

## 子の肥満を防ぐ妊娠期運動—胎盤シグナルの解明

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体情報継承学分野

楠山 譲二

2型糖尿病は環境因子と遺伝素因で生じ、多くの重大合併症を引き起こす複合疾患である。日本における糖尿病患者数は1千万人を超え、2045年には世界で6億人が罹患するとされ、糖尿病とその付随疾患による個人・公衆衛生・経済のコスト増大は世界的重大課題である。更に近年、妊婦の肥満は子の糖尿病罹患率を増大させることがヒト疫学と動物モデルで証明されている。すなわち、親の肥満、前糖尿病、糖尿病は自身の健康に害悪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。

習慣的運動はグルコース恒常性を改善することで、2型糖尿病の発症を予防・遅延させる、最も重要な要素の1つである。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。我々の研究グループは、妊娠中の母マウスを車輪の設置された飼育ケージで飼育し、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。母親の運動は仔マウスの肝臓に効果をもたらし、インスリン感受性の増加、グルコース産生の低下、糖代謝関連遺伝子の発現上昇をもたらした。これらのデータは、妊娠期運動は仔の肝臓の糖代謝能を改善し、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。

更に我々は、血清タンパク質の質量分析と胎盤特異的遺伝子改変マウスを用いて、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。SOD3は肝臓の主要な糖代謝遺伝子のプロモーターでDNA脱メチル化が起こすことで、糖代謝遺伝子発現を向上させ、肝機能改善を誘導していることが分かった。本研究結果から、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ということが明らかとなった。

妊娠期運動の有益性をヒトに応用するためには、妊娠期運動がどのように胎盤にシグナルを伝達しているかを把握することが必要である。そのための基礎データとして、ヒト妊婦の運動量に関する包括的データと各妊娠期の血清SOD3レベルと出産後の胎盤SOD3レベルの連関解析が有用である。これらのデータを収集、分析すれば、妊娠期運動による胎盤由来SOD3分泌を正確に予測するための基盤情報を得ることが可能となる。そこでヒト妊婦コホートにおける運動を統一評価しやすいパラメーター、母体の血清因子動態、胎盤由来SOD3レベルを経時的に解析することで、胎盤由来SOD3量を予測可能な因子の絞り込みを試みた。更にマウスの妊娠期運動モデルを用いて、胎仔での胎盤由来SOD3の量や動態がヒトデータより得られた予測因子とどのように相関するかを解析した。

### 1. ヒトコホート研究

デンマークのヒト妊婦研究は、オーフス大学のヒト健康研究倫理に関する地域委員会の承認 (j. nr. M-2010048) を得ている。参加者全員から、参加前に書面によるインフォームドコンセントを得た。オーフス大学病院で妊娠10週目から13週目までの定期的な妊婦健診の際に、合計400人の女性を募集した。女性は、

18歳以上で単胎妊娠、移動に支障がなく、デンマーク語を理解できる場合に参加資格を得た。除外基準は、年齢18歳未満、多胎妊娠、動作に影響を及ぼす身体障害、デンマーク語の不十分な知識とした。最終的な研究対象者は、年齢、分娩数、BMIに関して、通常の妊婦と同等であった。妊娠期間中、妊娠週数10~15、18~24、32~38の3回、参加者は研究に関連した検査に参加した。各診察時に、訓練を受けた看護師による体重測定と血液サンプルの採取が行われた。さらに、参加者は毎日の身体活動量を、SenseWear Armband Pro3 (SWA) (Bodymedia, Inc.) を用いて測定された。SWAは、入浴時および水中活動時を除き、連続7日間、右腕の上腕三頭筋に装着した。SenseWear Professional ソフトウェアを使用し、エネルギー消費量、1日あたりの歩数、タスクの代謝当量 (MET) を算出した。装着時間が12時間未満の日は除外した。

カナダのヒト妊婦研究は、オタワ大学のPhysical Activity and dietary implications Throughout pregnancy (PLACENTA) 研究 (11-15-29) またはAcute Exercise研究 (H06-18-634) に参加することに文書によるインフォームドコンセントを得たコホートで、両試験は、オタワ大学の研究倫理委員会の承認を受けている。18~40歳で、妊娠前の体格指数が正常または過体重 (18.5~29.9 kg/m<sup>2</sup>) と見なされ、運動に対する禁忌がない女性を対象とし、高血圧、糖尿病、未治療の甲状腺疾患を持つ者は除外した。妊娠第2期 (妊娠13週~28週) の女性のみを対象として、入浴と水中活動を除く日中、右腰に装着した全方位型Actical® 加速度計 (Phillips Respirationics) を用いて、妊娠中期 (妊娠24~28週) に参加者から連続7日間の自由行動下での身体活動測定を前向きに実施した。最も身体活動的な10名と最も身体活動的でない10名 (第2期のActical指標で決定) を解析に含めた。女性の「活動的」「非活動的」の分類は、10分間の運動で1週間に150分のMVPAを推奨するカナダの成人身体活動ガイドラインを用いて行った。血清サンプルは妊娠第2期に採取された。胎盤は分娩後30分以内に採取した。厚さ約0.5×0.5 cmの胎盤絨毛組織の生検サンプルをPBSで洗浄し、直ちにRNAlater (QIAGEN) に入れた。24時間冷蔵後、サンプルをRNA解析のために-80°Cで保存した。

オーフス大学病院で妊娠第1期 (1~13週)、第2期 (14~27週)、第3期 (28~40週) に追跡調査を行ったヒト妊婦コホートにて血清を採取したところ、血清中のSOD3量は第1期および第2期と比較して第3期で有意に高く、胎盤重量と正の相関があった。しかし、このコホートではベースラインの身体活動が高いため、個々の妊婦を活動的か非活動的かに有意に分類することは困難であり、結果として毎日の運動強度と血清SOD3量との間に明確な関係は見られなかった。

ヒト妊婦の毎日の身体活動量がSOD3発現に及ぼす影響を調べるために、妊娠中に加速度計を装着して毎日の身体活動を追跡しているカナダの妊婦コホートからサンプルを回収した。この観察研究では、週150分の中等度から強度の身体活動 (MVPA) を推奨する成人カナダ身体活動ガイドラインを用いて、妊婦の運動量を活動的または非活動的に分類した。妊娠第2期における血清SOD3量は、活動的な妊婦で有意に増加していた。また、出産後に採取した活動的な女性の胎盤では、SOD3のmRNAの発現レベルが有意に上昇していた。胎盤のSOD3発現は、妊婦の毎日のMVPAと正の相関があった。このように胎盤の成熟と妊娠中の毎日の身体活動が、女性の胎盤のSOD3において正の相関があることが示された (図1)

## 2. マウスにおける妊娠期運動プログラムの設計と食餌由来ビタミンDの介入

8週齢のC57BL/6雌マウスおよび胎盤特異的SOD3ノックアウトマウスを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) に収容し、通常飼料またはビタミンD含有量を変化させた飼料 (100 U、1,000 U、10,000 U) を与えながら2週間飼育した。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日間飼育した。交配後、雌を再び4種の飼育条件に戻し、出産後、静的ケージで育児を行わせた。全ての動物実験はジョスリン糖尿病センター動物実験委員会および東北大学医学系研究科動物実験委員会における倫理審査を受け承認された。

妊娠期に運動および低ビタミンD食または高ビタミンD食を与え、産まれた仔が24週齢になった際に糖代謝

をglucose tolerance testで解析したところ、運動による仔の糖代謝向上効果は低ビタミンD食では阻害され、逆に高ビタミンD食によって増進した。一方、高ビタミンD食による妊娠期運動効果の増進能は、胎盤特異的SOD3ノックアウトによってブロックされたことから、高ビタミンD食で誘導される効果は胎盤由来のSOD3を介していることが示唆された。更に妊娠中に通常食および低ビタミンD食を与えた雌マウスに対して、妊娠13.5日にexo utero developmental systemによって胎仔肝臓にリコンビナントSOD3タンパク質を注射し、胎内で妊娠18.5日まで育てたのち、胎仔を開腹によって取り出し、里親に哺育させ、4週まで育てた後、肝細胞を採取してglucose production assayによって肝臓の糖代謝能を解析した。その結果、妊娠期の低ビタミンD食による仔肝臓の糖代謝能の悪化は、SOD3タンパク質の注射によって部分的に回復できた。

これまでの研究成果で、母親の妊娠中の運動は、胎盤からのSOD3分泌を介して、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を裏付ける分子生理メカニズムが明らかとなった。マウスを用いた解析によって、母体の運動による胎盤でのSOD3発現が妊娠13.5日頃にピークを迎えることが分かったため、ヒト発生に当てはめると、母親の運動がその有益な影響を及ぼすための重要な窓は妊娠の第2期と第3期の間であると考えられる。実際に我々は、妊娠第2期の高活動量は血清中のSOD3レベルを上昇させることを見出した。我々は以前の研究で、子の糖代謝を向上させるための母親の運動の最大の効果は、母親の運動が妊娠前と妊娠中の両方で行われたときに生じたことを示した。このことは、妊娠前および妊娠初期の運動が、妊娠中のSOD3の分泌を高めることができるような全身の代謝状態に影響を与えることを示唆する。このように、妊娠中の毎日の運動が胎盤のSOD3誘導に及ぼすポジティブな効果は、妊婦とその子供に有益な運動プログラムへと変換できる可能性がある。SOD3を治療薬として考える場合、胎盤由来のSOD3を胎児に投与するには、母体の運動が最も効率的であると考えられる。我々のデータは、血清中のSOD3濃度が妊娠中の運動トレーニングの効果を評価するためのバイオマーカーとなり、妊婦に最適な運動プログラムの最適化の評価軸として利用できる可能性がある。今回の研究では更にビタミンDが運動効果の影響に強く関わることをマウスモデルで明らかにすることができた。現在、ヒトコホート研究によって、運動量が少ないわりにSOD3レベルの高い妊婦、運動量が多いにも関わらずSOD3レベルの低い妊婦が存在している可能性を突き止めており、この背景に血清中のビタミンD量が関与しているのではないかと考え、詳細な解析を進行中である。

親の運動の影響に関する研究における最大のハードルの1つは、げっ歯類モデル研究から得られた知識のヒトへの適用である。現在、我々は、妊娠中のげっ歯類とヒトの両方で共通の血清タンパク質や代謝産物を用いることで、運動の影響や胎盤由来SOD3分泌の多寡を評価するための予測因子として利用することを目指している。運動は2型糖尿病や関連疾患の発症を予防・遅延させる重要要素の中で、最も安易且つ安価な方策であり、その実践が次世代の健康増進を目指して広く一般の健康増進や社会政策に組み込まれることが期待される。

本研究に多大なご支援をいただいた、アステラス病態代謝研究会の皆さま、審査員の先生方に感謝申し上げます。