

## 妊娠期運動による生活習慣病予防効果の次世代伝播機構

楠山 譲二

申請時：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 口腔生化学分野

現在：東北大学学際科学フロンティア研究所 新領域創成研究部 助教

### 要旨

近年、妊婦の肥満や生活習慣が、子の成人期の慢性疾患発症リスクに強く影響することが知られている。この概念は Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 仮説と称され、2 型糖尿病はその代表的疾患である。DOHaD の影響は、子が通常的生活習慣を送った場合でも覆すことが困難であり、重篤な健康格差の原因となる。我々は運動が健康に与える多面的有益性と極めて小さな副作用に着目し、妊娠期の運動は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見出した。更に運動の有益な効果の子への伝達が胎盤由来タンパク質によって担われており、胎仔肝臓のエピジェネティクス改変による運動効果伝達機構を明らかにした。運動は安易で安価な高い実践性を持つことから、将来の子の慢性代謝性疾患の先制的予防法として、広く社会に実装されることが期待される。

### 内容

#### ■ 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

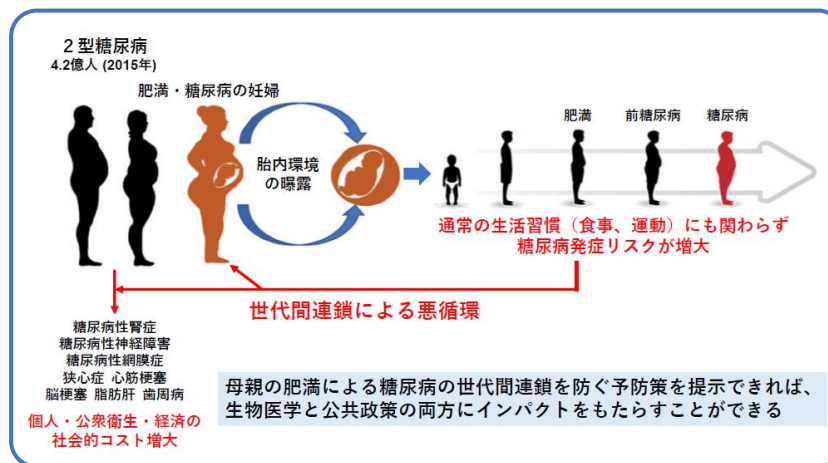


図1 母親の肥満・糖尿病は次世代に伝播する

を引き起こすと考えられる（図 1）。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）。

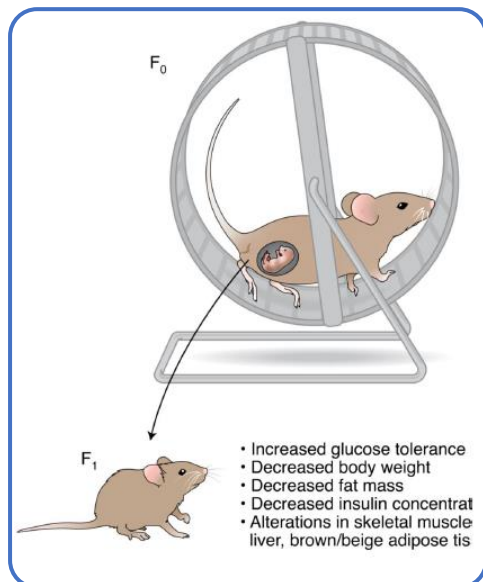


図 2 母親の妊娠中の運動は仔の糖代謝能を向上させる

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。この成果は、妊娠期運動

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（図 2）。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産まれた仔マウスは、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）（図 2）。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。

## ■ 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、妊娠期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）に収容し、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（図3）。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。

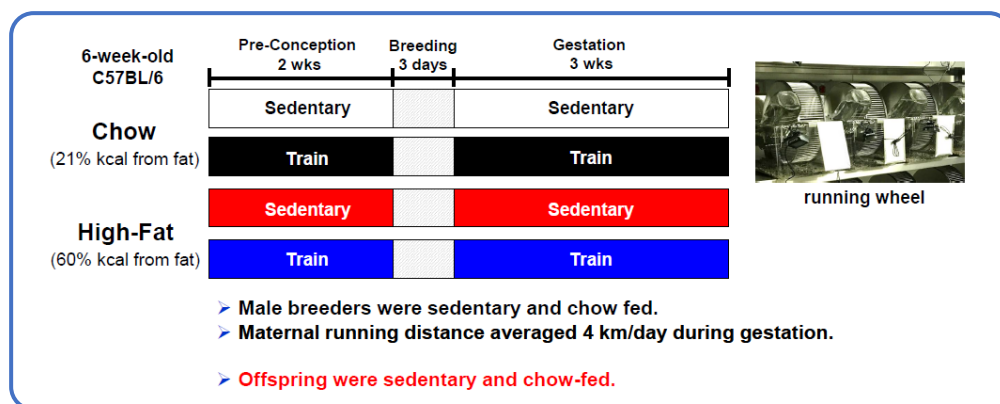


図3 マウスの妊娠期運動プログラム

②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、妊娠期運動は仔の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、妊娠期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。

③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・ケトグルタル酸（・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αKG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-αKG-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。

④妊娠期運動による仔の肝臓のAMPK-IDH-αKG-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

妊娠期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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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。

⑤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

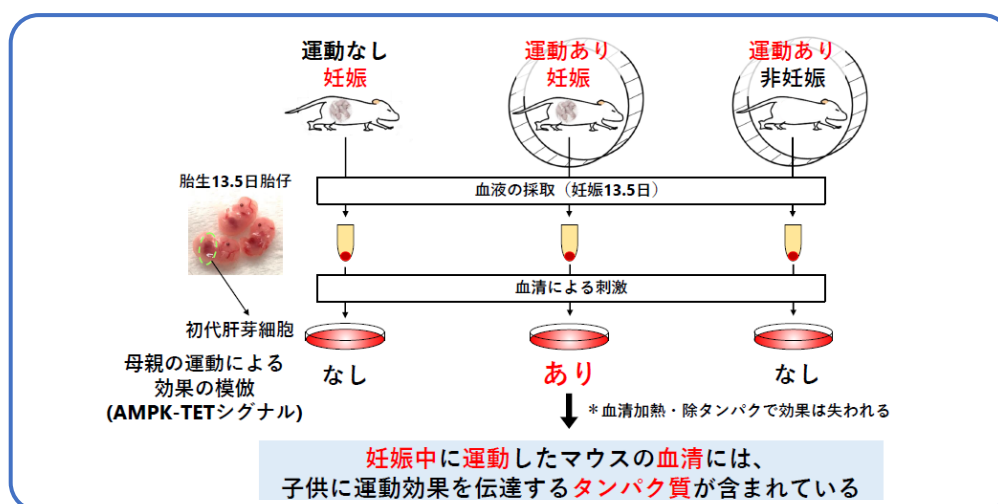
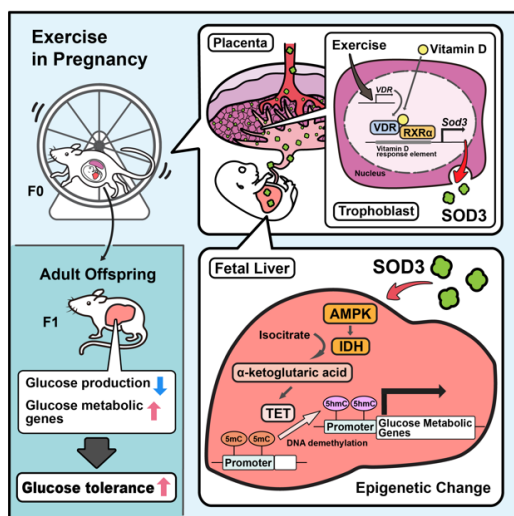


図 4 妊娠中に運動したマウス血清には運動効果伝達因子が存在する

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 4)。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。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- $\alpha$ 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。更に妊娠期運動による胎盤での SOD3 発現を制御する転写因子として vitamin D receptor (VDR: ビタミン D 受容体) を同定した。食餌中のビタミン D 量が少ないと妊娠期運動効果は認められない一方で、高ビタミン D は運動効果を増進したことから、妊娠期の運動と栄養の協調の重要性が示唆された。更にヒトの複数コホート解析においても、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。



## まとめ



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を裏付ける分子生理メカニズムが明らかとなった（図 5）。

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。

## 発表業績一覧

### ■論文

1. **Joji Kusuyama**, Ana Barbara Alves-Wagner, Royce H Conlin, Nathan S Makarewicz, Brent G Albertson, Noah B Prince, Shio Kobayashi, Chisayo Kozuka, Magnus Møller, Mette Bjerre, Jens Fuglsang, Emily Miele, Roeland J W Middelbeek, Yang Xiudong, Yang Xia, Léa Garneau, Jayonta Bhattacharjee, Céline Aguer, Mary Elizabeth Patti, Michael F Hirshman, Niels Jessen, Toshihisa Hatta, Per Glud Ovesen, Kristi B Adamo, Eva Nozik-Grayck, Laurie J Goodyear Placental superoxide dismutase 3 mediates benefits of maternal exercise on offspring health. *Cell metabolism* 33(5) 939-956 2021
2. **Joji Kusuyama**, Ana Barbara Alves-Wagner, Nathan S Makarewicz, Laurie J Goodyear Effects of maternal and paternal exercise on offspring metabolism. *Nature metabolism* 2(9) 858-872 2020

### ■受賞

1. 第 10 回日本 DOHaD 学会学術集会 優秀演題賞 2021 年 9 月
2. 日本体力医学会 第 18 回大塚スポーツ医・科学賞 特別賞 2021 年 9 月

3. 第 61 回日本先天異常学会学術集会 優秀演題賞 2021 年 8 月
4. AMED/NYAS 2020-2021 Interstellar Initiative Outstanding Team Presentation Award 2021 年 3 月
5. 岩垂育英会賞 2020 年 3 月
6. The Japan-US Science forum in Boston 2019 JSPS Washington Office Award 2019 年 11 月
7. 第 42 回日本分子生物学会 海外若手会員招聘企画 Travel Award 2019 年 9 月
8. American Diabetes Association Young Investigator Travel Grant Award 2019 年 3 月
9. Keystone Symposia Future of Science Fund Scholarship 2018 年 11 月

#### ■学会発表

1. **楠山譲二** 次世代への運動情報伝達器官としての胎盤機能の新定義 第 63 回歯科基礎医学学会学術大会 歯科基礎アカデミーシンポジウム 2021 年 10 月 9 日
2. **楠山譲二** 胎盤由来 SOD3 を介した妊娠期運動による肥満予防効果の次世代伝播機構 第 76 回日本体力医学会大会 2021 年 9 月 17 日
3. **楠山譲二** 胎盤由来 SOD3 を介した妊娠期運動による肥満予防効果の次世代伝播機構 第 45 回日本女性栄養・代謝学会学術集会・第 10 回日本 DOHaD 学会学術集会 2021 年 9 月 4 日
4. **Joji Kusuyama** Placental Superoxide Dismutase 3 Mediates Benefits of Maternal Exercise on Offspring Health. the 2021 meeting of the International Federation of Placenta Associations (IFPA) 2021 年 9 月 3 日
5. **楠山譲二** 胎盤由来 SOD3 を介した妊娠期運動による肥満予防効果の次世代伝播機構 第 61 回日本先天異常学会学術集会 2021 年 8 月 7 日
6. **Joji Kusuyama** Placental Superoxide Dismutase 3 Mediates Benefits of Maternal Exercise on Offspring Health. Nature Conference, Metabolism in Health and Disease 2021 年 6 月 30 日
7. **Joji Kusuyama** Beneficial Effects of Exercise in the Middle Age on Metabolic Health Outcomes in Aging. MIRAI2.0 Digital Research and Innovation Week 2021 2021 年 6 月 8 日
8. **Joji Kusuyama** How engaging in exercise can transform and improve our health. Stovit Online Series (SOS) 2021 2021 年 5 月 21 日
9. **楠山譲二** 母親と父親の運動効果は子にどのように伝達されるか?~げっ歯類モデル研究から~ 第 94 回 日本内分泌学会学術集会 2021 年 4 月 23 日
10. **Joji Kusuyama**, Ana B Wagner, Royce H Conlin, Nathan S Makarewicz, Magnus Møller, Emily Miele, Roeland J W Middelbeek, Niels Jessen, Per Glud

Ovesen, Michael F Hirshman, Kristi B. Adamo, Eva Nozik-Grayck, Laurie J Goodyear Mechanism for the Beneficial Effect of Maternal Exercise to Improve Offspring Metabolic Health. American Diabetes Association 80th Scientific Sessions 2020 年 6 月 13 日

11. **Joji Kusuyama**, Ana Wagner, Michael Hirshman, Laurie J Goodyear 母体運動による糖尿病予防効果の次世代伝播機構 第 42 回日本分子生物学会 2019 年 12 月 3 日
12. **Joji Kusuyama**, Ana Wagner, Michael Hirshman, Laurie J Goodyear Identification of a Novel Placenta-Derived Protein that Mediates the Beneficial Effects of Maternal Exercise on Offspring Liver. The Japan-US Science forum in Boston 2019 2019 年 11 月 2 日
13. **Joji Kusuyama**, Ana Wagner, Michael Hirshman, Laurie J Goodyear Novel Epigenetic Mechanism for Maternal Exercise Effects on Offspring Metabolic Health. American Association Diabetes 79th Scientific Sessions 2019 年 6 月 10 日
14. **Joji Kusuyama**, Ana Wagner, Michael Hirshman, Laurie J Goodyear Maternal Exercise Improves Offspring Metabolic Health Through Epigenetics Changes Mediated by a Novel Placenta-Derived Protein. Cell Symposia, Exercise Metabolism 2019 年 5 月 5 日
15. **Joji Kusuyama**, Ana Wagner, Michael Hirshman, Laurie J Goodyear Identification of a Novel Placenta-Derived Protein that Mediates the Beneficial Effects of Maternal Exercise on Offspring Liver Keystone Symposium, Diabetes: Innovations, Outcomes and Personalized Therapies 2019 年 3 月 7 日
16. **楠山譲二** 母体運動による糖尿病予防効果の次世代伝播機構 第 60 回歯科基礎医学会 2018 年 9 月 5 日