

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019

受付番号 20960769

氏名

楠山讓二

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ハーバード医科大学 （国名： アメリカ合衆国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
母体運動による生活習慣病予防効果の次世代伝播機構
3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 9 月 30 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名：ハーバード医科大学
部局名：ジョスリン糖尿病センター
5. 所期の目的の遂行状況及び成果
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

■本研究の背景

2 型糖尿病は、環境因子と遺伝的感受性の組み合わせから生じる複合疾患である。日本の糖尿病有病者は 1000 万人を超え(2016 年国民健康栄養調査)、米国でも 2030 年までに米国人口の 15%以上が糖尿病に罹患する可能性が報告されている(*Population health management* 2017)。そのため、糖尿病やその付随疾患が個人、公衆衛生、経済レベルでもたらす社会的コストの増大は世界的な重大課題である。更に、妊婦の過剰栄養や肥満は、子の将来的な糖尿病罹患率を増大させることが、ヒトおよび動物モデルによって明らかとなっている(*N Engl J Med* 1997, *Cell Metab* 2017)。すなわち、親の肥満、前糖尿病、糖尿病は自身の健康に害を及ぼすだけでなく、子に対して糖尿病をはじめとした慢性代謝性疾患の発症リスクを伝播させる悪循環を引き起こすと考えられる。妊婦の肥満による子への影響は、子宮内の過剰栄養が胎児の肝臓や骨格筋に取り込まれることに起因すると指摘されている(*J Clin Invest* 2009)。しかし、糖尿病の世代間連鎖を防ぐ効果的な予防方策や、それを実証するエビデンスは分かっていない。

習慣的運動は、グルコース恒常性を改善することで、2 型糖尿病や関連代謝障害の発症を予防・遅延させる、最も重要な要素の 1 つである(*Annals of internal medicine* 2013)。妊婦の肥満は、胎児の肝臓におけるトリグリセリド量には影響しないことから(*Nat Rev Genet* 2012)、子宮内環境において胎児のグルコース恒常性を維持することが、糖尿病の世代間連鎖を予防すると予想される。高脂肪食を摂取した母親から産まれた仔マウスでは、耐糖能障害、血清インスリン濃度と体脂肪の増加が認められるが、申請者の研究グループは、妊娠中の母マウスを車輪の設置された飼育ケージで飼い、自発運動させると、母親の肥満による仔マウスの耐糖能機能の低下を劇的に改善できることを報告した(*Diabetes* 2017)。生理学的にグルコース負荷に対する処理の大部分を担うのは骨格筋であるが、母親の運動は仔の筋における糖代謝に影響しなかった。一方で興味深いことに、母親の運動は仔マウスの肝臓における、インスリン感受性の増加、グルカゴン刺激によるグルコース産生の低下をもたらした(表1)。この成果は、母体運動は、仔の肝臓のグルコー

ス代謝能を改善し、母親の肥満による子への耐糖能障害の伝播を防ぐ作用があることを示す。しかし、妊娠中の母親の運動がいつどのような分子機構で、子のグルコース恒常性の改善を導くかは未解明のままである。

妊娠中に運動をした母親から生まれた仔マウスは、肝臓の糖・脂肪代謝に関わる遺伝子発現が有意に増加していた

(*Diabetes* 2017)。そのため、母親の運動は、遺伝子プロモーター部位の DNA 脱メチル化を代表とした、DNA 配列の変化を伴わないエピジェネティックな機構によって、仔マウス肝臓の遺伝子発現の増加を誘導し、仔のグルコース恒常性を向上させている可能性がある。つまり、仔マウスの肝エピジェネティクスの変化を同定し、糖代謝機能にアノテーションできれば、母親の運動が仔の糖代謝能にもたらす有益な作用の分子メカニズムを解明できると考えられる。

母親の食事	母親の妊娠中の運動	仔の耐糖能
通常飼料	なし	±
通常飼料	あり	++
高脂肪食	なし	-
高脂肪食	あり	+

表1 母親の食事と運動による仔の耐糖能

■本研究の目的

母親の妊娠中の運動が、仔の肝代謝遺伝子上流の脱メチル化を、発生のいつの時期に、ゲノム上のどの場所にもたらすかを解析し、母体運動による仔のグルコース恒常性の改善の分子機構を明らかにする。

■本研究の成果

①妊娠期運動プログラムの設計

8週齢の C57BL/6 雌マウスを4群に分け、通常の飼育箱（静的ケージ）または車輪の設置された飼育箱（運動ケージ）に收容し、通常飼料または高脂肪食を与えながら2週間飼育する。その後、4群の雌を交配のために、静的ケージにて通常飼料で飼育された雄と3日間飼育する。交配後、雌を再び4種の飼育条件に戻す。マウスは、妊娠前は約7km/日、妊娠中は約3km/日の走行を確認している。各4群の雌は3週後に出産した後、静的ケージで育児を行わせる（図1）。

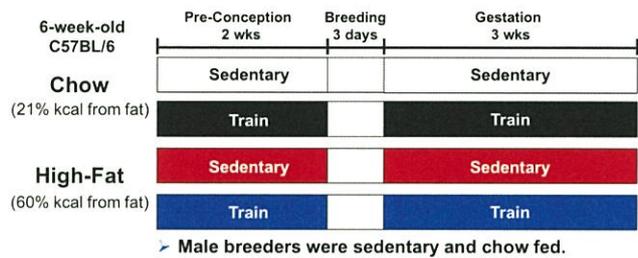


図1 母体運動と食餌による4群タイムスケジュール

①妊娠期運動は、仔の肝代謝遺伝子プロモーターの脱メチル化を促進し、高脂肪食による耐糖能障害を回復する

4週齢の仔の肝臓を単離し、全ゲノム DNA の 5-メチルシトシン (5-mC) を測定したところ、母体運動は仔の 5-mC 量を減少させた。また、仔の肝臓における糖・脂質代謝遺伝子プロモーター部位の CpG アイランドでも同様に、脱メチル化が誘導された。CpG アイランドの低メチル化は、遺伝子発現の増加と密接に関係する (*Cell Metab* 2017)。実際、母親の高脂肪食の摂取は、仔の糖・脂質代謝遺伝子の発現低下に一致して、CpG アイランドのメチル化を増加したが、母体運動は脱メチル化を促進することで、仔を糖代謝障害から回復させることが分かった。これらの結果は、母親の運動による仔の肝機能改善が、DNA 脱メチル化を介したエピジェネティックな機構によりもたらされる可能性があることを示している。

②仔の肝臓ゲノム DNA の脱メチル化は、Tet シグナルの活性化による 5-hmC の生成によって引き起こされる。

4週齢の仔の肝臓において、5-mC の脱メチル化誘導体である 5-ヒドロキシメチルシトシン (5-hmC) の量を測定したところ、母体運動は仔の 5-hmC 量を増加させた。また、糖・代謝遺伝子プロモーター部位の CpG アイランドにて 5-mC 生成量が増加していた。5-mC の 5-hmC への変換は Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase (Tet) によって触媒される (*Nat Cell Biol* 2015)。母体運動は仔の Tet1 及び Tet2 の発現を上昇させるとともに、Tet の活性化因子であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (Idh) と α ケトグルタル酸 (α KG) の量を促進していた。そこでマウス初代肝細胞を単離し、Tet を過剰発現させたり、細胞膜透過性の α KG で刺激したりすると、肝代謝遺伝子の発現が上昇し、グルカゴン刺激によるグルコース産生能が低下した。更に、母親の高脂肪食の摂取は、仔の肝臓 Idh- α KG-Tet シグナルを抑制していた。これらのデータから、Tet は母体運動が仔の肝臓

で DNA 脱メチル化を誘導するための重要シグナル分子であることが考えられる。

③母体運動による仔の肝臓の AMPK-Idh- α KG-Tet シグナル増強と DNA 脱メチル化は、胎生 13.5 日の時点で誘導される

母体運動が仔の糖代謝に改善効果をおよぼす時期を探るために、妊娠した雌マウスから胚盤胞 (Blastocyst; E3.5) 及び胚盤葉上層 (Epiblast; E7.5) と、胎生 13.5 日の胎仔及び新生仔の肝臓を採取した。改善効果の指標として、肝代謝遺伝子の発現量の上昇、プロモーター部位の脱メチル化、Idh- α KG-Tet シグナルの増強を用いた。母体運動は Blastocyst と Epiblast の 5-mC 及び 5-hmC 量や肝代謝遺伝子プロモーター部位のメチル化に影響を与えなかった。しかし、胎生 13.5 日の肝臓では、肝代謝遺伝子の発現が増加し、Idh- α KG-Tet シグナルの上昇による DNA 脱メチル化が誘導され、新生仔においても持続的に糖代謝が改善されていた。これらの結果は、母体運動による仔のグルコース恒常性の改善効果は、胎生 13.5 日の時点で誘導されることを示す。更に、胎生 13.5 日の肝臓において活性化しているシグナル経路を網羅的に解析した結果、AMPK の著しいリン酸化が誘導されていた。肝芽細胞を AMPK 活性化剤で刺激したところ、Idh- α KG-Tet シグナルが上昇しており、AMPK が本シグナルの上流に存在することが示唆された。

④運動惹起性胎盤由来タンパク質 Sod3 は運動効果伝達因子である

胎生マウス肝臓から肝芽細胞を採取し 3 条件の雌マウス(妊娠・非運動、妊娠・運動、非妊娠・運動)由来の血清で刺激したところ、運動した妊娠マウス由来の血清で刺激したときのみ、母親の運動による肝機能向上を模倣できることを見出した (図 2)。そこで妊娠・運動をした雌マウス由来の血清のマススペック解析を行い、候補となる分泌タンパク質群を絞り込んだ。一般に母体側タンパク質は血液胎盤関門を通過できないと考えられるため、候補となるタンパク質は胎盤由来であると予想された。更に胎盤における RNA-seq、胎盤特異的遺伝子改変マウス、in vitro 実験を組み合わせた解析により、母親の運動によって胎盤から分泌される Superoxide dismutase 3 (Sod3) が母体運動効果の子への伝達因子であることを同定した (図 3)。Sod3 はシグナル伝達タンパク質としての新たな機能を有しており、胎児肝臓に作用することで、AMPK-Idh- α KG-Tet シグナル経路を活性化した。これにより肝臓の主要な糖代謝遺伝子のプロモーターで DNA 脱メチル化が起こり、糖代謝遺伝子発現向上による肝機能改善が誘導された。またヒトの複数コホート解析において

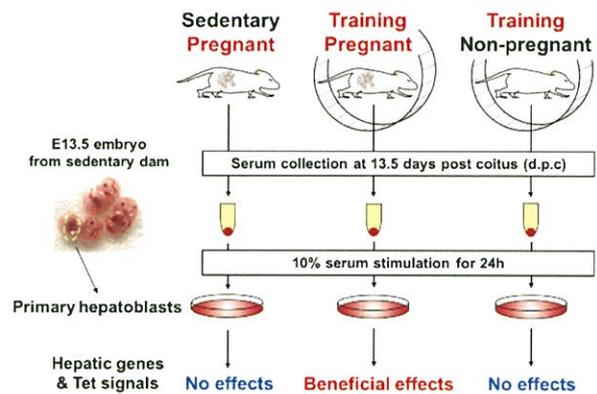


図 2 運動した妊娠マウス血清刺激は肝芽細胞に運動模倣効果を誘導することができる

も、SOD3 は日常の身体活動が活発な妊婦の血清及び胎盤で有意に増加していた。すなわち SOD3 はヒトでの臨床応用が有望なタンパク質であることが予想される。これらの研究成果から、母親の妊娠中の運動は、胎盤からの Sod3 分泌を介して、胎児肝臓のエピジェネティック改変を引きこし、糖尿病の現世代から次世代に跨る悪循環を断ち切る有望な方法であることが明らかとなった。

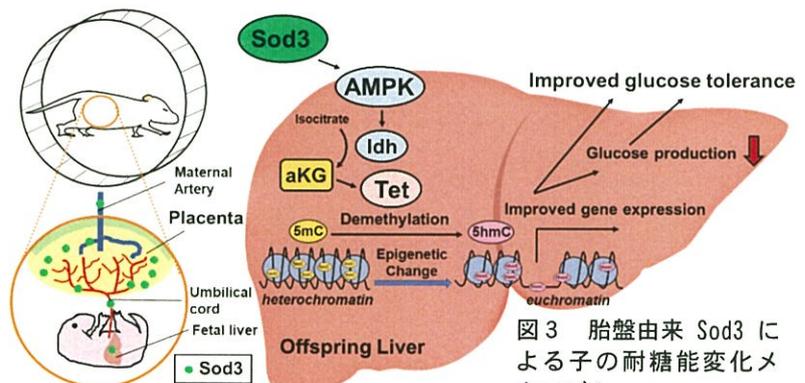


図 3 胎盤由来 Sod3 による子の耐糖能変化メカニズム

■ 発表論文

1. **Kusuyama** et al. Nature Metabolism. 2020 Sep;2(9):858-872.
2. **Kusuyama** et al. Cell Metabolism. 2021 May 4;33(5):939-956