

母児概日リズム連関と代謝恒常性

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科
木内 謙一郎

1. 研究の目的

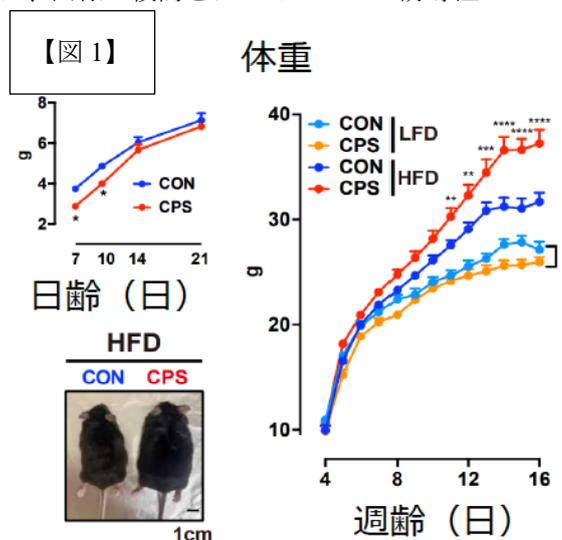
概日時計は変動する環境に対し予測的に生体活動を適応させる生体恒常性維持機構である。母体の概日リズムの変調が胎児の胎生期における概日時計の変調として世代継承され、臓器発達や分化、エピゲノム修飾を介した長期的な疾患感受性に影響すると予測し、肥満や糖尿病などの代謝可塑性や疾患感受性形成における早期ライフステージの意義を探索することを本研究の目的とする。

2. 研究の方法

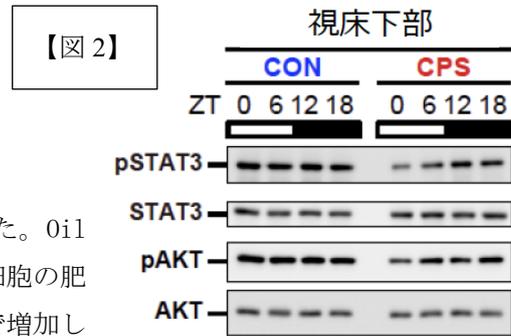
妊娠マウスを12時間明暗周期の環境下 (CON群)、および慢性明暗周期変化 (Chronic phase shifting: CPS群) で飼育し、産まれたマウスを12時間の明暗サイクルの下で、低脂肪食負荷 (LFD) および高脂肪食負荷 (HFD) を3ヶ月間行い飼育すると共に、体重を継続的に計測した。ロコモーター活動計、および代謝ケージを使用して、経過中の活動度、摂食、酸素消費、エネルギー消費、Free-running period (恒常条件下における概日活動リズム)などを計測した。更に糖負荷試験やインスリン負荷試験を行い、各食事負荷と母体内概日リズム障害の有無における、耐糖能・インスリン抵抗性の評価を行った。母体概日リズム障害による仔の長期代謝予後を検討するため、4ヶ月齢において日内の4つのタイムポイント (ZT 0, 6, 12, 18)において、肝臓、骨格筋、脂肪組織、視床下部、並びに血清を採取した。肝臓、骨格筋、脂肪組織、視床下部の概日遺伝子発現を、qPCR、ウエスタンブロット法で評価したほか、肝臓、白色脂肪組織の組織学的検討を行った。更に、肝臓のトランスクリプトーム、メタボロームを行い、母体概日リズム障害に起因する仔の概日代謝プログラミングを検討した。また、同様の検討をタモキシフェン誘導性Bmal1欠損マウスを用いて妊娠中にBmal1を欠損させた母体から生まれたマウスにおいても実施した。更に、胎生期18.5日目の母体と胎児の肝臓概日時計の概日遺伝子発現をqPCR法で検討したほか、胎盤の組織、分化マーカー、糖・アミノ酸輸送体遺伝子発現、胎盤重量、胎児重量、シングルセルRNA-seq解析を行った。

3. 研究成果

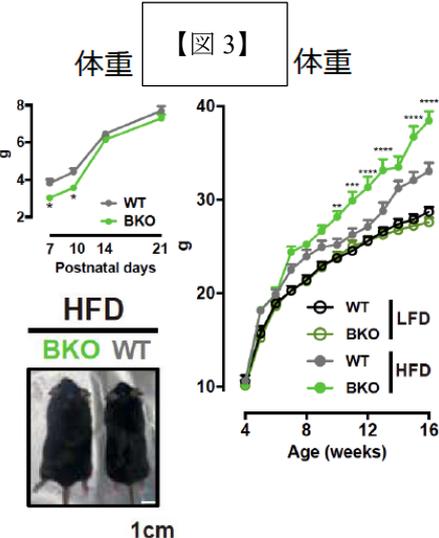
1) CPSを行った妊娠母体から生まれた新生児は体重が低下していたが、生後2~3週で体重はCON群と同様まで自然



回復した（【図1】参照）。その後、LFD負荷を行った仔では、体重は同様のままであったが、HFD負荷を行うと、CPS群では逆に体重が増加し、肥満が増悪した（【図1】参照）。

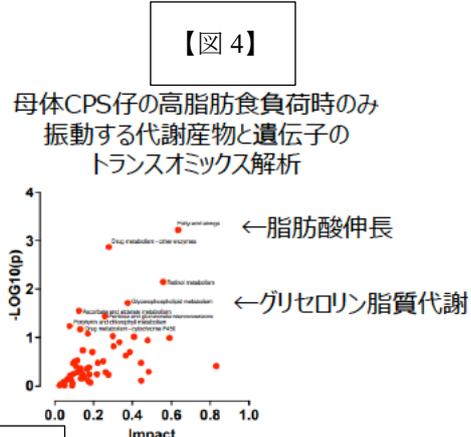


2) 仔の肝臓と白色脂肪組織の重量がCPS群HFD負荷で増加した。Oil Red O染色で肝細胞の脂肪滴が増加していたほか、白色脂肪細胞の肥大を認めた。血清コレステロール、中性脂肪はCPS群HFD負荷で増加していたほか、糖負荷試験、インスリン負荷試験では、CPS群HFD負荷で耐糖能低下とインスリン抵抗性が確認された。CPS群HFD負荷でエネルギー消費量低下、摂餌量増加、摂食リズム障害、視床下部レプチン抵抗性の悪化が認められた（【図2】参照）。

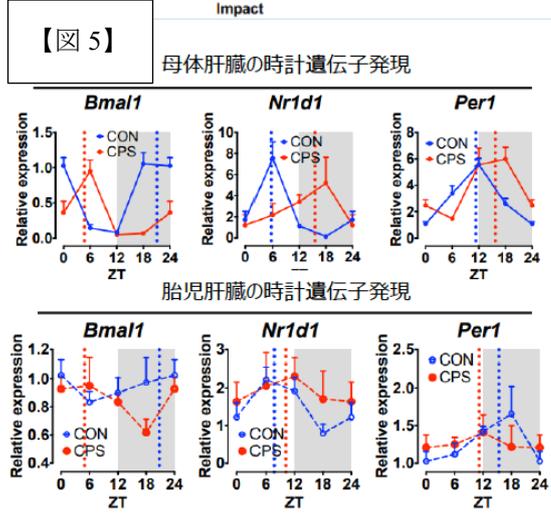


3) 妊娠母体CPSから生まれた仔の肥満増悪が、母体の概日時計を介しているかどうかを検討するため、タモキシフェン誘導性Bmal1欠損マウス (BKO) を用いて妊娠中にBmal1を欠損させた母体から生まれたマウスにおいても同様の検討を行った。Bmal1欠損マウスから生まれた仔マウスは低出生体重であったが、生後3週までに体重が回復・正常化した。LFD負荷では対照群 (WT) と比較して体重は差がなかったが、HFD負荷では肥満が増悪し、肝臓や脂肪組織の重量が増加し、耐糖能低下、インスリン抵抗性増悪、エネルギー消費量低下、摂餌量増加、摂食リズム障害など、妊娠母体CPSから生まれた仔マウスと同様の表現型が見られた（【図3】参照）。

4) 仔の肝臓概日トランスクリプトーム、メタボローム解析を実施したところ、CPS群HFD負荷においてのみ振動する遺伝子や代謝産物は脂質代謝に関わるpathwayが多いことが分かった（【図4】参照）。高脂肪食により概日リズムが再編成することが知られているが、母体概日リズム障害による肥満の増悪は、摂食リズム障害、摂餌量増加、脂肪肝悪化を背景とした概日再編成の更なるリモデリングを引き起こすと考えられた。

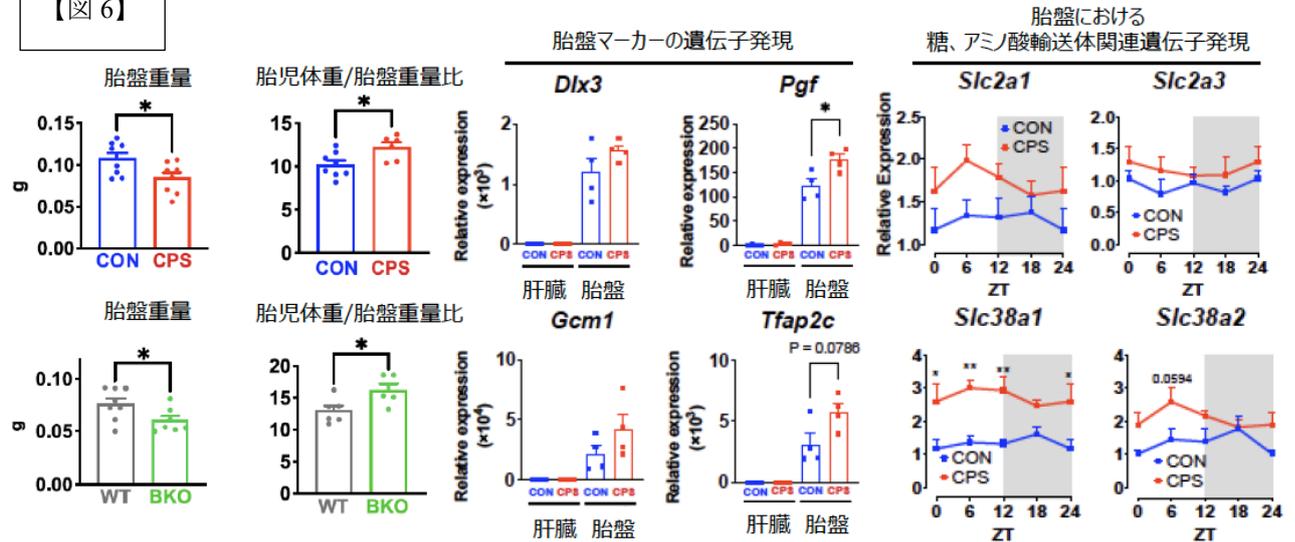


5) 妊娠母体概日リズム障害による胎児発達や胎児リズムへの影響を検討するため、胎生期18.5日目の母体ならびに胎児肝臓の時計遺伝子発現の評価を行った。母体および胎児肝臓の時計遺伝子発現リズムはほぼ同調していたが、妊娠母体CPSにより母体肝臓時計遺伝子発現リズムの位相が遅延し、母体および胎児肝臓の時計遺伝子発現リズムの位相関係性が変化していた（【図5】参照）。また、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行ったところ、妊娠母体CPSは日内変動がある母体肝臓遺伝子数を減らしたが、胎児肝臓では日内変動がある遺伝子数が増加した。



6) 妊娠CPS、母体Bmal1欠損マウスは妊娠期間がそれぞれの対照群と比較してやや短縮し、胎児および胎盤重量はそれぞれの対照群と比較して低下していたが、胎盤の組織に変化は見られず、胎盤分化マーカーや糖・アミノ酸輸送体関連遺伝子発現の上昇、胎児/胎盤重量比の上昇が見られたことから、妊娠母体リズム障害により胎盤効率は上昇することが分かった（【図6】参照）。

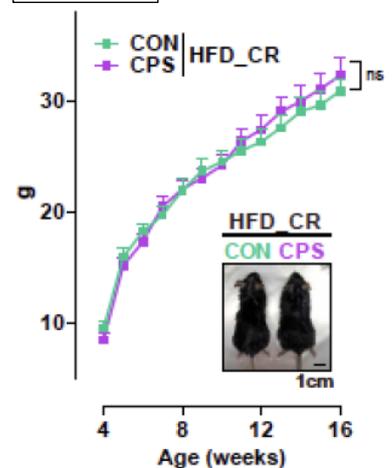
【図6】



7) 妊娠母体概日リズム障害による仔の肥満増悪の背景に摂食リズム障害と摂餌量増加が見られたことから、仔の摂食リズムを回復することによる概日リズムの再同調が肥満増悪を予防できるか検討するために、暗期時間制限食の実験を行った。暗期時間制限で高脂肪食負荷を行うと、CON群、CPS群ともに体重は減少したが、CPS群の体重増加は残存し、CPS群で耐糖能低下、インスリン抵抗性、エネルギー消費量低下、時計遺伝子発現の日内変動減弱が見られた。給餌時間制限を行っても、CPS群で摂餌量が多い傾向が見られたため、摂食リズムに加えて、摂餌量もCON群とCPS群で同等とするため、1日1回給餌のカロリー制限をHFDを用いて行った（HFD_CR）ところ、CON群、CPS群ともに同等の体重、耐糖能、インスリン感受性、エネルギー消費量となった（【図7】参照）。

【図7】

体重



4. 考察と今後の展望

今回母体概日リズム障害が、新生児の体重減少を引き起こすこと、そして高脂肪食負荷を行うと仔の肥満が逆に増悪するという興味深い知見が明らかになった。その背景に、食行動リズム障害、摂餌量増加、エネルギー消費量低下、インスリン抵抗性、中枢性のレプチン抵抗性、肝臓の概日リプログラミングが存在していた。これらの現象が、肥満の原因であるのか、結果であるのか、については十分に検討できておらず、今後の課題と考えられる。今回の検討から、胎児期の母体概日リズムが仔の長期の代謝プログラミングに関与することが示唆されたが、エピジェネティックな変化が関与しているか、についても今後の課題と考えられる。今後の更なる検討で、肥満や糖尿病の疾患感受性形成における早期ライフステージの意義が明らかになることが期待される。