2021年度学内研究助成 成果報告書

① 報告者所属・氏名

生活科学部 食生活科学科・中村彰男

② 事業名

妊娠糖尿病妊婦における胎生期脳プログラミングと先制医療

③ 事業の目的

現在、日本では、晩婚化が進み３５歳以上で第一子を生む「高齢出産」が増えている。2010年にはとうとう第一子の出産平均年齢が３０歳を超えた。このことは日本の少子化を加速させるばかりでなく、生まれてきた子どもの健康にも大きな影響与える。高齢出産には様々なリスクがあるが、妊娠することで母体の血糖値が高くなる妊娠糖尿病の患者が増えている。妊娠糖尿病では、妊婦の子宮内高血糖環境が生まれてきた子供の将来の疾病発症に大きな影響を与えることが知られている。我々は独自の糖尿病妊娠モデルラットと疾患モデル細胞を用いて分子レベルでその疾病発症メカニズムの解析を行ってきた。糖尿病妊娠モデルラットのお母さんから生まれた仔の胎児脳を調べたところ、神経グリア細胞の一つである神経アストログリアで、多くの蛋白質の過度の糖化（Advanced Glycation End Products; AGEs）が亢進されていることを発見した。近年、神経アストログリアはニューロンへの栄養供給だけでなく、軸索伸展やシナプス可塑性の制御などを介して学習や記憶にも影響を与えることが明らかとなっている。脳における AGEs 化の亢進は、成人では糖尿病合併症の中でもとりわけアルツハイマー病などをはじめとする神経変性疾患との関連が指摘されている。そこで、脳神アストログリアに AGEs がどのように関与するかを分子レベルで解明することを目的として研究を行った。

④ 事業実績・研究成果（具体的に）

<u>方法：</u>ヒト胎児アストログリア（単一ドナー由来）は Cell Applications, Inc.（San Diego, CA,U.S.A.）より購入した。ヒト胎児アストログリア細胞は control の 100 mg/dL のグルコースを含む Low 培地（Low; DMEM, 100 mg/dL glucose, 10 % FBS, 5 % HS, P/S, 5 ng/mL b-FGF, 5 ng/mL EGF）と 450 mg/dL の高グルコースを含む High 培地（Low; DMEM, 100 mg/dL glucose, 10 % FBS, 5 % HS, P/S, 5 ng/mL b-FGF, 5 ng/mL EGF）、高グルコースの High

培地に 3 種類の機能性脂質である CPA（200 μM）、TPA（200 μM）、EPA（200 μM）をそれぞれ添加したもの、DMEM 培地（Low）に 300 μg/mL の AGEs-BSA を暴露したものそれぞれの６群で、37 ℃、5 % CO_2 で 72 時間培養を行った。細胞からの RNA の抽出は FastGene™ RNA Premium Kit（日本ジェネティクス、東京、日本）を使用し、添付のプロトコールに従いゲノム DNA の除去を全 RNA 抽出と同時に行った。得られた全 RNA はAgilent RNA6000 nano kit（Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.）を用いて Agilent 2100 バイオアナライザー（Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.）にてクオリティーチェックを行った。クオリティーチェックで測定した RIN の値が、RIN>7 で次世代シーケンサーのライブラリー作成に問題がない品質と判断し、次のライブラリー作成に進んだ。150 ng の全 RNA を鋳型に KAPA mRNA HyperPrep Kit（KAPA Biosystems, Roche, Basel, Switzerland)を用いて次世代型シーケンサー用のライブラリー調整を行なった。次世代型シークエンスは Illumina NextSeq500（Illumina, San Diego, CA, U. S. A.）にて、NextSeq500 High Output Kit v2.5（Illumina, San Diego, CA, U. S. A.）を用いて 43bp のペアエンドシーケンスを行なった。STAR_2.5.3a を用いて hg19 に対してアライメント調整を行い、RSEM_1.3.3 にて遺伝子ごとのカウント値や発現量に相当するカウントデータおよび Transcripts per million（TPM）を取得した。正規化および発現変動遺伝子の抽出には、TCC-iDEGES-DESeq を用い、$p<0.05$ をもって有意と判断した。発現変動遺伝子群を Ingenuity Pathway Analysis
（IPA）を用いてバイオインフォマティクス解析を行った。

<u>結果と考察：</u>アストログリア細胞は血液脳関門を形成し、血液から大脳への物質の通過制御や神経細胞への栄養供給などに多大な役割を演じている。これまで、我々はラット胎児より摘出した初代ラット胎児アストログリア細胞を妊娠糖尿病の子宮環境を模倣した高グルコース環境に曝す細胞モデルの構築に成功した。この細胞モデルを用いた予備的実験から、初代ラット胎児アストログリア細胞を高血糖環境に曝すと、細胞内のタンパク質の過度な AGEs 化が引き起こされることが明らかとなっている。この過度な AGEs の生成は細胞内で活性酸素を発生させ、炎症シグナルを引き起こすと考えられている。そこで、高グルコースや AGEs をヒト胎児アストログリアに暴露し、実際に炎症性シグナルが誘導されているか否かをその関連遺伝子の変動を次世代型シーケンサーにて解析した。全遺伝子のリードデータを主成分分析（PCA; Principal Component Analysis）により解析した TPM 正規化遺伝子発

現プロファイリングから、ヒト胎児アストログリアを高グルコース濃度で培養すると、コントロールと比較して、増殖や炎症シグナル関連遺伝子発現プロファイルが有意に発現上昇することが示された。また、AGEs-BSA を暴露させるとその遺伝子発現プロファイルは高グルコース培養で見られた遺伝子プロファイルに近くなることも明らかとなった。さらに、高グルコース培地に、n-7 系不飽和脂肪酸のパルミトレイン酸（CPA,TPA）や n-3 系不飽和脂肪酸の EPA を投与した際の遺伝子発現プロファイルを解析すると、低グルコース培養下に近い遺伝子発現プロファイルが示された。このことからヒト胎児アストログリアは高グルコースや AGEs-BSA の暴露により増殖や炎症シグナル関連遺伝子が誘導されることが明らかとなった。この高血糖環境による、炎症関連遺伝子の発現は機能性脂質（CPA、TPA あるいは EPA）を高血糖環境に曝した神経アストログリア細胞にを投与することで、それらの遺伝子発現が抑えられることが明らかとなった。

結論：神経アストログリア細胞では高血糖環境により、増殖や炎症性シグナル関連遺伝子の発現を誘導することが、網羅的遺伝子解析により明らかになった。このことから、高血糖環境で見られる細胞内シグナル伝達系の異常シグナルはこの炎症性シグナルにより引き起こす可能性が考えられる。さらに、機能性脂肪酸である CPA、TPA あるいは EPA は高血糖環境における細胞内シグナル異常を改善する可能性が示唆された。

⑤ 研究成果の発表・活用（学会発表・論文掲載・地域連携・産学連携など）

【学会発表】

1）中村彰男、大上桜香、鳥海旭世、吉崎瞳、大金恵利子、河原田律子、Effects of an intrauterine hyperglycemic environment on fetal brain neurons、第 95 回日本薬理学会年会、福岡、ハイブリッド開催、2022 年 3 月 7-9 日

2）　大上桜香、野口礼於奈、中村彰男、河原田律子、妊娠中の高血糖環境が脳神経細胞に与える影響 -n-7 系不飽和脂肪酸の効果-, 第 43 回日本臨床栄養学会, web 開催、2021 年 10 月 2 日

3）　大上桜香、中村彰男、寺嶋彩里、吉木姫織、鳥海旭世、野口礼於奈、河原田律子、子宮内高血糖環境で生じる脳神経細胞の炎症シグナルを n-7 系不飽和脂肪酸は改善できるか？、第 68 回日本栄養改善学会、誌上開催、2021 年 10 月 1 日

4）　野口礼於奈, 中村彰男, 星野瑞月, 木内理彩, 栗田楓, 河原田律子, 劣化油脂が心血管系に与える影響について心筋モデル細胞を用いて評価する, 第 68 回日本栄養改善学会、誌上、2021 年 10 月 1 日

5）　吉崎瞳、鳥海旭世、大金恵利子、大上桜香、河原田律子、上岡由茉、中村彰男、妊婦の子宮

内高血糖環境による終末糖化産物の蓄積が骨格筋芽細胞に与える影響、誌上開催、第 68 回日本栄養改善学会、2021 年 10 月 1 日

6)　大上 桜香、河原田 律子、中村 彰男、子宮内高血糖環境において機能性脂質が脳神経細胞に与える影響、第 10 回日本 DOHaD 学会学術集会、web 開催、2021 年 9 月 3、4 日

7)　Yoshizaki, H., Tokunaga, Y., Toriumi, A., Kawaharada, R., Ishida, C., Hori, M., Nakamura, A., Palmitoleic acids suppress skeletal muscle differentiation in a hyperglycaemic environment, The 8th International Conference on Nutrition and Growth, 3-4 October 2021, Virtual Conference.

8)　Okami, H., Nakamura, A., Toriumi, A., Kawaharada, R., Effect of hyperglycaemic intrauterine environment on brain neuronal morphology. The 8th International Conference on Nutrition and Growth, 3-4 October 2021, Virtual Conference.

【原著論文】

1.　Tokunaga, Y., Yoshizaki, H., Toriumi, A., Kawaharada, R., Ishida, C., Hori, M., Nakamura, A.,＊″Effects of omega-7 palmitoleic acids on skeletal muscle differentiation in a hyperglycemic condition.″ *J. Vet. Med. Sci.* 83(9):1369-1377, 2021 ＊Corresponding Author

2.　青木敦子, 山崎壮, 中村彰男, 松島照彦 Resveratrol が紫外線照射ヒト皮膚繊維芽細胞のコラーゲン・エラスチン産生に及ぼす影響の解析、日本臨床栄養学会雑誌, 42(4):310-318, 2020

【総説】

3.　Nakamura, A.＊ and Kawaharada, R., Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in a Hyperglycaemic Environment. *In book: Fundamentals of Glycosylation*, 2021, DOI: 10.5772/intechopen.97234 ＊Corresponding Author

4.　河原田律子、大上桜香、小浜智子、中村彰男　細胞モデルで考える子宮内高血糖環境が脳神経系細胞の構築に与える影響　糖尿病と妊娠 21(2):73-75 2021

5.　Kawaharada, R. and Nakamura, A.,＊Future Risks for Children Born to Mothers with Gestational Diabetes: Elucidation Using the Cell Model Approach. *In book: Gestational Diabetes Mellitus- New Developments*, 2021, DOI: 10.5772/intechopen.100117 ＊Corresponding Author

6.　河原田 律子, 中村 彰男, 妊婦の栄養と免疫, 食と医療, 16, 50-56, 2021

7.　堀内 照夫, 遠藤　忠利, 河原田　律子　中村　彰男, 脂質・脂肪酸関連物質の使いこなし方－素材開発・機能創生・応用技術－,テクノシステム, 2020, 111-116

【教科書】

8.　佐々木康人・薗田 勝・中村彰男、サクセス管理栄養士・栄養士養成講座 『生化学 第5版』第一出版 2021、ISBN 978-4-8041-1439-2

9.　中村彰男（渡邉早苗・山田哲雄・武田ひとみ・橋詰和慶 編著)、スタンダード人間栄養学『基礎栄養学 第 3 版』2022、ISBN：978-4-254-61065-9

⑥ 今後の展開・継続性について

今後はこれらの遺伝子が実際にヒト神経アストログリア細胞にどのような影響を与えるかに関してシグナル解析をたんぱく質レベルおよび細胞レベルで解析する。そのために、ヒト胎児グリア細胞の不死化細胞株の作成を行う必要がある。