

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：3 2 3 0 5

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：2 3 6 5 0 4 8 9

研究課題名（和文）

糖尿病妊娠モデルラットを利用したエピジェネティック解析

研究課題名（英文）

Epigenetic analysis in the diabetic mother rat

研究代表者

小浜 智子 (KOHAMA TOMOKO)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：0 0 3 6 4 7 0 3

研究成果の概要（和文）：糖尿病母体から生まれた子供には肥大型心筋症などの合併症がおこることが報告されている。そこで、糖尿病母ラットに高脂肪食を与え、生まれた仔や孫に与える食餌の影響を検討した。妊娠糖尿病ラットとコントロールラットに普通食、高脂肪ラード食、高脂肪魚油食をそれぞれ与え実験を行い、生まれた新生仔の心臓について検討した。糖尿病妊娠ラットが高脂肪食を摂取すると、仔の出生時血糖値や中性脂肪値が高くなり悪影響を及ぼすことが示された。また、分子レベルでシグナル伝達系を解析したところ、その悪影響は新生児の心臓においてもみられ、インスリン抵抗性が亢進していることが分かった。しかし、魚油の投与によりインスリンシグナルは改善された。これらの結果から母親が糖尿病であると生まれた仔は親の糖尿病の影響を受け、さらに胎生期の栄養状態がそれらを悪化させると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Objective: Newborns of diabetic mothers have abnormal circulatory organs, so in this study, we explore insulin signaling in the newborn rat heart. Methods: Pregnant rats were divided into streptozotocin-induced diabetic and control groups. Rats were fed lard, fish oil, or a control diet. To examine changes in insulin signaling in the hearts in infants of diabetic mothers (IDM) in relation to diet, we isolated the hearts from the IDM and control infants and determined the phosphorylation levels of Akt308, Akt473, p38, JNK and ERK, and the expression levels of PDK1 and mTOR. Results: The mean blood glucose levels in the DM group and their infants were significantly higher than those in the CM group and their infants, but the mean blood glucose levels of all infants was normal on post-natal day 4. Phosphorylation levels of Akt Thr 308 and Akt Ser 473 and the expression levels of PDK1 and mTOR were lower in IDM than in control infants. The phosphorylation level of Akt Ser 473 and the expression level of mTOR increased in IDM fed the fish-oil diet compared with those fed the lard diet. Conclusion: Fish-oil may improve cardiac Akt-related signaling in the offspring of diabetic rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活

キーワード：糖尿病・妊娠・魚油・インスリンシグナル

1. 研究開始当初の背景

遺伝性があるといわれる疾患は、常識的にはDNAを介して子孫に伝わると考えられている。しかし、研究者代表らは、心血管研究の中で、偶然に、遺伝的背景が無くても、同じ症状が子孫に伝わる手かかりを掴んだ。具体的には、ストレプトゾトシン処理により人工的に発症させた糖尿病妊娠ラットから生まれた仔と孫に、遺伝的なバックグラウンドがないにもかかわらず糖尿病の特徴が現れた。特に孫においては、母体は全く正常であるためエピジェネティクスの対象たりうる可能性をもつ。本研究では、蛋白質レベルでインスリンシグナル系の異常を捉えることを中心にして、研究計画に示した解析を行い、現行のDNA→RNA→蛋白質発現のセントラルドグマに挑戦したい。

2. 研究の目的

胎生期の栄養状態は出生後の糖脂質代謝異常、心血管障害に関与することが知られている。正常妊娠において食事は母体の栄養状態、さらには胎児の栄養状態や母体の出産後の体力回復に影響する。妊娠期の栄養(胎児期)は出生後の一生の健康、あるいは次世代へ著しい影響を与えることが明らかになってきた。このことから糖尿病妊婦における食事管理は必須であり、胎児の発育に与える影響も大きい。例えば正常妊娠ラットに高脂肪食を与えた場合、生まれた仔のβ細胞の発達に障害が起こり高血糖になるという報告や高脂肪食と高炭水化物を与えたラットではインスリンの分泌が低下する症例も報告されている。また、著者が既に報告した糖尿病妊娠モデルラットに高脂肪食を与えた実験でも生まれた仔への脂質代謝異常が示され

ている。

そこで、本研究ではストレプトゾトシン(以下STZと略す)投与による糖尿病モデルラットを用い、そのモデルラットに高脂肪食(ラード、魚油)を摂取させた場合、それらが仔から孫へどのような影響を及ぼすか心臓のシグナル伝達系に着目して検討を行った。一方、臨床的には糖尿病の親より生まれた子供には肥大型心筋症などの心疾患が認められる。そこでシグナル伝達系の解析を行う臓器を心臓にしぼり、親の高血糖が子や孫のシグナル伝達系に与える影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

糖尿病妊娠ラットの作成

妊娠1日目のWistarラット(200~250g、日本クレア)をランダムに2群に分け、糖尿病モデル群(D)とコントロール群(C)で実験を行った。糖尿病モデルラットは妊娠4日目にSTZ(ストレプトゾトシン、Sigma)を50mg/kgになるように200μlのクエン酸バッファーに溶解し、尾静脈投与することにより作成した。コントロールラットには同じ方法にて生理食塩水を投与した。

飼育方法

餌は普通食(C、日本クレア社、脂肪7%)、高脂肪ラード食(L、脂肪21%)、高脂肪魚油食(F、脂肪21%)それぞれ与え、C-C、C-L、C-F、D-C、D-L、D-Fの6群で行った。実験には、親ラットから生まれて4日目の新生仔を実験には用いた。血糖値・中性脂質・インスリンシグナルについて検討した。

血液生化学的検査

血液は心臓より全採血し、3000g、10分遠心し血清を得た。血清は、測定まで -80°C で凍結保存した。血糖値は、妊娠1、7、14、22日目に尾先端より採取した血液で測定した。血清中性脂肪は、トリグリセライドEテストワコー(和光純薬工業)を用いて測定した。

心臓から全蛋白質の抽出

ラットの新生仔心臓は出生4日目に摘出し、液体窒素で凍結後粉碎した。心臓は1群あたり12~15匹より摘出し、可溶性蛋白質を抽出するため、心臓1mgあたり $200\mu\text{l}$ のT-PERバッファー(PIERCE社)を加え、超音波でホモジナイズした。40000rpm、 4°C 、30分間の超遠心により上清を分離し、分析を行うまで -80°C で凍結保存した。

ウェスタンブロット

新生仔心臓より抽出した蛋白質はシグナル伝達系に関わる種々の蛋白質の抗体を用いて以下に示すようにウェスタンブロット法により解析を行った。 $30\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ に調整した蛋白質は、12.5%のSDSポリアクリルアミドゲルに電気泳動法により分離後、蛋白質はニトロセルロースメンブレンにウェット式のGENIE Electrophoretic Transferを用いて24V 45分で転写した。メンブレンはTBST(5% Tween-0.15M NaCl, 50mM Tris-HCl pH7.6)で5分間3回洗浄後、ブロッキング溶液(5%スキムミルク-TBST)にて1時間振とうすることによりブロッキングを行った。一次抗体(抗Akt抗体、抗JNK抗体、抗p38抗体、抗ERK抗体、抗p-Akt473抗体、抗p-JNK抗体、抗p-ERK抗体、抗p-p38抗体、すべてCell Signaling)は5%BSAを含むTBSTで1/1000に希釈し、メンブレンを 4°C で一晩反応させた。TBSTで未反応の一次抗体を洗浄した後、

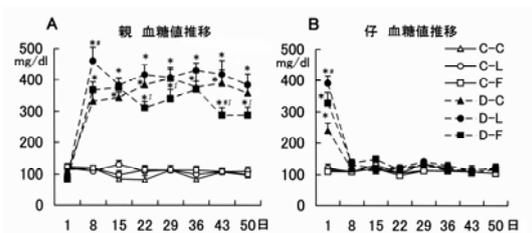
ブロッキング溶液で1/5000に希釈した二次抗体を室温で1時間反応させた。未反応二次抗体を除去した後、ECL試薬(GE Healthcare)を用いて化学発光を行い、イメージアナライザーで検出し定量解析した。

リン酸化のレベルは総蛋白質量をアクチン量で平均化し、リン酸化の割合をC-Cを1として相対値として表した。統計学的処理は、Student's t testを用いて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

(1) 親・仔の血糖値の推移

親の血糖値はコントロールラットと比較すると糖尿病ラットの3群でもに有意に高値を示したが、魚油食(D-F)では平均血糖値が $334 \pm 39\text{ mg/dl}$ で、同量の脂肪を摂取しているラード食(D-L)の $414 \pm 27\text{ mg/dl}$ 、普通食(D-C)の $370 \pm 26\text{ mg/dl}$ より低値を示した。仔ラットの出生時血糖値は、糖尿病ラット(D-C、D-L、D-F)ではコントロールラットと比較してすべての群で有意に高値を示したが、成長に伴いするにつれて正常値まで低下した。



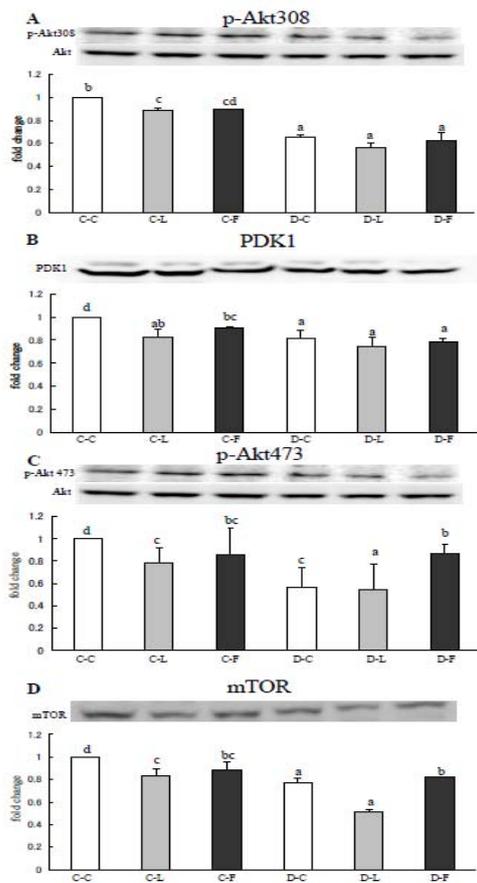
(2) 親・仔の中性脂肪値

親の中性脂肪はコントロールラットのラード食(C-L)では、普通食(C-C)と比較して影響は見られなかった。一方、糖尿病ラットのラード食(D-L)で有意に高値を示した(未記載データ)。仔の中性脂肪は糖尿病ラットのラード食(D-L)において、普通食(D-C)と比較して高値を示したのに対し、魚油(D-F)では低値を示した。コントロールラットにおいて

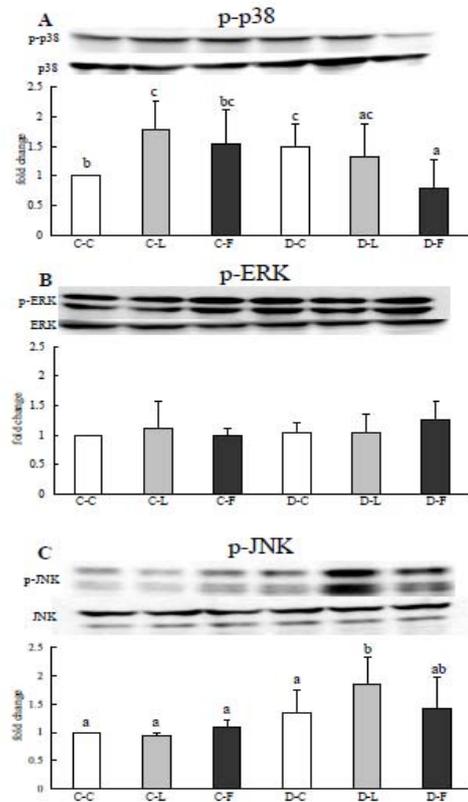
は、普通食(C-C)、ラード食(C-L)、魚油食(C-F)で中性脂肪値に差は認められなかった。

(3) 仔ラット心臓におけるシグナル伝達系

糖尿病ラット、コントロールラットの親から生まれた仔ラットのインスリンシグナリングについて解析した結果、Akt のリン酸化レベル (Akt Thr308 と Akt Ser473) の低下や上流にある mTOR や PDK1 のキナーゼの発現量の低下が示され、糖尿病の母親から産まれてきた子供は成長に伴い見かけ上は正常になっているにもかかわらず分子レベルではインスリン抵抗性が惹起された状態になっている事を明らかにした。MAP キナーゼシグナル伝達系の JNK、ERK については、糖尿病の仔においてリン酸化レベルの増加が観察された。



糖尿病親ラットに普通食、魚油食、ラード食を与え、生まれた仔の Akt473 のリン酸化レベルと Akt の上流にある mTOR の発現量を調べたところ、ラードではそれらは低下しインスリン抵抗性を示したが、魚油食の摂取でそれらのシグナルが改善した。また MAP キナーゼのリン酸化レベルは通常、糖尿病では高くなる傾向があるが、魚油食を与えた場合はラード食よりリン酸化レベルが低下した。これらの結果から、魚油食が Akt や MAP キナーゼシグナル経路のシグナリングを正常に戻す役割を担っている可能性が示唆された。分子レベルにおけるインスリンシグナル伝達系の解析により、魚油食が糖尿病に関連するシグナル伝達を改善する傾向が認められた事は非常に興味深い。このことは妊娠糖尿病の母親が胎児期に摂取する脂質の違いが次世代に渡って糖尿病の改善に寄与している可能性を示した。



(4) 孫ラット心臓におけるシグナル伝達系

孫ラットの糖尿病ラット心臓におけるインスリンシグナリングやMAPキナーゼのリン酸化レベルを仔ラットと同様の方法で調べた。Aktのリン酸化レベルは餌の違いによる差は認められなかった。

p38のリン酸化レベルでは普通食(D-C)でコントロールラット(C-C)より有意に低下した。ERKのリン酸化レベルは普通食(D-C)と魚油食(D-F)で有意に低下した。またJNKのリン酸化レベルは普通食(D-C)、ラード食(D-L)でコントロールラット(C-C)と比較して有意に増加した。

分子レベルにおけるインスリンシグナル伝達系の解析により、魚油食が糖尿病に関連するシグナル伝達を改善する傾向が認められた事は非常に興味深い。このことは妊娠糖尿病の母親が胎児期に摂取する脂質の違いが次世代に渡って糖尿病の改善に寄与している可能性を示した。

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1件)

1. R Nasu-Kawaharada, A Nakamura, S Kakarla, E Blough, K Kohama, T Kohama, A maternal diet rich in fish-oil may improve cardiac Akt-related signaling in the offspring of diabetic mother rats. Nutrition, 2013, 29, 688-692, doi: 10.1016/j.nut.2012.11.017., 査読有

[学会発表] (計6件)

1. Ritsuko Kawaharada, Akio Nakamura, Effect of EPA on skeletal and cardiac muscle of infants of diabetic mother rats. 日本薬理学会, 2013.3 福岡

2. 大友 崇, 篠崎博光, 河原田律子, 小浜智子, 妊婦の栄養指導教材に関する検討, 日本糖尿病・妊娠学会, 2012.11 東京

3. 河原田律子, 増田春菜, 中村彰男, 小浜智子, EPAを投与した糖尿病妊娠ラットから生まれた仔への影響, 日本糖尿病・妊娠学会, 2012.11 東京

4. 河原田律子, 中村彰男, 小浜智子, 高血糖

の妊娠ラットがEPAを摂取した場合に生まれた仔へ与える影響, 日本糖尿病学会, 2012.5 横浜

5. R Nasu-Kawaharada, A Nakamura, Effect of a high-fat diet on the skeletal muscle and the heart of diabetic mouse, International Diabetic Federation, 2011.12 Dubai, UAE

6. 河原田律子, 中村彰男, 小浜一弘, 小浜智子, 脂質の異なる高脂肪食を与えた糖尿病妊娠マウスにおける骨格筋および心臓のシグナル伝達系の変化, 日本糖尿病学会, 2011.5 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小浜 智子 (KOHAMA TOMOKO)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号: 0036470

(2) 研究分担者

河原田 律子 (KAWAHARADA RITSUKO)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助教

研究者番号: 60383147

中村 彰男 (NAKAMURA AKIO)

群馬大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 30282388

小浜 一弘 (KOHAMA KAZUHIRO)

群馬大学・名誉教授

研究者番号: 30101116