

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870906

研究課題名(和文) 栄養不足に起因する胎児の膵臓 細胞の発生障害の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Developmental defects in the fetal pancreas by the maternal undernutrition during pregnancy

研究代表者

安永 菜由 (Yasunaga, Mayu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：70712181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では胎児期低栄養によるII型糖尿病発症メカニズムの解明を目的に、膵臓 細胞の増殖やインスリン合成に関わる骨形成マーカーであるオステオカルシンが骨形成不良だけでなく、膵臓 細胞の発生障害に関わるか検証した。  
妊娠後期での50%制限給餌で得られた新生児は既報の通り、低体重を呈し、膵臓の膵島領域の縮小が観察された。また骨組織長の変化は見られないものの、骨重量の減少が観察された。さらに血中のオステオカルシン量は減少しており、この減少による膵臓 細胞の発生障害の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism involved in type II diabetes by the mother's undernutrition during pregnancy, we developed an animal model of undernutrition by maternal caloric restriction and verified whether bone formation markers osteocalcin was related with the developmental defects of the fetal pancreatic beta cells, because osteocalcin regulating not only the bone formation but the proliferation of beta cells and insulin secretion.  
We subjected pregnant mice to 50% food restriction during the last week of gestation, newborn was small at birth and pancreatic islet regions decreased, as previous reports. Interestingly, neonatal bone weight decreased even though bone length didn't change. Moreover, osteocalcin in blood markedly decreased, these results indicated that developmental defects in the fetal pancreatic beta cells may be related to reduction of osteocalcin in blood.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：妊娠期低栄養 オステオカルシン 骨形成 膵臓 細胞

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵臓は血糖値の恒常性維持に関わる臓器の1つで、特に細胞は血糖値を下げるインスリンを分泌する唯一の細胞である。そのため、細胞数の減少や機能低下は高血糖状態を引き起こし、II型糖尿病を発症させる。一方、これまでの大規模な疫学調査により、妊娠期での母親の栄養不足は、体重2500g以下の低体重児の出生頻度を増加させるばかりでなく、生まれた低体重児の成人期でのII型糖尿病の発症率をも増加させることが報告されていた。この「低体重で生まれた人で成人期に罹患しやすいII型糖尿病」の発症原因の1つとして、「胎児期での細胞の発生障害」が挙げられていたが、その分子メカニズムは関与し得るmiRNAなど不明な点が多く残されていた。

(2) 膵臓細胞の増殖やインスリン合成に骨形成マーカーであるオステオカルシンが関わることが報告されていた。これより骨と膵臓の臓器間相互作用は糖代謝に非常に重要で、胎児期低栄養による低体重児では骨形成不良が顕著に見られることから、骨形成不良が細胞の発生、機能障害を引き起こし、2型糖尿病発症に関わる可能性があると考えた。

### 2. 研究の目的

当初、本研究では胎児期低栄養によるII型糖尿病発症メカニズムの解明を目的に、栄養不足により胎児の膵臓で発現の変動するmiRNAに着目し、その標的遺伝子の同定およびmiRNA発現におけるエピジェネティックな発現制御の関与を検証することとしていた。しかし、研究開始直後それに関わる報告が発表されたため、骨形成不良の分子メカニズムおよび膵臓細胞の発生・機能への影響を検証することで、「胎児期低栄養による骨形成不良と2型糖尿病発症の関連性」を解明することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 低体重児II型糖尿病発症モデルの作製 (図1)

日本クレアより購入し馴化した10週令のICR雌マウスをICR雄マウスと交配し、交配翌日プラグを確認した雌マウスを妊娠0.5日とした。モデル(FR50%)群は妊娠0.5-13.5日でオリエンタル酵母社製飼料MFを自由給餌で、13.5-18.5日はオリエンタル酵母社製飼料MFAIN-93Mをコントロール群の半分量を与え、18.5日以降および哺育期間はMFを自由給餌で与えた。飲水はいずれの期間も自由飲水で与えた。出産方法は自然分娩とし、産後の育児は仔数を6匹にそろえ、引き続き同マウスを使用し哺育させた。

コントロール群は6腹、FR50%群は3腹で実験を行い、サンプリングは新生児(0日令)でコと成体(5週令)でそれぞれ行った。そ

の際、コントロール群では同腹仔で雌雄1匹ずつ、FR群では同腹仔で雌雄2匹ずつ行った。

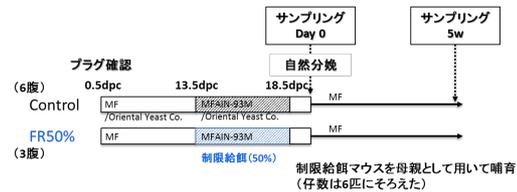


図1, 実験の流れ

#### (2) 血中オステオカルシン量の測定

採血管で採血後、遠心分離により血漿を回収した。血中オステオカルシン濃度は、タカラバイオ社製の Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (MK127) および Mouse Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (MK129) を用いて測定した。

(3) 骨組織、膵臓、脾臓、肝臓のHE染色  
採取した組織は4%パラホルムアルデヒドで固定し、HE染色を行った。成体の骨組織においては10%EDTAにより脱灰後、染色を行った。

#### (4) 大腿骨、頭蓋骨長の測定

各組織を採取した後、定規を横に添えた状態で真上より写真を撮影した。その後、ImageJで各組織長を測定した(図2)。

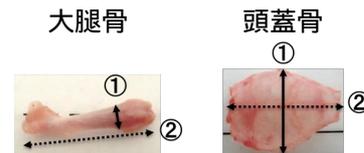


図2, 各組織長の測定

### 4. 研究成果

#### (1) 低体重児II型糖尿病発症モデルの作製 妊娠マウスの摂餌量および体重の変動

モデル動物の作製のため、コントロール群の妊娠13.5-17.5日で摂餌量を測定したところ、5gから7gと16.5日まで緩やかに増加することが分かった(図3,左)。また摂餌量をその半分量与えたFR50%群では、妊娠マウスの体重が減少することが確認できた(図3,右)。

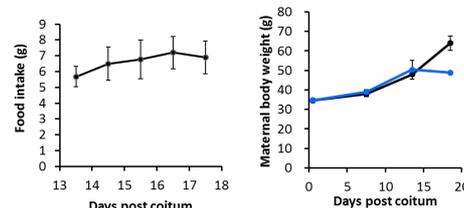


図3, 妊娠マウスの摂餌量および体重変動

一方、産仔数はコントロール群で13-16匹、FR50%群で7-13匹と減少傾向が観察されたが、

n 数が少ないことより、再度検証が必要であると考えている。

#### 出生時の体重

FR50%群はコントロール群の約 80%と低体重児であることが確認できた(図 4, 上段)。また同腹仔別に比較しても、同様に FR50%群では体重の減少した個体が多いことが確認できた(図 4, 下段)。

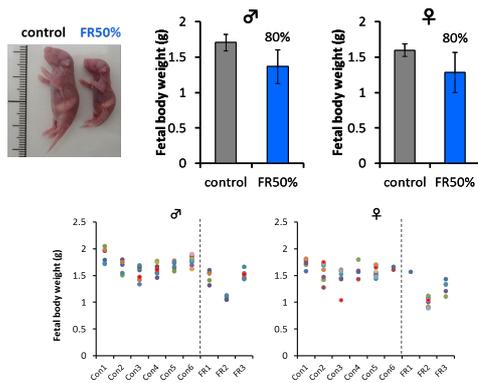


図 4, 新生児の体重

#### 新生児の膵島領域

モデル動物作製の妥当性を評価するため、既報である低体重児の膵島領域の縮小という表現型について、新生児の膵像を用いて HE 染色を行い検証した。結果、FR50%群はコントロール群と比較して、膵島領域の縮小が観察された(図 5, 上段)。これよりモデル動物は作製できたと判断した。また膵臓の重量を測定したところ、FR50%群では顕著な減少が見られなかったことから、膵島領域の細胞分化障害の可能性が予想された。一方、脾臓は重量の減少傾向が観察され、肝臓の重量は変化しなかった(図 5, 下段)。

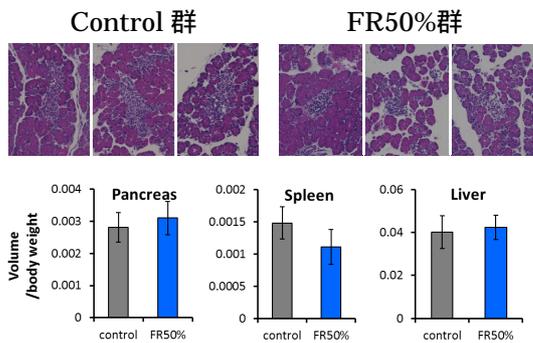


図 5, 新生児の膵臓、脾臓、肝臓

#### (2) 低体重児での骨形成不良の評価

##### 骨組織重量および骨組織長

大腿骨および頭蓋骨について、重量およびその長さを測定した結果、重量は顕著な減少が見られたものの(図 6, 上段)、長さは重量と比較すると減少の割合が小さく、あまり変化していないことが明らかとなった(図 6, 下

段)。これより、サイズには影響が少ないが、骨密度など骨組織を構成する細胞の増殖や分化に影響を与えている可能性が示唆された。

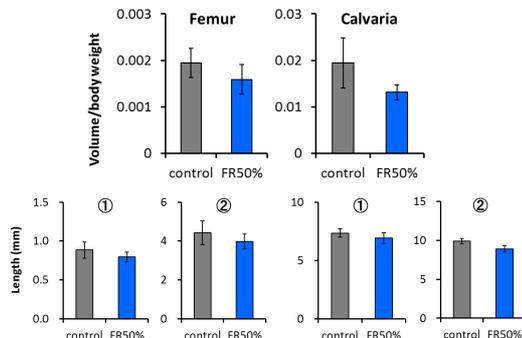
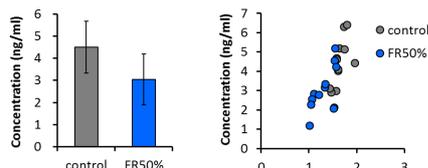


図 6, 骨組織重量と骨組織長

#### 血中オステオカルシン量

オステオカルシンには膵細胞の増殖やインスリン分泌に関わる Glu 型と骨形成のマーカーとして骨芽細胞の分化に関わる Gla 型が存在する。そこで血中のそれぞれのオステオカルシン量を測定した。その結果、FR50%群では Glu 型が顕著に減少しており、その量は体重と相関していることを初めて明らかにした(図 7, 上段)。一方、Gla 型は変化がみられず、体重との相関関係も観察されなかった(図 7, 下段)。

#### Glu 型



#### Gla 型

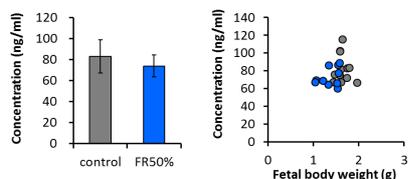


図 7, 血中オステオカルシン量

以上より、FR50%群で生じる低体重児での骨形成不良は Glu 型オステオカルシンの分泌量の低下を招き、膵臓細胞の分化を障害している可能性が示唆された。

#### (3) 低体重児の体重変動と体重増加率

FR50%群の低体重児が出生後、コントロール群に体重がキャッチアップされるか検証するため、引続き体重を計測した。その結果、徐々に体重が増加し、約 1 ヶ月令で追いつく様子が観察された(図 8, 上段)。また既報に従い体重増加率を計算したところ、1 腹に

については顕著な増加が観察された（図 8, 下段）。一方、もう 1 腹については増加がみられず、これは仔数を 6 匹と少ない数でそろえた事などが影響している可能性を考えている。いずれも n 数を増やし検証する必要があると考えている。

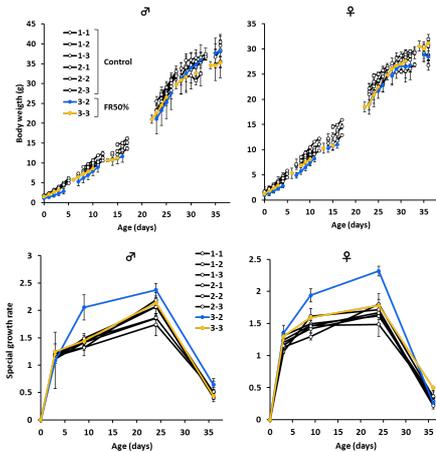


図 8, 体重変動と増加率

#### (4) 5 週令での骨形成評価

##### 骨組織重量および骨組織長

体重と同様に骨組織重量がキャッチアップされているか明らかにするため、5 週令の各組織について重量および長さを測定した。雄では大腿骨、頭蓋骨および肝臓の重量はコントロールに追いつくことが明らかとなった（図 9, 上段）。また長さについても同等であることが観察された（図 9, 下段）。また雌に関しても同様の結果が得られた（データ略）。以上より、雌雄ともに体重のキャッチアップに加え、骨重量もキャッチアップされることが明らかとなった。

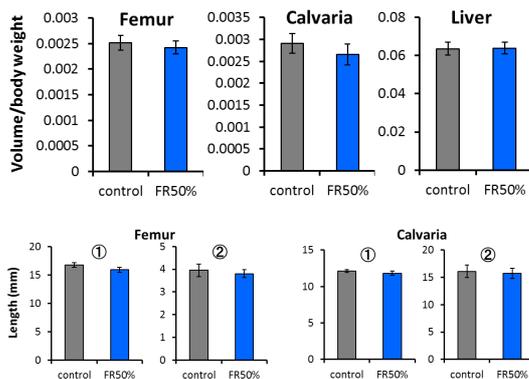


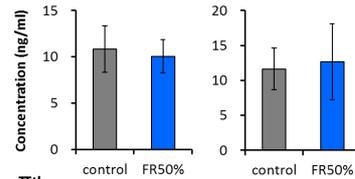
図 9, 骨組織重量と骨組織長(5 週令)

##### 血中オステオカルシン量

次に血中オステオカルシン量も 5 週令ではキャッチアップされているか明らかにするため、Glu 型、Gla 型のオステオカルシンをそれぞれ測定した。その結果、雌雄ともに同等量が血中に分泌されていることが明らかにされた（図 10）。以上より、出生時に確認さ

れた骨不良およびそれと深く関わるオステオカルシンの血中量の低下は成長とともに改善され、コントロール群と同等量までキャッチアップされることを初めて明らかにした。

##### Glu 型



##### Gla 型

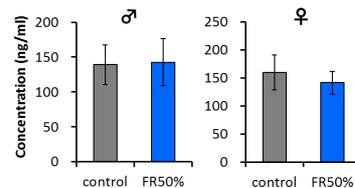


図 10, 血中オステオカルシン量(5 週令)

#### < 引用文献 >

Boujendar S, et al. Diabetologia. 2002  
 Fulzele K, et al. Cell. 2010  
 Alejandro EU, et al. J Clin Invest. 2014  
 Jimenez-Chillaron JC, et al. Diabetologia. 2006

5. 主な発表論文等  
 該当なし。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安永 茉由 (YASUNAGA Mayu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員  
 研究者番号：70712181