

# 2019 年度学内研究助成 成果報告書

## ① 報告者所属・氏名

生活科学部 食生活科学科・中村彰男

## ② 事業名

子宮内高血糖環境により変動する新規バイオマーカーとしてのエクソソーム解析

## ③ 事業の目的

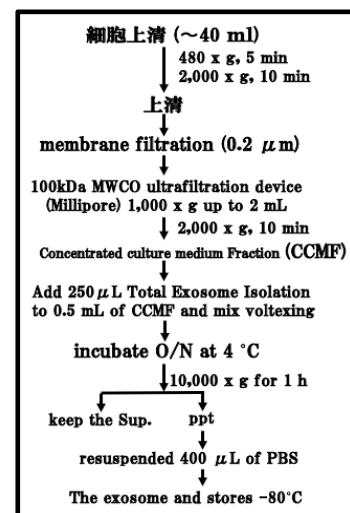
日本は超少子高齢化社会に突入し、少ない子どもを大切に育てていかなければいけない時代となっている。ところが、晩婚化や第一子出産の高齢化に伴い、糖尿病の妊婦や妊娠に伴い糖尿病を発症する妊娠糖尿病が急増している。母胎の高血糖は胎盤を通じて、直接、胎児に影響を及ぼし、早産や発育遅延そして心疾患などの合併症が多く報告されている。胎児期の子宮内高血糖環境が生まれてくる子どもに与える影響を、独自の妊娠糖尿病モデルラットを用いて、その発症メカニズムを明らかにするとともに、母胎や胎盤から羊水や血液に放出されるエクソソームと呼ばれる細胞外小胞に着目し、そのエクソソームに含まれる新規バイオマーカーを探索することを目的としている。

## ④ 事業実績・研究成果 (具体的に)

1) Wistar Rat 14 週齢♀を親ラットとし、糖尿病群は妊娠 4 日目にクエン酸緩衝液 0.2ml にストレプトゾトシン (40mg/kg) を溶解し、尾静脈に投与し作成、正常群はクエン酸緩衝液を糖尿病群と同量投与し作成する。妊娠糖尿病モデルラットの作成を行った。この妊娠ラットから心採血を行い、クエン酸血漿を単離した。

2) 子宮内高血糖環境による胎児の影響は過度の血漿タンパク質の糖化が慢性炎症を引き起こすことを既に報告しているので、細胞モデルで暴露するための終末糖化産物 (AGEs) 化したウシ胎児アルブミン (BSA) を作成した。BSA は 5mM DTPA を含むリン酸緩衝液に D-グルコースを 8 週間反応して作成した。作成した AGEs-BSA は透析後、抗 AGE 抗体にて AGEs 化を確認した。これを細胞モデルの培地に加えて子宮内高血糖環境のモデルを作成した。

3) 血漿中のエクソソームの単離方法は確立しているが、細胞培地のエクソソームに関して、培地上清からのエクソソームの単離方法を右図の示すように確立した。培地上清は低速遠心で夾雑物を分離後、0.2 ミクロンのフィルターを通し、分子量 100kDa の限外濾過器で濃縮後、インビトロゲン社の Total Exosome Isolation にてエクソソームを共沈させた。



## ⑤ 研究成果の発表・活用 (学会発表・論文掲載・地域連携・産学連携など)

### ○ 学会発表

1. Effects of AGEs on the rat neuronal cells in the intrauterine hyperglycaemic environment., **Nakamura, A.**, Ookami, H., Shimizu, M., Ooi, S., Tokunaga, Y., Sasaki, Y., and Kawaharada, R., The 93rd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (Yokohama, Japan, March 16~18, 2020) \*This title published the website and in J-Stage.

2. Effects of saturated fatty acids on skeletal muscle differentiation in an intrauterine hyperglycemic environment., Tokunaga, Y., Kawaharada, R., Ishida, C., and **Nakamura, A.**, The 93rd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (Yokohama, Japan, March 16~18, 2020) \*This title published the website and in J-Stage.

3. 子宮内高血糖環境が胎児の神経グリア細胞に及ぼす影響に関して. **中村彰男**、大上桜香、清水愛美、徳永弥生、大井聡美、河原田律子、第8回日本DOHaD学会学術集会、東京、2019年8月9-10日.

4. ミオシン軽鎖キナーゼのアクチン連関による非キナーゼ活性について. **中村彰男**、小濱一弘、第61回日本平滑筋学会総会、名古屋、2019年8月1-3日.

#### ○ 論文発表

1. Okada, C. Y., **Nakamura, A.**, Ogawa, K., Kohama, K., Kaneko, T. S., Profiles of *Physarum* Microplasmoidal Phosphatase Activity Crucial to Cytoplasmic Streaming and Spherule Formation. *Cell Biochem. Biophys.* 77(4) 357 - 366 2019年9月

2. 河原田律子, 大上桜香, 小浜智子, **中村彰男**、子宮内高血糖がラット新生仔の神経細胞に与える影響、糖尿病と妊娠 : 19(2) 79 – 81、2019

3. 河原田律子, 小浜智子, **中村彰男**、糖尿病妊娠モデル動物を用いた子宮内高血糖環境が次世代に与える影響、糖尿病と妊娠 : 19(2) 49 – 52、2019

#### ⑥ 今後の展開・継続性について

妊娠糖尿病モデルラットと高血糖環境での細胞モデルおよび培地上清からのエクソソームの単離に成功した。今後はオミックス解析を推進し、エクソソームに含まれるマイクロRNAやペプチド分子の単離を行い、バイオインフォマティクス解析から新規のバイオマーカーの候補の探索を進めていく。