊娠時の高血糖による Notch シグナル依存的な Nodal シグナルの抑制が左右軸に異常をきたすことを報告した(Hachisuga et al.)。マウス 8.0 日胚の原始結節周囲の Notch 発現には Wnt シグナルが必要であることから、我々は *Wnt3a* に着目し、原条で活性を持つエンハンサー候補領域を 2 カ所同定するに至った。また *Wnt3a* の exon1 を欠失したヌル変異マウスを作出し、既報と同様に体軸伸長および左右軸の異常を確認していた(Takada et al., 1993; Nakaya et al., 2005)。

2. 研究の目的

本研究課題では、左右軸関連遺伝子の発現調節、および Wnt シグナルに焦点を絞り、糖尿病が左右軸関連の先天異常を引き起こす発生機序を明らかにすることを目的とした。

(1) *Wnt3a* の原条エンハンサーの機能解析

我々が同定した *Wnt3a* の 2 カ所のエンハンサーについて、原条領域における発現域や発現強度を比較することで、同定したシスエレメントの活性を検討する。また、このシスエレメントを制御する経路について解析することで、*Wnt3a* 発現制御の意義を明らかにする。

(2) *Wnt3a* ヌル胚における左右関連遺伝子の発現パターン解析

Nakaya らは、*Wnt3a* ヌル変異胚では Delta/Notch シグナルが後方化することによりノード周囲の Nodal 発現が減弱し、左右軸異常および体軸伸長阻害が生じると報告している。左右軸の指標である心臓形態の異常との関連性を詳細に調べることで、*Wnt3a* による左右軸形成過程を明らかにする。

(3) 飼育環境による血中代謝産物がマウス胚に与える催奇形作用の解析

我々は全胚培養法を用いて高グルコース曝露が左右軸異常を引き起こすことを明らかにしてきた。またストレプトゾトシン誘導糖尿病母体から得られた胚では左右軸異常を来たす胚は全体の一部であり、全胚培養では再現困難な要因が発生機序に含まれる可能性が考えられる。本研究課題では血糖以外の血中代謝産物が左右軸形成に関わる可能性を検討する。

3. 研究の方法

本研究課題ではストレプトゾトシン投与によって作出する糖尿病モデルマウスや、CRISPR-Cas9 法により作出した *Wnt3a* PSE1 マウス、*Wnt3a* ex1 マウスを用いた解析を中心に行った。

(1) *Wnt3a* の原条エンハンサーの機能解析

我々が同定した *Wnt3a* の 2 カ所の原条エンハンサーの 1 つ、PSE1 に CRISPR-Cas9 法により変異を導入して *Wnt3a* PSE1 マウスを作出した。エンハンサー活性を評価するために、*Wnt3a* 野生型胚、*Wnt3a* PSE1/ PSE1 胚、*Wnt3a* PSE1/ ex1 胚を妊娠 8.0 日目で回収して、Whole-mount in situ hybridization 法により原条における *Wnt3a* mRNA の発現量および発現領域を比較した。

(2) *Wnt3a* ヌル胚における左右関連遺伝子の発現パターン解析

胎生 8.5 日の *Wnt3a* ヌル胚を回収し、ターニングや心臓のルーピングのパターン、および LPM における *Pitx2* mRNA の発現を Whole-mount in situ hybridization 法により評価する。

(3) 飼育環境による血中代謝産物がマウス胚に与える催奇形作用の解析

Wnt3a ex1 マウスにロットの異なる飼料を与え、胎生 8.5 日胚のターニングや心臓ルーピングのパターンを評価した。また RARE-hspLacZ マウスにロットの異なる飼料を投与し、得られた 8.5 日胚を X-gal 染色に供することでレチノイン酸シグナルの強度を評価した。

4. 研究成果

(1) *Wnt3a* の原条エンハンサーの機能解析

CRISPR-Cas9 法によって変異を導入した *Wnt3a* PSE1/+マウスを交配して得られた *Wnt3a* PSE1/PSE1 は正常で繁殖可能であった。また胎生 8 日胚の原条における *Wnt3a* の発現も正常であった。次に *Wnt3a* PSE1/PSE1 マウスと *Wnt3a* ex1/+マウスを交配し、*Wnt3a* PSE1/ex1 胚の 8 日胚の原条においても *Wnt3a* の発現量および発現領域に変化は見られなかった。変異を導入した領域には既知の転写因子結合サイトが存在するが、*Wnt3a* の発現を制御する主領域は PSE1 には存在しないと結論づけた。他方の PSE2 には、*Wnt3a* 遺伝子の発現が低下することで短尾を呈する *vt* マウスの責任配列が存在することから、引き続き PSE2 のエンハンサー活性の評価を進める予定である。

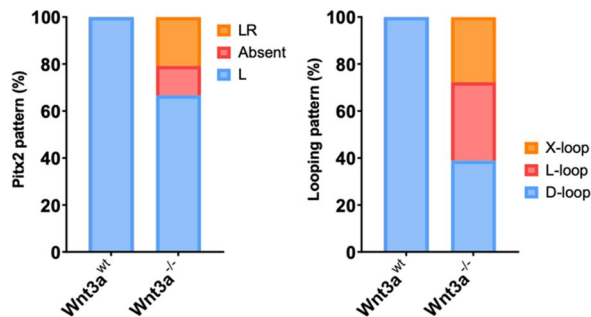


図1 *Wnt3a* Δ ex1/ Δ ex1マウスの表現型

(2) *Wnt3a* ヌル胚における左右関連遺伝子の発現パターン解析

Nayaka らは、*Wnt3a* ヌル変異胚で

Wnt3a によって誘導される Notch シグナルが減弱することで原始結節の *Nodal* 発現が後方化し、*Pitx2* が左右両側で発現する左側相同パターンを呈することを報告しているが、心臓の発生過程や心臓形態の詳細な解析は行われていない。

我々が作出した *Wnt3a* ex1 マウスを交配して得られた胎児は、既報の *Wnt3a* ヌル変異マウスと同様に胎生致死であり、前後軸の伸長不全と左右軸の異常を示した。*Pitx2* の LPM での発現パターンと左右軸の指標である心臓ルーピングのパターンを詳細に検討したところ、正常では左側 LPM に発現している *Pitx2* が、*Wnt3a* ex1/ex1 ヌル胚では両側に *Pitx2* が発現する左側相同パターンと、両側で発現が消失する右側相同パターンが観察された(左側相同 20%、右側相同 15%、正常 65%、 $n=20$) (図 1)。また心臓の形態は正常の D-loop が 40%、左右逆転した L-loop が 35%、ルーピングが起こらない X-loop が 25%であった ($n=20$) (図 1)。また X-loop を示す胚では *Pitx2* の発現が頭側で減弱し、尾方に局限していることが明らかになった。

(3) 飼育環境による血中代謝産物がマウス胚に与える催奇形作用の解析

飼育環境の異なる *Wnt3a* ex1 マウスから得られた *Wnt3a* ex1/ex1 ヌル胚の左右軸表現型比率が異なることから、給餌飼料による影響が考えられた。(2) の実験で使用した飼料 1 飼育群に対して、飼料 2 飼育群では、D-loop が 11%、L-loop が 67%、X-loop が 22%であった ($n=18$)。実験的にレチノイン酸を妊娠母体マウス、あるいは培養胚に投与すると、胚に内臓錯位症候群を引き起こすことが知られている (Wasiak and Lohnes, 1999; Chazaud et al., 1999)。我々はレチノイン酸シグナルのレポーターマウス RARE-hspLacZ マウスに、レチノイン酸合成酵素 ALDH1A1 の阻害剤 WIN18446 を投与したところ、得られた 8.0 日胚の X-gal 染色域が心臓および胚後方領域で減退することを見出した。また、RARE-hspLacZ マウスにストレプトゾトシンを投与して作出した糖尿病母体にビタミン A 精製飼料を投与したところ、胚後方での X-gal 染色域が増強することが明らかとなった。

レチノイン酸代謝酵素である *Cyp26a1* のヌル変異胚では尾芽領域における *Wnt3a* の発現が低下していることから (Sakai et al., 2001) 母体糖尿病で内臓錯位症候群を発症する機序として、レチノイン酸と *Wnt3a* の関連性が強く示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koga Tomoaki, Sasaki Fumiyuki, Saeki Kazuko, Tsuchiya Soken, Okuno Toshiaki, Ohba Mai, Ichiki Takako, Iwamoto Satoshi, Uzawa Hirotsugu, Kitajima Keiko, Meno Chikara, Nakamura Eri, Tada Norihiro, Fukui Yoshinori, Kikuta Junichi, Ishii Masaru, Sugimoto Yukihiko, Nakao Mitsuyoshi, Yokomizo Takehiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of leukotriene B4 receptor 1 defines functionally distinct DCs that control allergic skin inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41423-020-00559-7	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rie Saba, Keiko Kitajima, Yasuhiro Shintani, Yoshiaki Kanai, Masami Kanai-Azuma, Chikara Meno, Rumiko Saga, Ken Suzuki, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Hideya Yamazaki, Kei Yamada, Kenta Yasuhiro
2. 発表標題 Sox17 expression in the endocardium precursor cells regulates the mouse heart development
3. 学会等名 日本分子生物学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院医学研究院発生再生医学分野 ー研究内容ー https://www.lab.med.kyushu-u.ac.jp/dev/research/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------