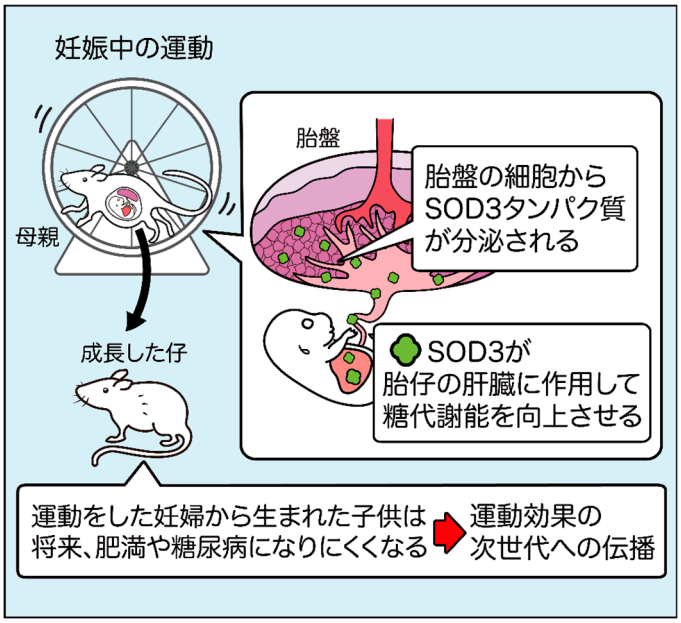
200　運動変数と胎盤解析による妊娠期運動の次世代効能予測	楠山　譲二

【目的】日本の糖尿病有病者は 1,000 万人を超え、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。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。近年、母親の肥満や糖尿病は自身の健康に害悪を及ぼすだけでなく、子に対して糖尿病の発症リスクを伝播させることが分かっている。我々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たところ、母親の肥満による仔マウスの耐糖能機能の低下を改善できることを見出した。更に妊娠期運動によって胎盤から分泌される superoxide dismutase 3（SOD3）が情報伝達に必須の分子であることを同定した。妊娠期運動の有益性をヒトに応用するためには、妊娠期運動による胎盤由来 SOD3 分泌を正確に評価することが求められる。そこで本研究ではヒト妊婦コホートとマウス運動モデルを用いて、胎盤由来 SOD3 の量を予測できる因子の探索を行った。

【方法】東北大学、オーフス大学、オタワ大学との共同研究によって、ヒト妊婦の運動コホート解析とサンプル収集を行った。妊婦の 24 時間の運動レベルはウェアラブルデバイスによって、歩数、エネルギー消費量、MET（Metabolic equivalents：運動強度の単位）を計測した。血液は妊娠各 3 期に採取、出産時に胎盤を採取し、SOD3 レベルを測定した。更に血清のメタボライト解析を行い、胎盤由来 SOD3 レベルと相関のある因子を絞り込み、マウスモデルを用いてその因子の多寡に関する影響を解析した。

【結果】血清中の SOD3 量は妊娠第 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。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。SOD3 量と血清中のビタミン D レベルには弱い相関があった。マウスモデルにおいて食餌中のビタミン D 量を変化させたところ、胎盤における SOD3 レベルは血清中のビタミン D レベルと強い相関があった。

妊娠時運動によって分泌される SOD3 による次世代情報伝達



200. 運動変数と胎盤解析による妊娠期運動の次世代効能予測

楠山　譲二

*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

Key words：SOD3，MVPA，ビタミンD，糖代謝，肝臓

緒　言

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［1］。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。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［2］。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、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必要である。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。

その結果、血清中のSOD3 量は妊娠第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。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。SOD3 量と血清中のビタミンD レベルには弱い相関があった。マウスモデルにおいて食餌中のビタミンD 量を変化させたところ、胎盤における SOD3 レベルは血清中のビタミンD レベルと強い相関があった。

胎盤由来SOD3 動態を、ヒト臨床サンプル、運動の包括的データ、マウスにおける生理的動態の三者をさらに連関解析することで、臨床実践に基づいた妊娠期運動の効能標的解析が可能になると考えられる。

*現在の所属：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

方法および結果

1. ヒトコホート解析

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-20100048）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^2）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 Respironics）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℃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。

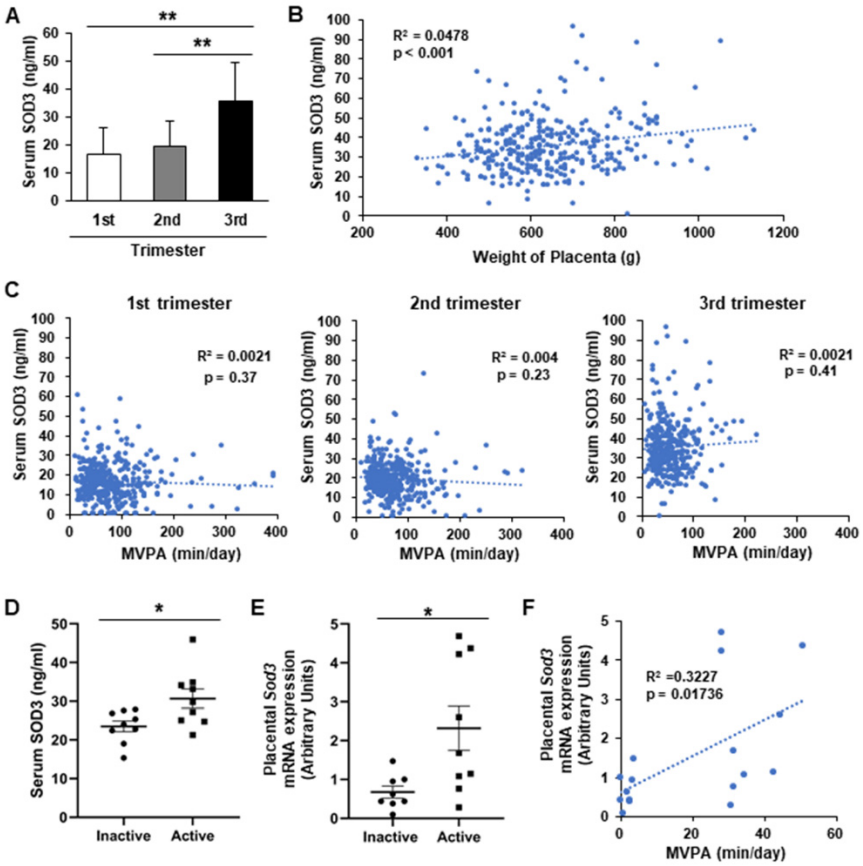


図 1. ヒト妊婦の運動が SOD3 レベルに与える影響

A) 妊娠第一期（10～15 週）、第二期（18～24 週）、第三期（32～38 週）における血清 SOD3 レベル。**P＜0.01（one-way ANOVA with Tukey post hoc analysis）。

B) 妊娠第三期における血清 SOD3 レベルと胎盤重量の相関。

C) 妊娠第一期、第二期、第三期における血清 SOD3 レベルと日常の MVPA との相関。

D) 低活動および高活動の妊婦の妊娠第二期における血清 SOD3 レベル。*P＜0.05（t-test）。

E) 低活動および高活動の妊婦由来胎盤における SOD3 発現レベル。*P＜0.05（t-test）。

F) 胎盤の SOD3 発現レベルと日常の MVPA との相関。

考　察

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 [1]。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。

謝　辞

本研究に多大なご支援をいただいた、上原記念生命科学財団の皆さま、審査員の先生方に感謝申し上げます。

文　献

1）　Kusuyama J, Alves-Wagner AB, Makarewicz NS, Goodyear LJ. Effects of maternal and paternal exercise on offspring metabolism. Nat Metab. 2020 Sep;2(9):858-872. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32929233 DOI: 10.1038/s42255-020-00274-7.

2）　Kusuyama J, Alves-Wagner AB, Conlin RH, Makarewicz NS, Albertson BG, Prince NB, Kobayashi S, Kozuka C, Møller M, Bjerre M, Fuglsang J, Miele E, Middelbeek RJW, Xiudong Y, Xia Y, Garneau L, Bhattacharjee J, Aguer C, Patti ME, Hirshman MF, Jessen N, Hatta T, Ovesen PG, Adamo KB, Nozik-Grayck E, Goodyear LJ. Placental superoxide dismutase 3 mediates benefits of maternal exercise on offspring health. Cell Metab. 2021 May 4;33(5):939-956.e8. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33770509 DOI: 10.1016/j.cmet.2021.03.004.