

2020 年度「牛乳乳製品健康科学」学術研究報告書

提出日 2021年5月23日

**「糖尿病環境下での神経グリア細胞の慢性炎症と  
細胞死を防ぐ牛乳に含まれる脂肪酸の探索」**

実践女子大学・生活科学部・食生活科学科

中村彰男

## 要旨

食の欧米化や晩婚化により、糖尿病妊娠や妊娠糖尿病を罹患する母親が増加している。母体の高血糖は胎盤を通じて子宮内高血糖環境を形成し、胎児に影響を与えるが、この環境に曝された胎児にどのような臓器異常が発生し、その原因となる分子基盤については、未だ十分に解明されていない。これまでの研究で、独自の糖尿病妊娠モデルラットを用いたところ、糖尿病妊娠モデルラットから生まれた仔の脳では、神経細胞やアストログリア細胞において多くのタンパク質が過剰な AGEs (Advanced Glycation End Products) 化を受けていることが明らかになった。

そこで、神経細胞とアストログリア細胞を高グルコース培地に曝すことで細胞モデルを構築し、分子レベルでの解析を行った。その結果、高血糖環境がもたらす AGEs 化による炎症シグナルが脳神経タンパク質の変性を介してアポトーシスを引き起こすことが示された。さらに、この細胞障害は、n-3 系不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) や、n-7 系不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸により改善されることが分かった。

次に、これらの分子メカニズムをさらに解明するため、次世代型シーケンサーを用いて網羅的遺伝子解析を行った。その結果、パルミトレイン酸には、体内でパルミチン酸から生合成されるシス型と、乳製品などに含まれ体内では生合成できないトランス型があり、これらの異性体により作用が異なることが明らかになった。今後は、プロテオームやメタボローム解析を組み合わせたオミックス研究を進め、分子機序のさらなる解明と、妊婦が摂取可能な食品成分の探索研究に応用していきたいと考えている。

## 緒言

これまで人類は細菌やウイルスの脅威にさらされてきたが、衛生状態の改善、抗生物質やワクチンの普及により、感染症は大幅に減少した。しかし、現代社会は飽食時代に突入し、豊かさと引き換えに、生活習慣病などの非感染性疾患が浮き彫りとなり、これらの一次予防を目的とした先制医療が大きな課題となっている。非感染性疾患の発症原因として食生活との関連が注目されているが、その発症メカニズムについては十分に理解されていない。

1980年代に、英国サウサンプトン大学の David Barker 博士により、胎児期の母体の栄養環境が子どもの将来の成人病(現在は生活習慣病)の発症に大きな影響を与えるという「成人病胎児期発症説」が提唱された<sup>1)</sup>。Barker 博士は、胎児の栄養の指標として出生時体重を用い、さまざまな死因との関連を調査した結果、低出生体重で生まれた子どもが将来、心臓病で死亡するリスクが高いことを明らかにした<sup>2)</sup>。その後、多くの出生コホート研究において、栄養不良にさらされた胎児が、胎内で将来の環境を予測する適応反応を示し、出生後の環境と乖離することで成人期に生活習慣病を発症する可能性が示された<sup>3-4)</sup>。さらに、この仮説はオークランド大学の Peter Gluckman 博士と英国サウサンプトン大学の Mark Hanson 博士によって、胎児期から出生後の幼児期までに拡張され、今日の DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 研究に発展している<sup>5)</sup>。

しかし、現代社会では、母親が栄養失調となるほどの大規模な戦争や飢餓の時代は過ぎ去り、食生活が劇的に変化したことで、逆に肥満や糖尿病などの栄養過剰摂取が課題となっている。さらに、初婚年齢の上昇により第一子出産年齢も上がり、生活習慣病を既に発症している母体の過栄養が生まれてくる子どもの将来の健康に与える影響が注目されている。例えば、妊娠中に母親が糖尿病妊娠や妊娠糖尿病合併症を発症すると、胎児は胎盤を通じて母親の高血糖環境に曝され、子宮内で高血糖環境にさらされる。これまで、糖尿病の母親からは巨大児や心肥大、代謝異常などの合併症が報告されているが(図 1)、胎児期の子宮内高血糖環境が胎児にどのような影響を与え、生まれてきた子どもの将来の疾病発症にどのように関わるかについての分子機構は十分に研究されていない。

そこで、私たちは妊娠中に子宮内高血糖症を維持する独自の糖尿病妊娠モデルラットを作成し、生まれた仔の心疾患を評価した<sup>6)</sup>。その結果、栄養シグナルである Akt 関連のインスリンシグナル伝達が、これらの糖尿病妊娠モデルラットの母親から生まれた仔の心臓で異常を示した<sup>6)</sup>。また、私たちは高血糖に曝された仔の心臓および心臓から単離された初代心筋細胞について、インスリンシグナル伝達系、活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) の発生、AGEs (Advanced Glycation End Products) の蓄積、および関連遺伝子の発現を調査した<sup>7)</sup>。その結果、糖尿病の母親から生まれた仔の心臓から分離された初代心筋細胞では、GLUT4 の細胞膜への移行が阻害され、インスリン抵抗性が引き起こされていることが明らかになった。また、糖尿病の母ラットから生まれた仔の心臓やその初代心筋細胞においては、タンパク質の過度な糖化による AGEs が蓄積されていた<sup>7)</sup>。さらに単離された心筋細胞では細胞内 ROS レベルおよび NF- $\kappa$ B、腫瘍壊死因子 (TNF  $\alpha$ )、IL-6 遺伝子発現レベルは、正常な母ラットの仔と比較して有意に増加していた<sup>7)</sup>。このことは、胎児期に子宮内高血糖環境で過ごした仔では、過剰な AGEs 形成により誘発される細胞内 ROS が慢性炎症を引き起こし、その結果、心肥大となる可能性が示唆された<sup>7)</sup>。しかし、興味深いことに、糖尿病妊娠モデルラットに妊娠期間中、n-3 不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を毎日経口投与したところ、生まれてきた仔の心臓における異常なシグナル伝達が改善された<sup>7)</sup>。このことから、妊娠中の子宮内高血糖環境が、胎児の発生過程での過剰なタンパク質の AGEs 化による酸化ストレスを通じて、生まれてきた仔の心臓以外のさまざまな臓器に大きな影響を与える可能性が明らかになった (図 2)。

では、心臓以外の臓器にはどのような影響があるのだろうか？近年の疫学調査や臨床研究により、糖尿病患者ではアルツハイマー型認知症の発症頻度が高いことに注目が集まっている。アルツハイマー型認知症の発症は血糖値と強く関連しており、血糖値が正常な群よりも糖尿病型の群で多く、相対危険度は 1.2~2.3 と高く、統計学的にも有意となっている<sup>8)</sup>。また、糖尿病でなくても平均血糖値が 115 mg/dL と高めの人には、平均血糖値が 110 mg/dL の正常な人に比べ、アルツハイマー型認知症の発症率が 18% 高く、糖尿病患者 (平均血糖値 190 mg/dL) の人は 160 mg/dL の人に比べて認知症発症リスクが 40% 高いことが明らかになっている<sup>9-10)</sup>。この要因として、高血糖環境が続くことで AGEs が脳内組織に蓄積し、慢性炎症による脳神経細胞のプログラム細胞死を引き起こすことが報告されている<sup>9)</sup>。また、AGEs の受容体 (RAGE;

receptor of AGEs)が  $\beta$  アミロイドタンパク質と結合し、血液脳関門を通過させ、脳内に蓄積させることでアルツハイマー型認知症の発症に関与していると考えられている<sup>8)</sup>。

私たちは、胎児期の子宮内高血糖環境が生まれてきた子どもの脳神経細胞にどのような影響を及ぼすかについて、妊娠糖尿病ラットの大脳と初代アストログリア細胞のAktのリン酸化レベルとタンパク質のAGEs化を特異的抗体によるウェスタンブロットで解析した。その結果、糖尿病の母親から生まれた仔(IDM; Infant of Diabetic mother)の大脳では、正常の母親から生まれた子ども(ICM; Infant of Control mother)と比較して、AGEsの蓄積が1.3倍に有意に増加し(図3-a)、Aktのリン酸化レベルは0.78倍に有意に低下していた(図3-b)。一方、IDMの大脳から単離した初代アストログリア細胞では、ICMと比較して、AGEsの蓄積が約27倍に、Aktのリン酸化レベルが約6.2倍に有意に増加していた(図3-c)。

本研究では、胎児期の子宮内高血糖環境が生まれてきた仔の脳神経細胞にどのような影響を及ぼすかについて、子宮内高血糖環境を模倣した細胞モデルを用いて検討を行った。また、AGEsを介した炎症シグナルを抑制する食品成分の一つとして、機能性誘導脂質であるn-3系不飽和脂肪酸、特にエイコサペンタエン酸(EPA)の作用についての研究を行った(図4)。近年、n-7系不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸にも抗炎症作用があることが報告されてる<sup>11)</sup>。パルミトレイン酸にはシス型とトランス型がありますが、シス型パルミトレイン酸(*cis*-Palmitoleic-Acid; CPA)は体内でパルミチン酸から合成され、トランス型パルミトレイン酸(*trans*-Palmitoleic-Acid; TPA)はヒトが体内で合成できないため、乳製品などの食品から直接摂取するか、あるいは摂取した乳製品に含まれるバクセン酸から体内で変換するかの摂取経路がある(図4)<sup>11)</sup>。

このことから、パルミトレイン酸のシス型およびトランス型が高グルコース環境によって引き起こされる脳神経細胞のシグナル異常や慢性炎症にどのような効果をもたらすかを分子レベルで詳細に検討する意義は大きい。第一章では、脳神経細胞モデルとしてラットPC12細胞を使用し、高グルコース環境による炎症による細胞死を抑制するパルミトレイン酸の効果について検討した。第二章では、初代ラットアストログリア細胞と初代ヒト胎児アストログリア細胞を細胞モデルとして用い、初代ラットアストログリア細胞でのシス型およびトランス型パルミトレイン酸の細胞内ROS産生に対する効果、また初代ヒト胎児アストログリア細胞における次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解

析から見てきた、高グルコース環境に曝された細胞の遺伝子発現変動と機能性脂質を投与した際の遺伝子発現の変化について報告する。

## 第一章 神経細胞モデルとしての PC12 細胞

### I. 方法

#### I-1. 神経細胞モデルとしてのラット副腎褐色細胞腫 PC12 細胞の培養

ラット副腎褐色細胞腫(PC12 細胞)の培養には RPIM1640(Roswell Park Memorial Institute medium)培地を使用した。粉末培地を DDW で 1L に溶解し、グルコース濃度を 200 mg/dL に調整したものをコントロール培地(Control)とした。高グルコース培地には RPIM1640 培地に最終グルコース濃度を 500 mg/dL の高グルコース培地(High)とした。サプリメントとして、無菌的に、非動化した 5% FBS (fetal bovine serum)、10% HS (horse serum) および抗生物質(最終濃度 10,000 units/mL ペニシリン G、10,000  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン硫酸塩;P/S)を添加しました。PC12 細胞は 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 濃度で培養した。

#### I-2. 細胞生存率の測定

シス型パルミトレイン酸の調整は CPA (cis-9-Hexadecenoic Acid, 東京化成工業, 東京, 日本)を 99.5% エタノール(富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本)中に溶解し、200 mM に調製した。これを DDW に溶解後、0.22  $\mu$ M のメンブレンフィルターで濾過した 10% fatty acid free BSA(富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本)を用いて、最終濃度 4 mM となるよう調製し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間激しく攪拌してコンジュゲートした。

トランス型パルミトレイン酸の調製は TPA (9-trans-Hexadecenoic Acid, Cayman Chemical Company, U.S.A.)を 99.5%エタノール(富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本)中に溶解し、200 mM に調製した。これに 10% fatty acid free BSA 溶液を用いて最終濃度 4 mM となるよう調製し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間激しく攪拌してコンジュゲートした。

エイコサペンタエン酸の調製は EPA (all cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid, 東京化成工業, 東京, 日本) を 99.5% エタノール (富士フイルム和光純薬, 大阪, 日本) 中に溶解し、200 mM に調製した。これに 10% fatty acid free BSA 溶液を用いて最終濃度 4 mM となるよう調製し、4°C で 2 時間激しく攪拌してコンジュゲートした。

細胞生存率の測定は細胞生存率の測定には、脱水素酵素により還元され水溶性のホルマザンを生成するテトラゾリウム塩に対して WST-8 を発色剤として用いた Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を使用した。96 ウェルプレートに PC12 細胞を 1 ウェルあたり  $5.0 \times 10^3$  個播種し、CPA、TPA あるいは EPA とともに 100  $\mu\text{M}$  から 400  $\mu\text{M}$  の異なる濃度で暴露し、24 時間、48 時間、72 時間で培養した。各時間で Cell Counting Kit-8 を 10  $\mu\text{L}$  加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間反応させた後、マイクロプレートリーダー (ThermoMax Microplate Reader; Molecular Devices, Ramsey, MN, U.S.A.) を用いて 450 nm にて吸光度を測定し、細胞生存率を算出した。

### I-3. ウェスタンブロッティング

PC12 細胞は Control 培地および High 培地でそれぞれ 7 日間培養した。また、高グルコース培地には機能性脂質として 50  $\mu\text{M}$  の EPA、100  $\mu\text{M}$  の CPA あるいは 100  $\mu\text{M}$  の TPA をそれぞれ添加し、その影響を調べた。培養後、PC12 細胞は PBS で洗浄し、T-PER (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, U.S.A.) に 1 mM NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>、10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptine、5 mM EDTA、Protease inhibitor Cocktail、Phosphatase inhibitor Cocktail、ABSF を加えたものをタンパク質抽出用の細胞融解溶液として使用した。T-PER で細胞を融解後、超音波破碎装置 (BRANSON SONIFIER 150) でホモジナイズし、12,000 x g、4°C で 30 分間の高速遠心により上清を分離し、分析まで -80°C で冷凍保存した。タンパク質の定量は Quick Start™ Bradford Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用した。タンパク質は 12.5% の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離した。その後、PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜に GENIE Electrophoretic Transfer 装置 (Idea Scientific company, USA) を用いて 24 V で 90 分間転写した。PVDF 膜は TBS-T (5% Tween: 0.15 mM, NaCl: 50 mM Tris-HCl pH7.6) で 5 分間  $\times$  3 回洗浄後、ブロッキング溶液 (5% スキムミルク-TBS-T) にて室温で 1 時間振とうし、ブロッキングを行った。その後、TBS-T で 5 分間  $\times$  3 回洗浄

し、一次抗体を反応させた。一次抗体(抗 p-Akt473 抗体、抗 Akt473 抗体、抗 p-JNK 抗体、抗 JNK 抗体、抗 AGE 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体)は 5% BSA を含む TBS-T にて 1/1000 に希釈し、PVDF 膜を 4°C で終夜反応させた。未反応の一次抗体を TBS-T で 5 分間×3 回洗浄除去後、TBS-T で 1/5000 に希釈した二次抗体(HRP-conjugated Anti-Rabbit IgG)を加え、室温で 1 時間振とうさせ二次抗体を反応させた。未反応の二次抗体を TBS-T で洗浄後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(Merck-Millipore, Darmstadt, Germany)を用いて化学発光を行い、イメージアナライザー(Fusion Solo S: Vilber Lourmat St é , Coll é gien, France)で定量解析した。使用した抗体のうち抗 AGE 抗体(医化学創薬)以外は全て Cell Signaling Technology, Inc.より購入した。

#### I-4. 統計処理

得られたデータは、Excel(Microsoft<sup>®</sup>, Redmond, WA, U.S.A.)を用いて、平均値±標準偏差で表した。各群の有意差は *t* 検定を用いて検定し、 $p < 0.05$  を有意水準とした。

## II. 結果

### II-1. PC12 細胞における AGEs 化と栄養シグナル

PC12 細胞を High 培地に暴露した場合、コントロール培地と比較して、AGEs 化されたタンパク質の割合は High 培地で有意に約 1.4 倍増加した(図 5-a)。さらに、栄養シグナル伝達において Akt のリン酸化レベルは High 培地で有意に約 0.8 倍低下しました(図 5-b)。また、炎症シグナルを示す MAP キナーゼ(mitogen-activated protein kinase、以下 MAPK)ファミリーの一員である Jun amino terminal kinase(JNK)のリン酸化は High 培地で有意に約 1.3 倍増加しました(図 5-c)。結果として、High 培地の暴露では RAGE-AGEs シグナルが亢進し、炎症性シグナルが惹起されていた(図 5-d)。



## II-2. PC12 細胞に機能性脂質を投与した際の細胞生存率

PC12 細胞に機能性脂質である EPA、CPA および TPA を投与した際の濃度依存的な細胞生存率を調べた(図 6-8)。PC12 細胞に EPA を投与した場合、72 時間までは全ての濃度で細胞生存率はほとんど変化しなかった(図 6)。シス型パルミトレイン酸である CPA を投与すると、48 時間では 200  $\mu$ M 濃度で約 0.86 倍に細胞生存率が減少し、72 時間で 200  $\mu$ M では 0.84 倍に、300  $\mu$ M では 0.42 倍に有意に細胞生存率が低下した(図 7)。一方、トランス型パルミトレイン酸である TPA では、72 時間までは全ての濃度で細胞生存率は変化しなかった(図 8)。

## II-13. PC12 細胞に機能性脂質を投与した際のタンパク質の AGEs 化とシグナル伝達

PC12 細胞を 6 日間、高血糖環境を模倣した High 培地に暴露した場合のタンパク質の AGEs 化、Akt および JNK のリン酸化を調べた。High 培地の暴露に加えて 50  $\mu$ M の EPA、100  $\mu$ M の CPA および 100  $\mu$ M の TPA の 3 種類の機能性脂質の影響を調べた(図 9)。コントロール培地に比べて High 培地ではタンパク質の AGEs 化が約 1.4 倍増加した。しかし、High 培地に EPA と TPA を加えた場合、High 培地のみと比較してそれぞれ 0.78 倍に有意に減少した(図 10)。次に、コントロール培地に比べて High 培地での Akt のリン酸化レベルは 0.8 倍有意に減少した。しかし、CPA の投与では High 培地と比較して 1.5 倍有意に増加した。EPA や TPA では増加傾向を示した(図 11)。さらに、コントロール培地に比べて High 培地での JNK のリン酸化レベルは有意に 1.34 倍高くなった。しかし、EPA、CPA および TPA の投与により、High 培地と比較してそれぞれ 0.9、0.8、0.8 倍に有意に減少した(図 12)。

## III. 考察

糖尿病妊娠ラットから生まれた新生児の脳では、母親の子宮内高血糖環境に起因する多くのタンパク質の AGEs 化が観察された。本研究では、ラット PC12 細胞を神経細胞モデルとして、高グルコース(500 mg/dL)に曝した場合、コントロールと比較して Akt のリン酸化が減少し、炎症性シグナルが活性化することによりシグナル異常が惹起されることが示された。検証した機能性脂質である n-3 系不飽和脂肪酸の EPA と n-7 系不飽和脂肪酸の CPA および TPA は、AGEs 化を抑制し、シグナル異常を改

善する効果が見られた。細胞毒性試験や Akt のリン酸化に対する結果から、CPA と TPA ではその作用機序が異なることが示唆された。現在、関連するシグナルのリアルタイム PCR による遺伝子発現および細胞内 ROS への影響とアポトーシス関連分子について引き続き研究を行っている。

## 第二章 神経グリア細胞モデルとしてのアストログリア細胞

### I. 方法

#### I-1. 初代ラットアストログリア細胞と初代ヒト胎児アストログリア細胞の培養

Wistar ラットの脳より単離した初代脳アストログリア細胞(以下、ラット初代アストログリア細胞)は、DMEM 培地(Dulbecco's modified Eagle medium, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.)を使用し、グルコース濃度の異なるコントロール(DMEM, 100 mg/dL glucose, 10% FBS, 5% HS, P/S)および HG(DMEM, 450 mg/dL glucose, 10% FBS, 5% HS, P/S)にて培養を行った。細胞は CO<sub>2</sub>インキュベーターにて 37°C、5% CO<sub>2</sub>濃度で培養した。初代ヒト胎児アストログリア細胞は Cell Applications Inc.(San Diego, CA, U.S.A.)より購入し、専用増殖培地(Cell Applications Inc., San Diego, CA, U.S.A.)を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>濃度で培養した。

#### I-2. ラット初代アストログリア細胞への AGEs の暴露および細胞生存率の測定

AGEs-BSA は、ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA; SIGMA, St. Louis, MO, U.S.A.)を 25 mg/mL となるように最終濃度 0.2 M PBS、5 mM DTPA、0.5 M D-グルコース(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)の存在下にて、37°C で 8 週間インキュベートすることで作成した。これを、遠心限外濾過チューブ(Amicon Ultra-15, MWCO 100 kDa; Merck Millipore, Darmstadt, Germany)を用いて 9,000 rpm、4°C で 30 分間遠心し濃縮した。その後、PBS にて 4°C で一晚透析を行い、低分子反応物および未反応のグルコースを取り除いた。得られたサンプルは、10 mg/mL AGE-BSA 標準溶液(Bio Vision, Milpitas, CA, U.S.A.)を用いて、蛍光マイクロプレートリーダー(Infinite F200 Pro, TECAN Trading AG, Mannedorf, Switzerland)にて

Ex./Em.=340/465 nm で蛍光波長を測定した。定量後、合成した AGEs-BSA はフィルター滅菌し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。100  $\mu\text{M}$  から 400  $\mu\text{M}$  の異なる濃度の AGEs-BSA を 100 mg/dL のグルコース濃度の control 培地に加え、初代ラットアストログリア細胞へ 72 時間暴露し、第一章 I-3-5 に記載の Cell Counting Kit-8 を用いて AGEs-BSA に対する細胞生存率を測定した。

### I-3. ラット初代アストログリア細胞にパルミトレイン酸投与による細胞生存率の測定

初代ラットアストログリア細胞へのパルミトレイン酸の投与と細胞生存率の測定は、第一章 I-3-5 に記述した方法と同様に、72 時間で行った。

### I-4. 細胞内 ROS の測定

初代ラットアストログリア細胞を、ibidi-coating  $\mu$ -Slide 18-well プレート (IBIDI, Planegg, Germany) に 1 ウェルあたり  $5.0 \times 10^3$  個播種し、100 mg/dL のグルコースを含む control の DMEM 培地で 24 時間前培養を行った。この control の DMEM 培地に最終濃度 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の AGEs-BSA を暴露し、AGEs-BSA が細胞内 ROS の産生に及ぼす影響を下記 2) の細胞内 ROS 測定で定量した。さらに、最終濃度 100  $\mu\text{M}$  の CPA および TPA をそれぞれ添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  で 48 時間投与することで、パルミトレイン酸が細胞内 ROS 発生に与える影響を検討した。

細胞内 ROS の測定には DMEM 培地に、最終濃度 5  $\mu\text{M}$  CellROX® Green Reagent (Thermo Fisher Science, Waltham, MA, U.S.A.) と 20  $\mu\text{M}$  Hoechst 33342 (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) を蛍光染色溶液として各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  加えた。 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  で 30 分間インキュベートした後、培地を除去し、PBS にて細胞を 3 回洗浄した。3.7% のホルムアルデヒドを加え、アルミホイルで光を遮断して室温で 15 分間インキュベートし、細胞を固定した。ホルムアルデヒドを除去し、PBS にて 3 回洗浄した後、Mounting Medium (IBIDI, Planegg, Germany) を数滴加えた。細胞はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence, 大阪, 日本) を用いて蛍光観察した。蛍光画像より CellROX® Green 陽性細胞を Hoechst 33342 で得られた核染色像の細胞数でノーマライズし、コントロールと比較した。

#### I-5. 網羅的遺伝子解析のための RNA の抽出とクオリティーチェック

初代ヒト胎児アストログリア細胞は、control の 100 mg/dL のグルコースを含む Low 培地 (Low; DMEM, 100 mg/dL glucose, 10% FBS, 5% HS, P/S, 5 ng/mL b-FGF, 5 ng/mL EGF) と 450 mg/dL の高グルコースを含む High 培地 (High; DMEM, 450 mg/dL glucose, 10% FBS, 5% HS, P/S, 5 ng/mL b-FGF, 5 ng/mL EGF)、高グルコースの High 培地に 3 種類の機能性脂質である CPA (200  $\mu$ M)、TPA (200  $\mu$ M)、EPA (200  $\mu$ M) をそれぞれ添加したもの、DMEM 培地 (Low) に 300  $\mu$ g/mL の AGEs-BSA を暴露したもの、計 6 群で、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 72 時間培養を行った。細胞からの RNA の抽出は FastGene™ RNA Premium Kit (日本ジエネティクス、東京、日本) を使用し、添付のプロトコールに従いゲノム DNA の除去を全 RNA 抽出と同時にを行った。得られた全 RNA は Agilent RNA 6000 nano kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.) を用いて Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.) にてクオリティーチェックを行った。クオリティーチェックで測定した RIN の値が RIN > 7 であれば、次世代シーケンサーのライブラリー作成に問題がない品質と判断し、次のライブラリー作成に進んだ。

#### I-6. 次世代シーケンサー用ライブラリー作成と解析

150 ng の全 RNA を鋳型に KAPA mRNA HyperPrep Kit (KAPA Biosystems, Roche, Basel, Switzerland) を用いて次世代シーケンサー用のライブラリー調整を行った。次世代シーケンスは Illumina NextSeq500 (Illumina, San Diego, CA, U.S.A.) にて、NextSeq500 High Output Kit v2.5 (Illumina, San Diego, CA, U.S.A.) を用いて 43 bp のペアエンドシーケンスを行った。STAR\_2.5.3a を用いて hg19 に対してアライメント調整を行い、RSEM\_1.3.3 にて遺伝子ごとのカウント値や発現量に相当するカウントデータおよび Transcripts per million (TPM) を取得した。正規化および発現変動遺伝子の抽出には、TCC-iDEGES-DESeq を用い、 $p < 0.05$  をもって有意と判断した。発現変動遺伝子群の解析には Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用い、 $p < 0.05$  を満たす変動遺伝子を対象とし、 $|z\text{-score}| > 2$  を有意とした。

## II. 結果

### II-1. ラット初代アストログリア細胞に AGEs を暴露した場合の細胞生存率

BSA をグルコース存在下にて 37°C で 8 週間反応させて AGEs-BSA を作成した。作成した AGEs-BSA は市販標品をスタンダードとして、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて Ex./Em.=340/465 nm の蛍光強度を測定したところ、濃度は約 12.5 mg/mL であった。この AGEs-BSA をラット初代アストログリア細胞に 72 時間暴露し、濃度依存的な細胞生存率を調べた結果、200  $\mu$ M 濃度で約 0.86 倍、300  $\mu$ M および 400  $\mu$ M では 0.73 倍に細胞生存率が有意に低下した(図 13)。

### II-2. ラット初代アストログリア細胞に CPA および TPA を暴露した場合の細胞生存率

CPA をラット初代アストログリア細胞に 72 時間投与し、濃度依存的な細胞生存率を調べた結果、300  $\mu$ M 濃度で約 0.85 倍、400  $\mu$ M では 0.81 倍に細胞生存率が有意に低下した(図 14)。一方、TPA を投与した場合には、400  $\mu$ M までの濃度で細胞生存率に大きな変化は見られなかった(図 15)。

### II-3. アストログリア細胞に AGEs-BSA を暴露した場合の細胞内 ROS

ラット初代アストログリア細胞に 300  $\mu$ g/mL の AGEs-BSA を 72 時間暴露し、細胞内 ROS を測定したところ、control と比較して AGEs-BSA の暴露により、細胞内 ROS が約 97 倍に有意に増加した(図 16)。さらに、AGEs-BSA を暴露した細胞に CPA および TPA を加えると、細胞内 ROS はそれぞれ 0.28 倍および 0.15 倍に有意に減少した(図 16)。

### II-4. ヒト胎児アストログリア細胞の次世代シーケンサーによる RNA-seq

次世代シーケンサー用に単離した RNA は、全ての群において十分な量を確保できた。Agilent 2100 バイオアナライザーを用いた品質チェックにおいても RIN の値は全て 9 を超えており、品質に問題はなかった(図 17)。得られた全リードからカウントデータおよび TPM の発現量行列を用いて、発現変動遺伝子を検出するためにバイオイン

フォーマティクス手法を用いて正規化、確率分布推定および検定を行った(図 18)。主成分分析(PCA)により、ヒト胎児アストログリア細胞は、コントロールのグルコース濃度 100 mg/dL の培地と高グルコース濃度 450 mg/dL の培地では、遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが示された。また、コントロールのグルコース培地に AGEs-BSA を暴露させると、その遺伝子発現プロファイルは高グルコース培地に近づくことも明らかになった(図 19)。さらに、高グルコース培地で CPA および TPA を投与すると、その遺伝子発現プロファイルはコントロール培地に近づき、正常化することが示された(図 20)。一方、n-3 系不飽和脂肪酸である EPA は、低グルコース培地や CPA および TPA とは異なる遺伝子発現プロファイルを示した(図 20)。IPA 解析によるパスウェイ解析では、高グルコース培地およびコントロールの低グルコース培地に AGEs-BSA を加えると、cell cycle や kinetochore metaphase signal 経路が活性化されることが示された(図 21)。また、高グルコース環境では、小胞体ストレス応答やコレステロール生合成が不活性化されたが、EPA、CPA および TPA の投与により、これらの遺伝子発現が再び活性化されることが確認された。

### III. 考察

アストログリア細胞は、血液脳関門の形成や物質の脳への通過制御、神経細胞への栄養供給などに重要な役割を果たしている。本研究では、ラット初代アストログリア細胞を高グルコース環境に曝すことで、タンパク質の過度な AGEs 化が引き起こされることが明らかになった。この AGEs 化は、栄養シグナルの重要な鍵タンパク質である Akt のリン酸化を阻害した。また、高グルコースで作成した AGEs-BSA をラット初代アストログリア細胞に暴露すると、細胞内 ROS が増加し、炎症シグナルの活性化が示唆された。機能性脂肪酸である EPA、CPA および TPA は、これらの炎症作用を示したが、シス型の CPA とトランス型の TPA では作用機序に差異がある可能性が示唆された。ヒト胎児アストログリア細胞をモデルとした次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析では、PCAにおいて、ヒト胎児アストログリア細胞の遺伝子発現プロファイルが、コントロールのグルコース濃度 100 mg/dL と高グルコース濃度 450 mg/dL の培地で大きく異なることが確認された。さらに、CPA および TPA の投与によって、高グルコース培地での遺伝子発現プロファイルが正常化されることが明らかになった。EPA とパルミトレイン酸の遺伝子発現プロファイルが異なることから、それぞれの機能性脂肪酸の

作用機構に違いがあることが示唆された。また、パスウェイ解析により、ヒト胎児アストログリア細胞において、高グルコース環境や AGEs-BSA の暴露が DNA 代謝や結合組織の増殖能を活性化し、糖尿病患者で見られるような小胞体ストレス応答によりコレステロール合成が不活性化されることが示された。しかし、CPA や TPA の添加により、コレステロール合成の不活化が解消された。さらに、細胞周期や PI3 キナーゼ-Akt/PKB キナーゼ経路が亢進される一方で、機能性脂肪酸の添加によりこれらが抑制されることが確認された。今後は、バイオインフォマティクスから得られた情報を基に、リアルタイム PCR やウェスタンブロット法を用いて、関連遺伝子の詳細な発現解析を進める必要があると考えられる。

### 第三章 まとめ

本研究では、子宮内高血糖環境が胎児の神経グリア細胞において多くのタンパク質を AGEs 化し、RAGE-AGEs シグナルの活性化および細胞内 ROS の過剰産生を通じて炎症シグナルを亢進させ、その結果、プログラム細胞死を誘発することが示唆された。また、n-3 系不飽和脂肪酸である EPA が持つ抗炎症作用が、このような高血糖環境がもたらすシグナル異常を改善することが明らかになった。さらに、興味深いことに、n-7 系不飽和脂肪酸である CPA および TPA が、遺伝子プロファイリングにおいて正常なプロファイルに戻す役割を果たし、シス型の CPA とトランス型の TPA では分子メカニズムが異なることが明らかとなった。

### 謝辞

本研究を遂行するに当たり、これまで実験を手伝って頂いた大井聡美さん(東北大学大学院農学研究科機能分子解析学)、徳永弥月さん(東京大学大学院農学研究科獣医薬理学)、鳥海彰世さん(群馬大学 大学院医学系研究科 公衆衛生学)、大上桜香さん(群馬大学 大学院医学系研究科 総合外科学)、吉崎瞳さん(日本医科大学 大学院医学系研究科 生理学)に深く感謝する。

## 研究組織

### (1) 代表研究者

実践女子大学・生活科学部・食生活科学科 教授 中村彰男

### (2) 共同研究者

高崎健康福祉大学 健康福祉学部 健康栄養学科 講師 河原田 律子

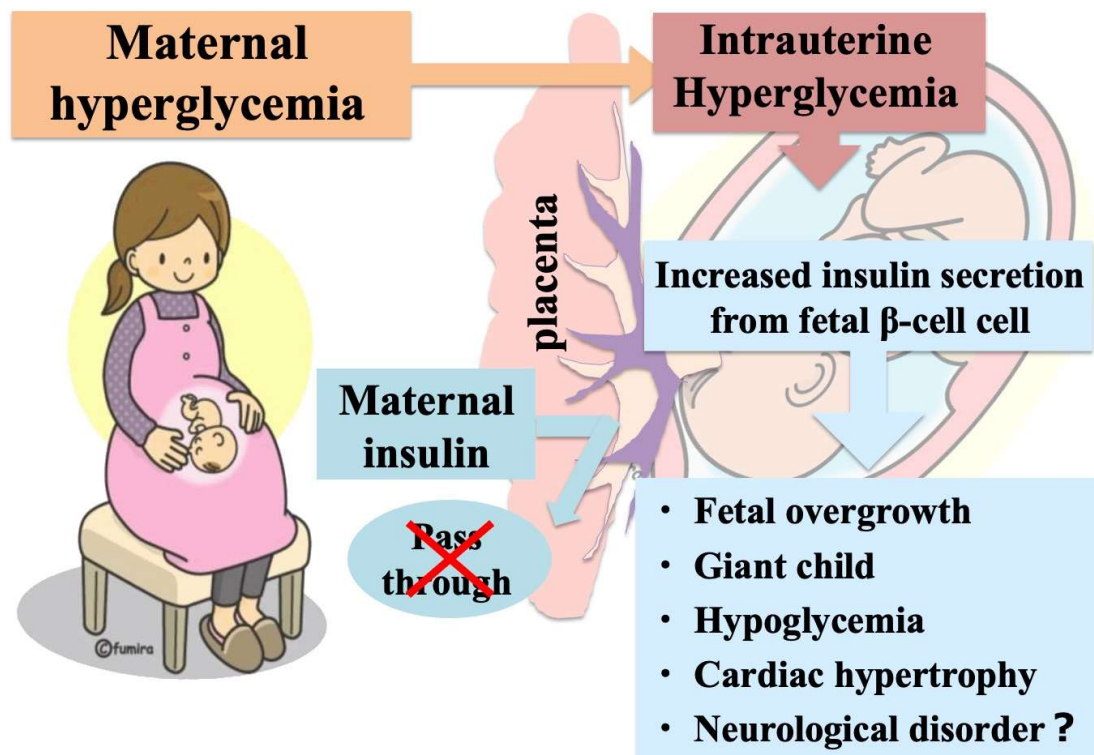
群馬大学 未来先端研究機構 統合腫瘍学研究部門 講師 川端 麗香

## 引用文献

1. Barker, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. *British Medical Journal*. 1990;301:1111.
2. Barker, D. J. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*. 2007;261:412-417.
3. Barker, D. J., Gluckman, P. D., Godfrey, K. M., et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993;341:938-941.
4. Barker, D. J., Eriksson, J. G., Forsén, T., et al. The fetal origins of adult disease. *International Journal of Epidemiology*. 2002;31:1235-1239.
5. Hanson, M. A., & Gluckman, P. D. Early developmental conditioning of later health and disease: Physiology or pathophysiology? *Physiological Reviews*. 2014;94:1027-1076.
6. Nasu-Kawaharada, R., Nakamura, A., Kakarla, S. K., et al. A maternal diet rich in fish oil may improve cardiac Akt-related signaling in the offspring of diabetic mother rats. *Nutrition*. 2013;29:688-692.
7. Kawaharada, R., Masuda, H., Chen, Z., et al. Intrauterine hyperglycemia-induced inflammatory signaling via the receptor for advanced glycation end products in the cardiac muscle of the infants of diabetic mother rats. *European Journal of Nutrition*. 2018;57:2701-2712.
8. Ohara, T., Doi, Y., Ninomiya, T., et al. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama Study. *Neurology*. 2011;77:1126-1134.
9. 猪原匡史:高血糖とアルツハイマー病, *医学のあゆみ*, 2014;249:545-550.

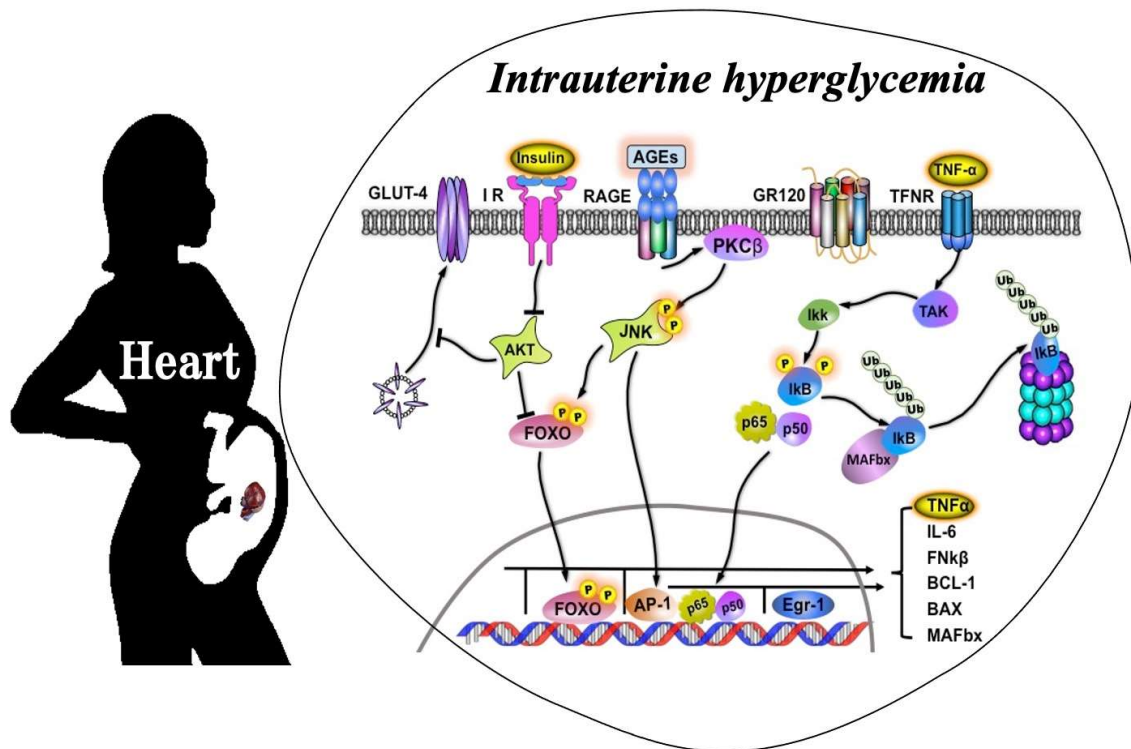


10. Renaud, J., Bournival, J., Zottig, X., & Martinoli, M.-G. Resveratrol protects DAergic PC12 cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: Effect on p53 and GRP75 localization. *Neurotoxicity Research*. 2014;125:100-123.
11. Oliveira, C. S., Verlengia, G., Rocha, J. C. R., & Curi, R. Is palmitoleic acid a plausible nonpharmacological strategy to prevent or control chronic metabolic and inflammatory disorders? *Molecular Nutrition & Food Research*. 2018;62: doi:10.1002/mnfr.201700504.



### 図 1. 子宮内高血糖が胎児に及ぼす影響

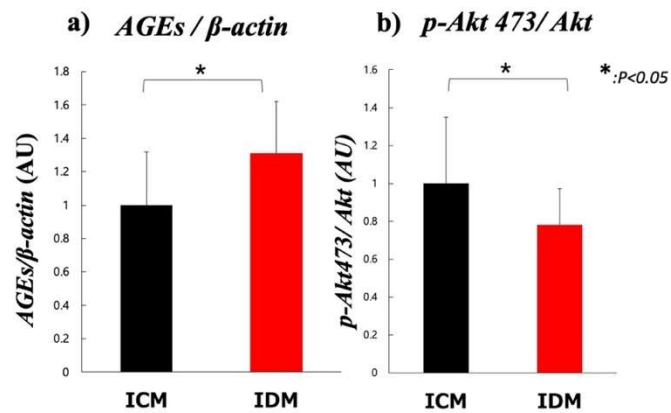
母親が妊娠期に高血糖であると、胎児は胎盤を通じて母親の高血糖環境に曝される。これまで、糖尿病の母親から生まれた子どもでは、巨大児や心肥大、代謝異常などの合併症を引き起こすことが報告されている。



**図 2 高血糖環境は、胎児の心臓のシグナル異常を惹起する。**

糖尿病の母親から生まれた子どもの心臓や分離された初代心筋細胞では、タンパク質の過度な AGEs 化により、RAGE-AGE シグナルによる炎症性サイトカインの放出や細胞内 ROS が慢性炎症 (NF- $\kappa$ B、TNF  $\alpha$ 、IL-6 の上昇) を引き起こすことで、インスリン抵抗性が惹起され、その結果心肥大となる可能性が明らかになった<sup>7)</sup>。

## 大脳



## アストログリア細胞

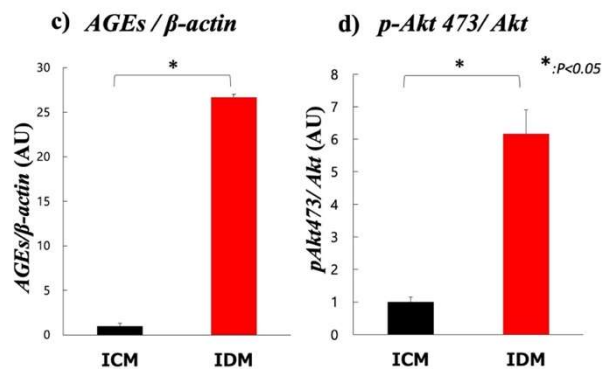
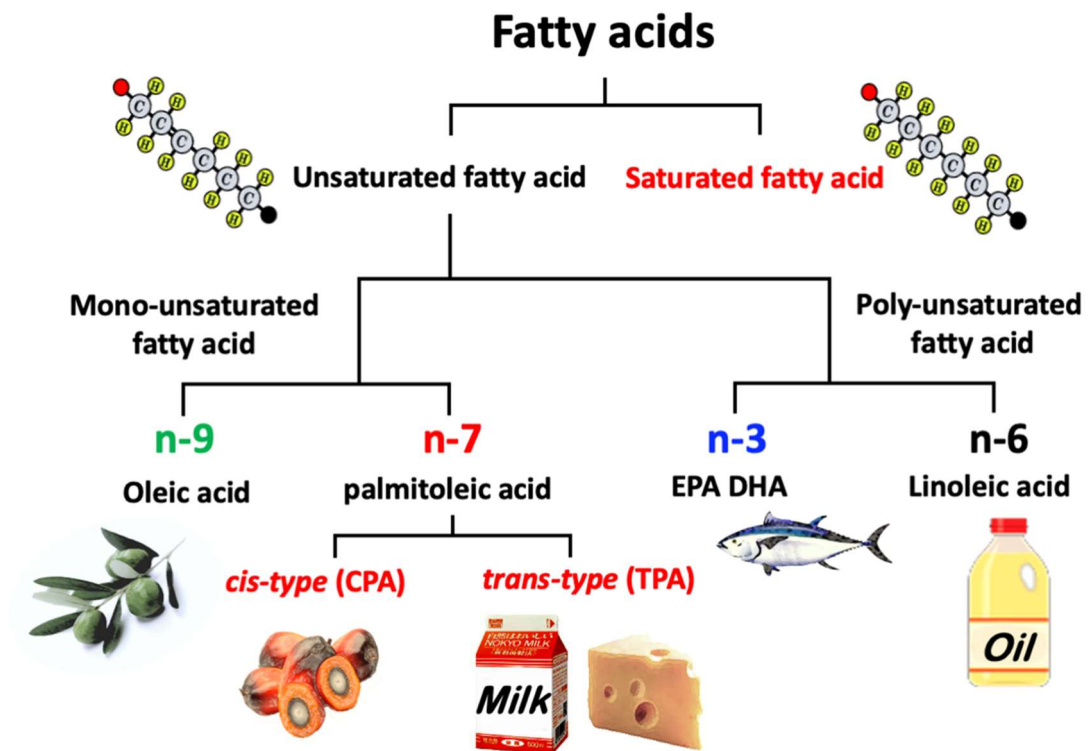


図3 糖尿病妊娠ラットから生まれた子どもの大脳および初代アストログリア細胞におけるAGEs 化とAktのリン酸化レベルの解析

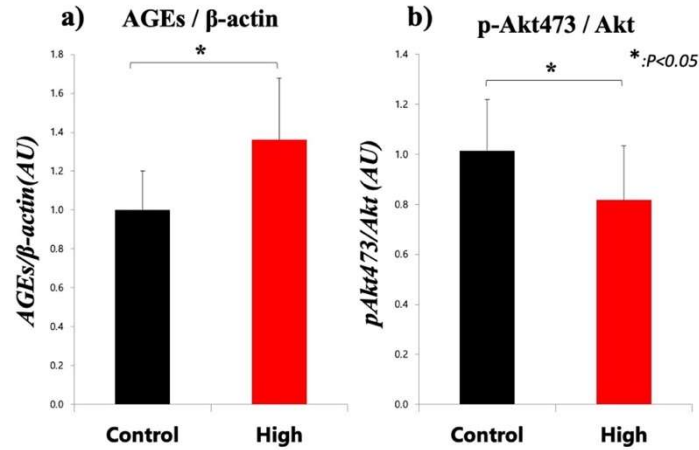
糖尿病の母ラットから生まれた子ども (IDM) と IDM の大脳から単離した初代アストログリア細胞における AGEs の蓄積と Akt のリン酸化レベルを、正常の母親から生まれた子ども (ICM) と比較し解析した。a; 大脳における *AGEs*, b; 大脳における *p-Akt*473, c; アストログリア細胞における *AGEs*, d; アストログリア細胞における *p-Akt*473



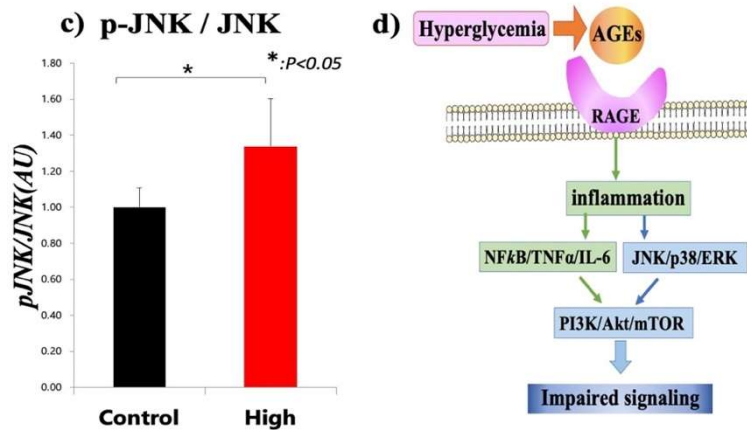
**図 4 脂肪酸の分類**

子宮内高血糖環境を模倣した細胞モデルに添加した、シス型パルミトリン酸(CPA)とトランス型パルミトリン酸(TPA)は n-7 系不飽和脂肪酸に属し、エイコサペンタエン酸(EPA)は n-3 系不飽和脂肪酸に属する。

## PC-12細胞

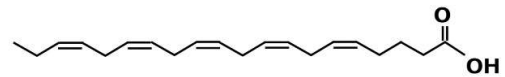
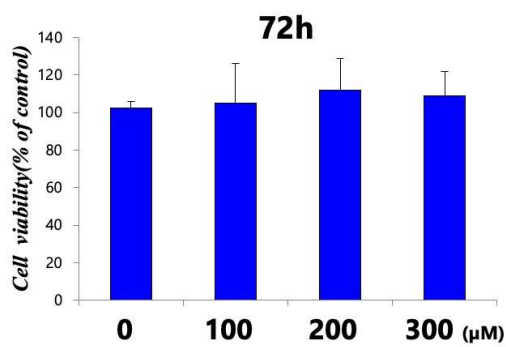
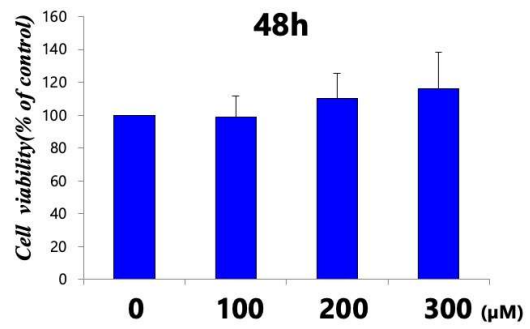
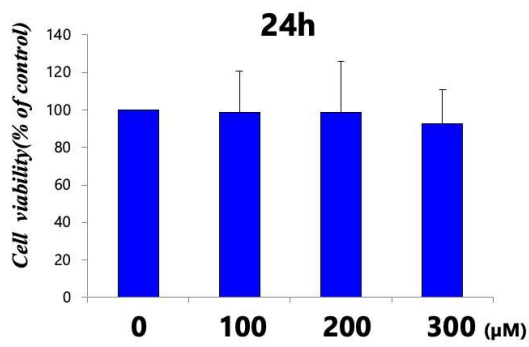


## PC-12細胞



**図 5 High培地で培養したPC12 細胞における AGEs 化とシグナル伝達への影響**

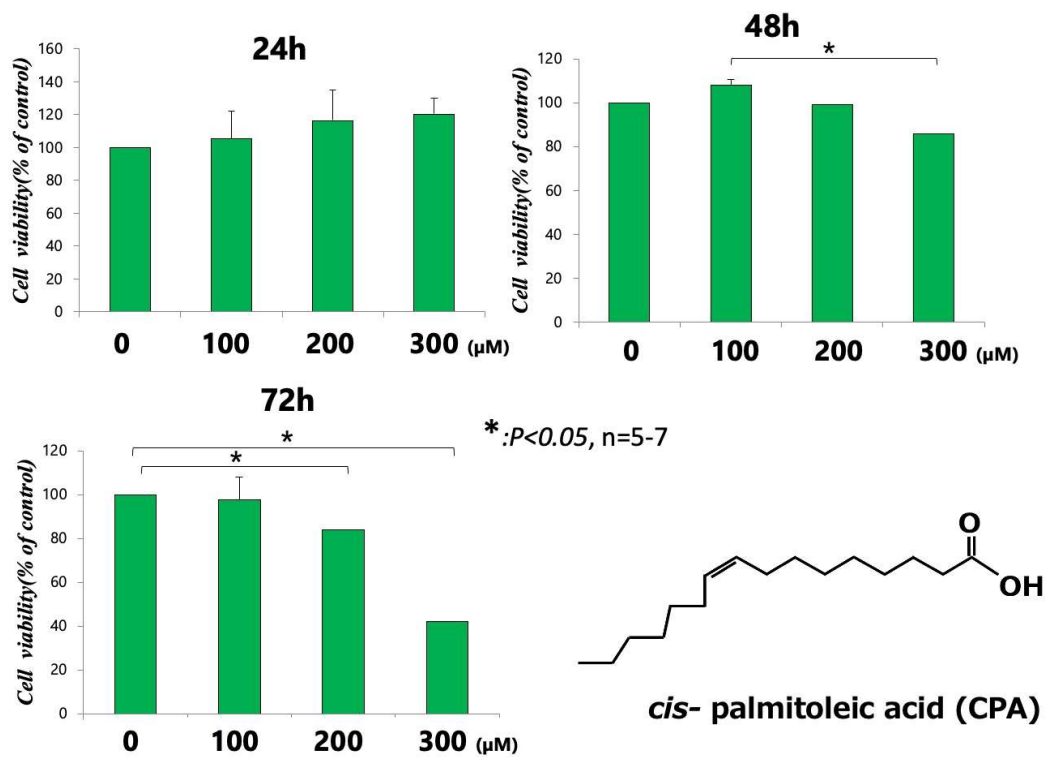
PC-12細胞を High 培地に暴露した場合、control 培地と比較すると、AGEs化されたタンパク質の割合は High 培地で有意増加し(図 5-a)、Akt のリン酸化レベルは有意に低下し(図 5-b)、炎症シグナルを示す MAP キナーゼファミリーの JNK のリン酸化は有意に低下した(図 5-c)。このことから、高血糖に曝露することで、AGEs 化の増加が炎症を惹起し、インスリンシグナル伝達を障害することが明らかになった(図 5-d)。



**Eicosapentaenoic Acid (EPA)**

**図 6 EPA を投与したPC12細胞の細胞生存率**

PC12細胞に EPA を 72 時間までは全ての濃度で細胞生存率はほとんど変化しなかった。



### 図 7 CPA を投与したPC12細胞の細胞生存率

PC12 細胞に、シス型パルミトレイン酸である CPA を投与すると、48時間では 300 μM 濃度で減少し、72時間で 200 μM 濃度以上になると有意に細胞生存率が低下した。



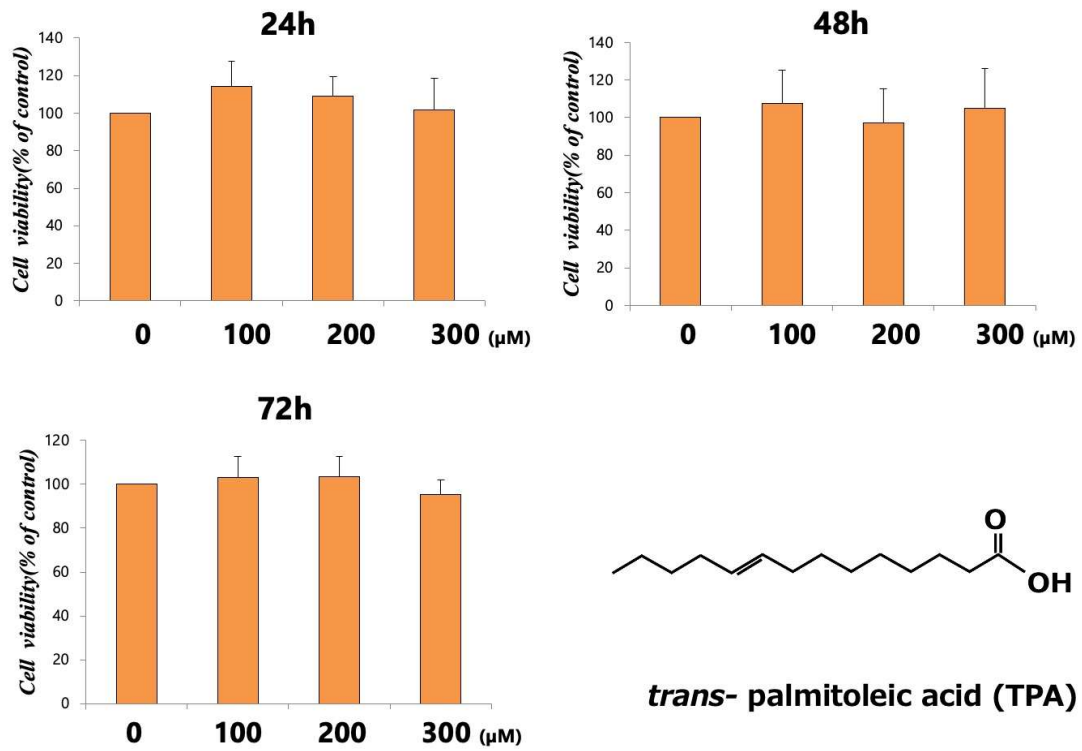


図 8 TPA を投与したPC12細胞の細胞生存率

トランス型パルミトレイン酸である TPA では 72 時間まで全ての濃度で細胞生存率はほとんど変化しなかった。

## Effect of fatty acids on PC12 cell in high glucose environment

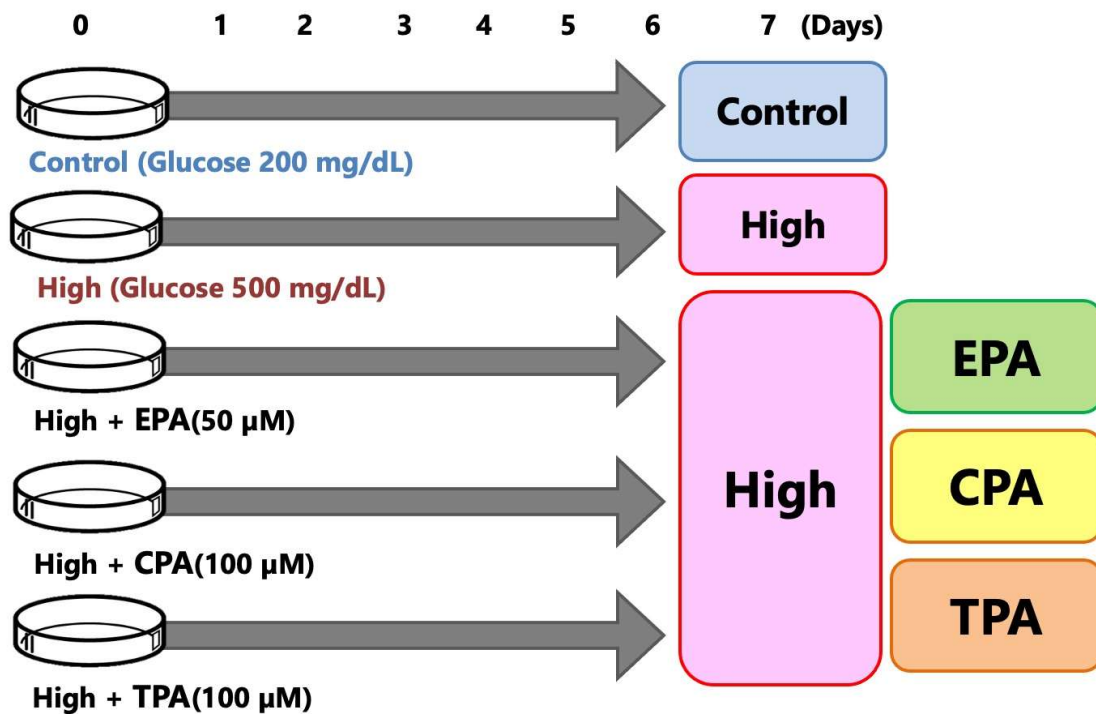
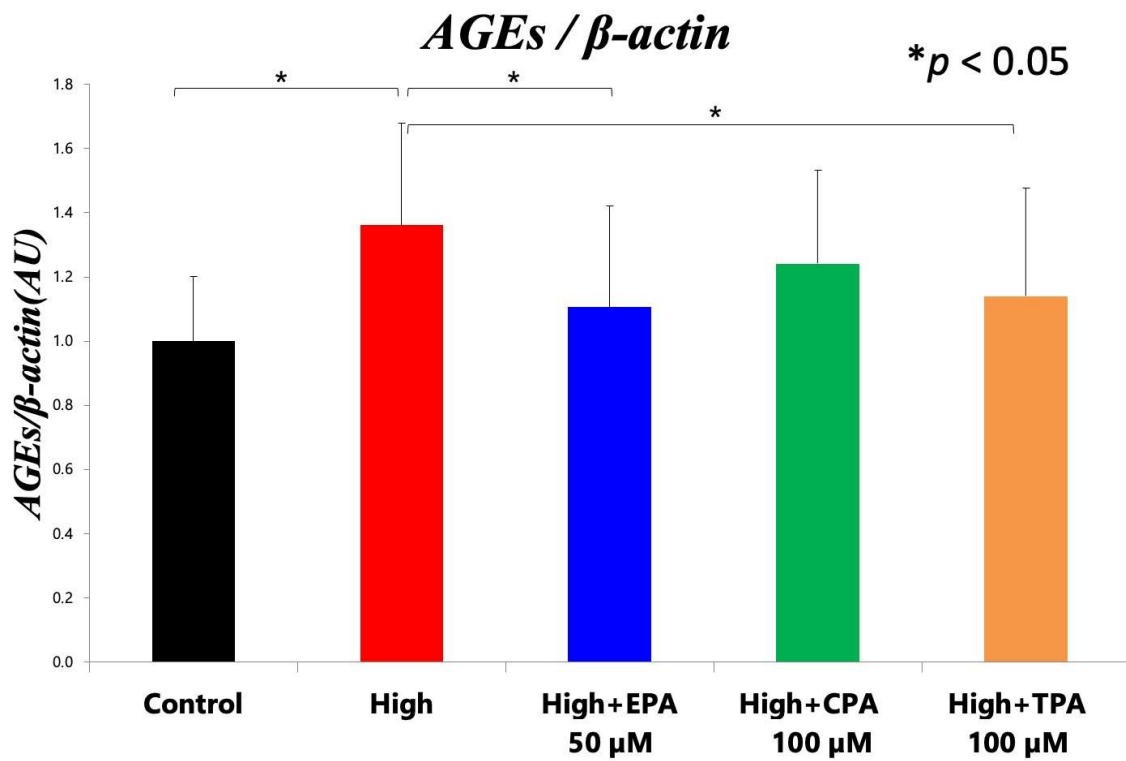


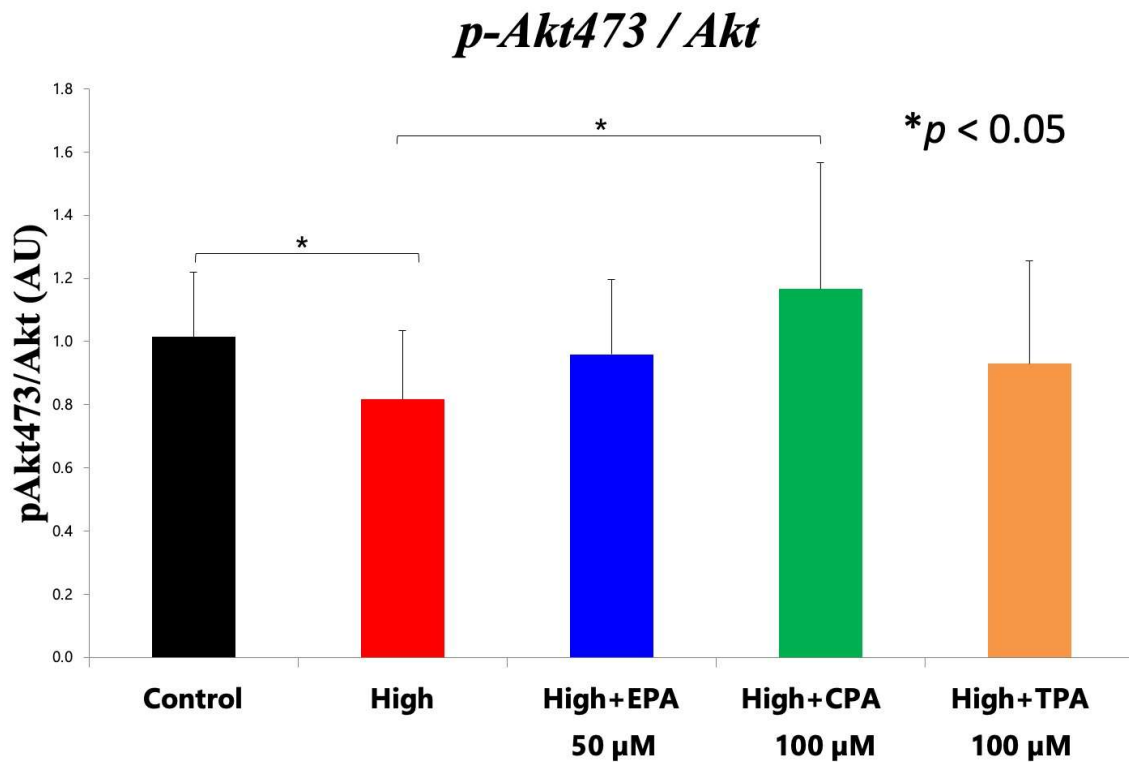
図9 高グルコースを暴露したPC12細胞におけるEPA、CPAおよびTPAの影響

PC12細胞を7日間、高血糖環境を模倣したHigh培地に暴露した場合のタンパク質のAGEs化、AktおよびJNKのリン酸化を調べた。High培地の暴露に加えて50  $\mu$ MのEPA、100  $\mu$ MのCPAそして100  $\mu$ MのTPAの3種類の機能性脂質の影響を調べた。



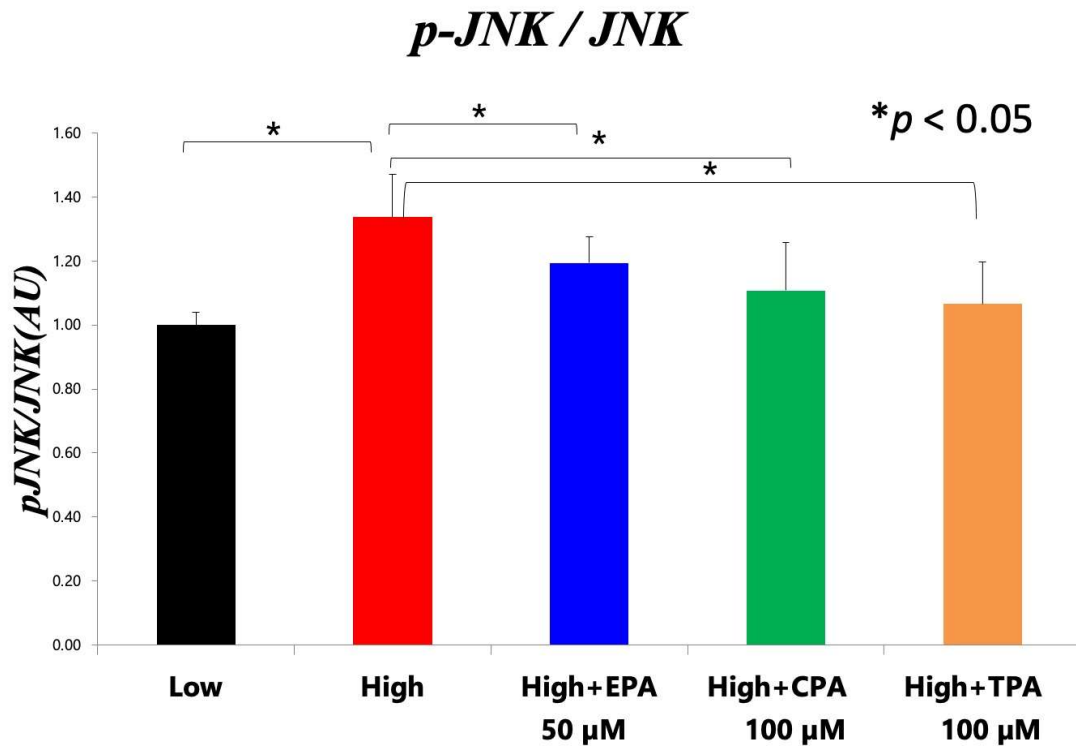
**図 10 高グルコース環境で培養した細胞における EPA、CPA および TPA が AGEs 化に及ぼす影響**

PC12 細胞は、コントロール培地に比べて High 培地ではタンパク質の AGEs 化が増加したが、High 培地に EPA と TPA を加えた場合、High 培地のみと比較して有意に減少した。



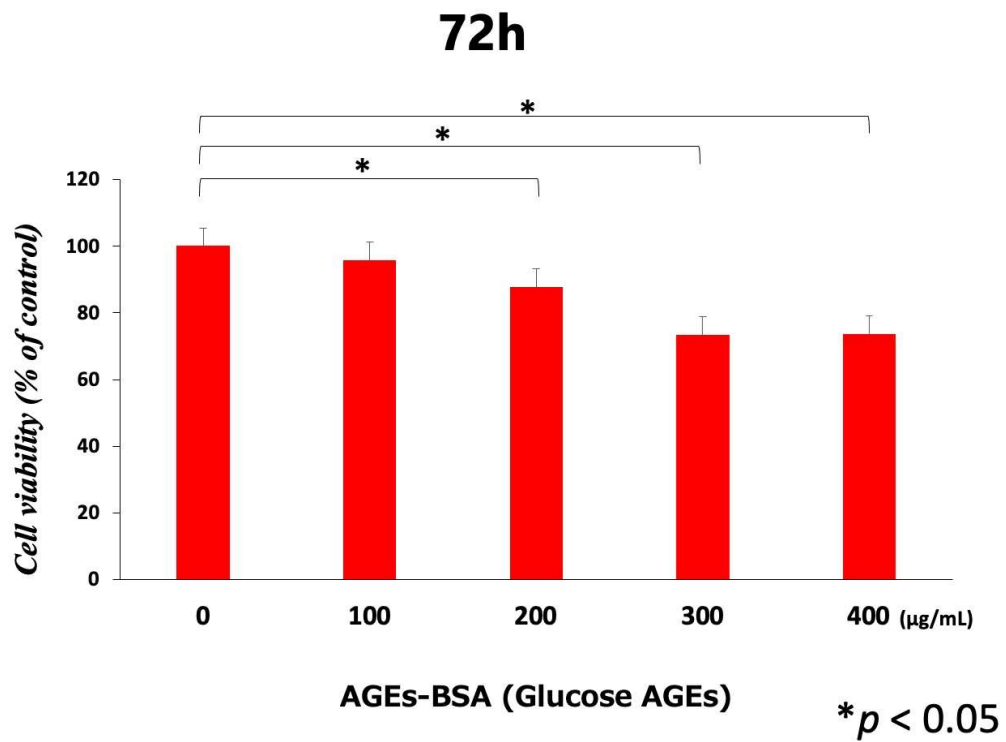
**図 11 高グルコース環境で培養した細胞における EPA、CPA および TPA が Akt リン酸化に及ぼす影響**

PC12 細胞では、コントロール培地に比べて High 培地での Akt のリン酸化レベルは有意に減少したが、CPA の投与では High 培地と比較して有意に増加した。EPA や TPA では増加傾向を示した。



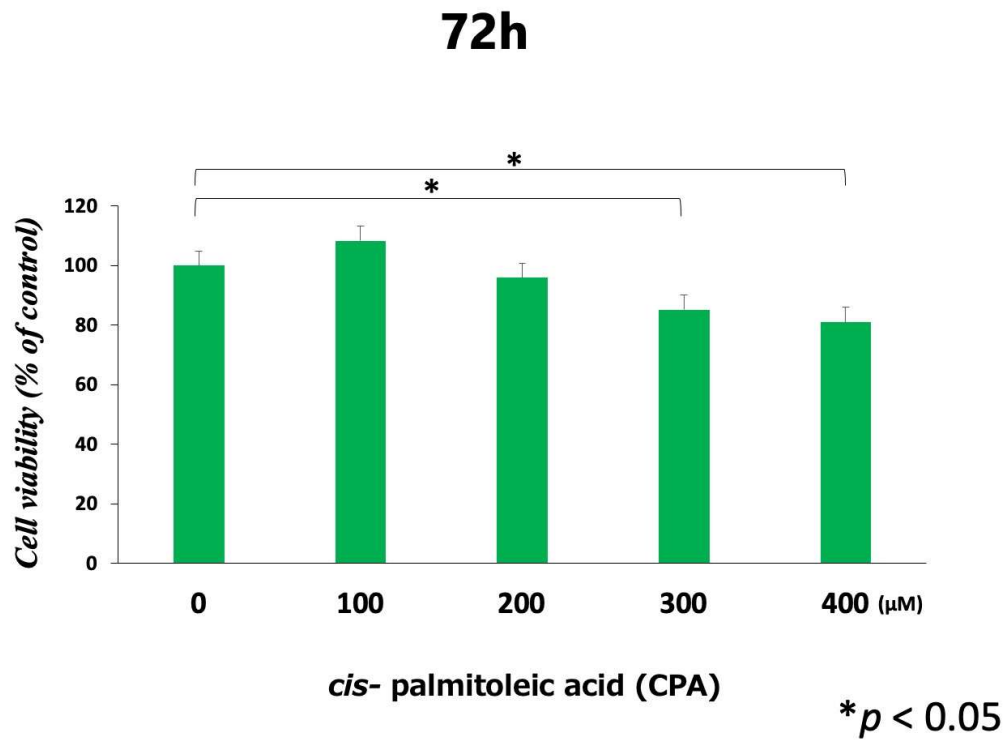
**図 12 高グルコース環境で培養した細胞における EPA、CPA および TPA が JNK リン酸化に及ぼす影響**

PC12 細胞では、コントロール培地に比べて High 培地での JNK のリン酸化レベルは有意に高くなったが、EPA、CPA、TPA の投与により High 培地と比較して、有意に減少した。



**図 13 AGE-BSAを曝露したラットアストログリア細胞における細胞生存率**

ラット初代アストログリア細胞にAGEs-BSAを72時間暴露した場合の細胞生存率は、200 µM濃度以上になると、有意に低下した。



**図 14 CPA を投与したラットアストログリア細胞における細胞生存率**

ラット初代アストログリア細胞に CPA を 72 時間暴露した場合の細胞生存率は、300 μM 濃度以上で有意に低下した。

72h

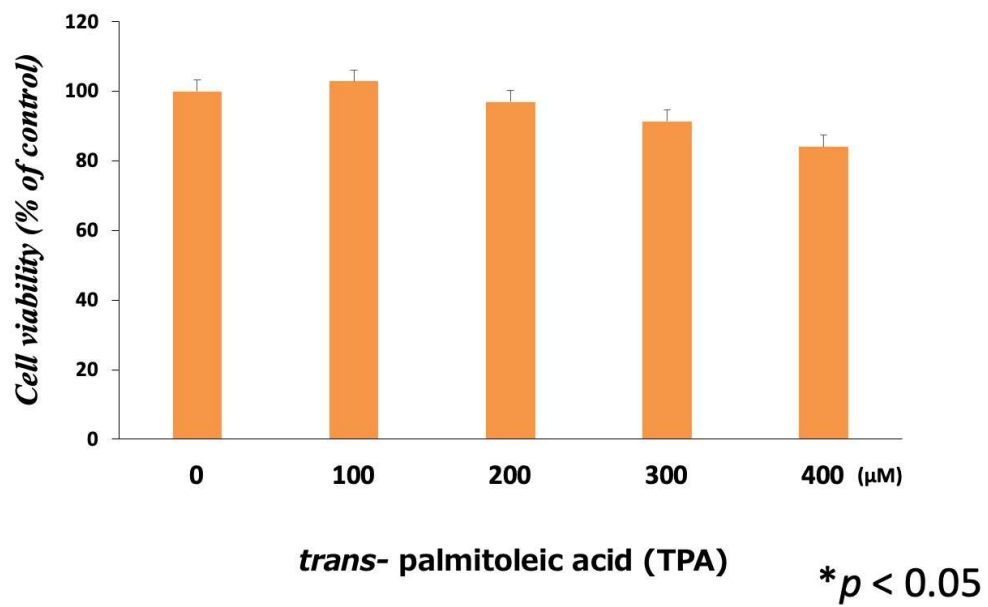
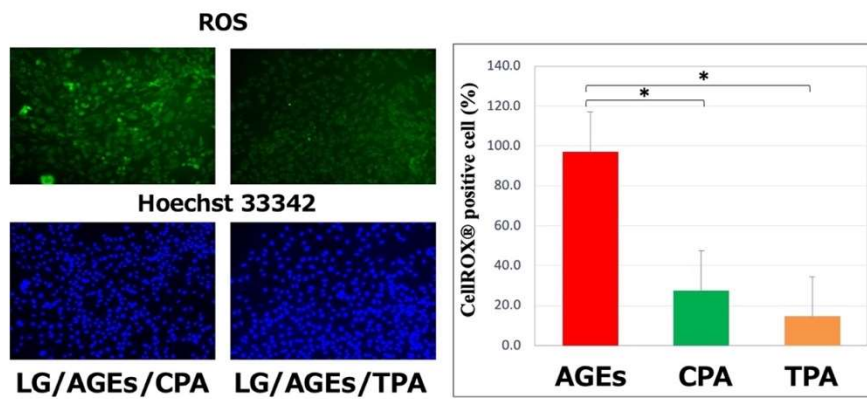
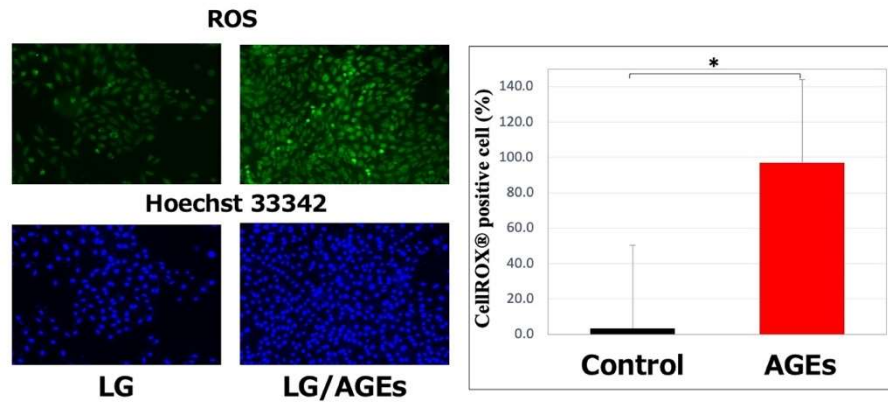


図 15 TPA を投与したラットアストログリア細胞における細胞生存率

ラット初代アストログリア細胞に TPA を 72 時間暴露した場合の細胞生存率は、400 μM まで大きな変化は見られなかった。





**図 16 AGE-BSA および CPA、TPAを投与したラットアストログリア細胞におけるROSに及ぼす影響**

ラット初代アストログリア細胞に 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の AGEs-BSA を 72 時間暴露したところ、細胞内 ROS が有意に増加した。さらに AGEs-BSA を暴露した細胞に CPA と TPA を加えることにより、細胞内 ROS は有意に減少した。

## Sample list of Human neonatal Astrocyte

No	sample		RNA conc. (ng/ $\mu$ l)	A260/A280	RIN	Date_RIN	Date_Prep	Input RNA (ng)	Fragmentation
1	Low	100 mg/mL glucose	375	1.854	9.5	2020/10/22	2020/11/12~	150	6 min at 94°C
2	High	500 mg/mL glucose	309.5	1.892	9.5	2020/10/22	2020/11/12~	150	6 min at 94°C
3	CPA	200 $\mu$ M	341.5	1.917	9.5	2020/10/22	2020/11/12~	150	6 min at 94°C
4	TPA	200 $\mu$ M	238	1.970	9.5	2020/10/22	2020/11/12~	150	6 min at 94°C
5	EPA	200 $\mu$ M	320.5	1.900	9.3	2020/10/22	2020/11/12~	150	6 min at 94°C
6	AGEs-BSA	300 $\mu$ g/mL	398	1.899	9.5	2020/10/22	2020/11/12~	150	6 min at 94°C

## Mapping summary

STAR-RSEM	Low_S1	High_S2	CPA_S3	TPA_S4	EPA_S5	AGEs-BSA_S6	Average
Number of input reads	28688981	29333309	30492476	29833267	32933675	29180710	<b>30077069.7</b>
Average input read length	85	85	85	85	85	85	
UNIQUE READS:							
Uniquely mapped reads number	24967159	25672033	26516249	25872853	28568738	25358233	<b>26159210.8</b>
Uniquely mapped reads %	87.03%	87.52%	86.96%	86.72%	86.75%	86.90%	<b>86.98%</b>

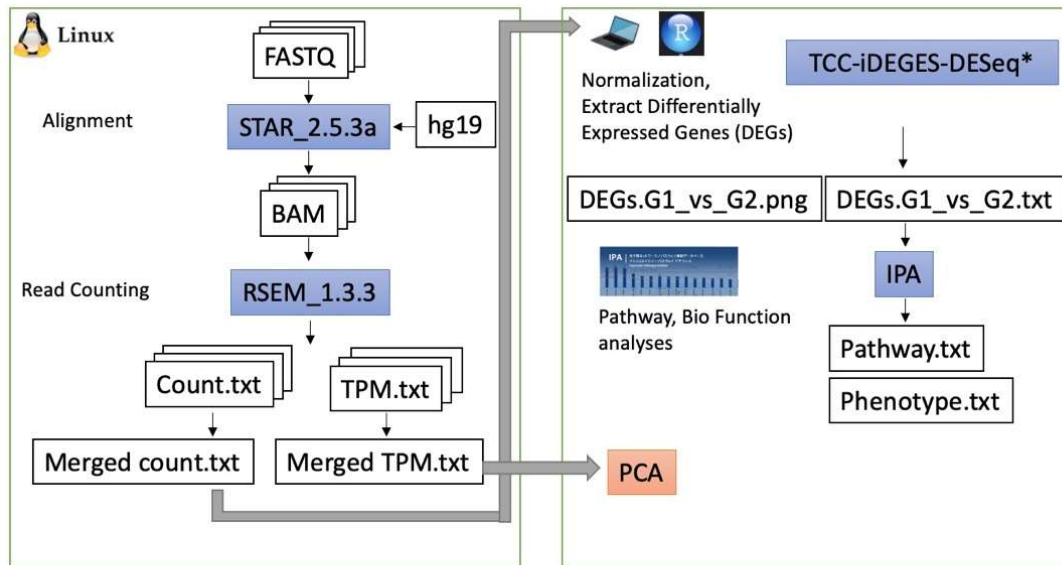
  

Uniquely mapped reads number	24967159	25672033	26516249	25872853	28568738	25358233	<b>26159210.8</b>
Uniquely mapped reads %	87.03%	87.52%	86.96%	86.72%	86.75%	86.90%	<b>86.98%</b>

### 図 17 ヒト胎児アストログリア細胞の全 RNA 抽出と RNA-seq のリード数

ヒト胎児アストログリア細胞の 6 群の細胞より全 RNA の抽出を行い、その品質をバイオアナライザーで行った。全てのサンプルで RIN は 9.0 を越えていた。

# Bioinformatics Workflow



\*[http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r\\_seq.html#analysis\\_deg\\_2\\_unpaired\\_nasi\\_TCC](http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r_seq.html#analysis_deg_2_unpaired_nasi_TCC)

## 図 18 次世代型シーケンサーデータからのバイオインフォマティクス解析

得られた全リードから得られたカウントデータおよび TPM の発現量行列から発現変動遺伝子を検出するためにバイオインフォマティクス手法を用いて正規化、確率分布推定および検定の 3 ステップでなった。

## PCA using gene TPM

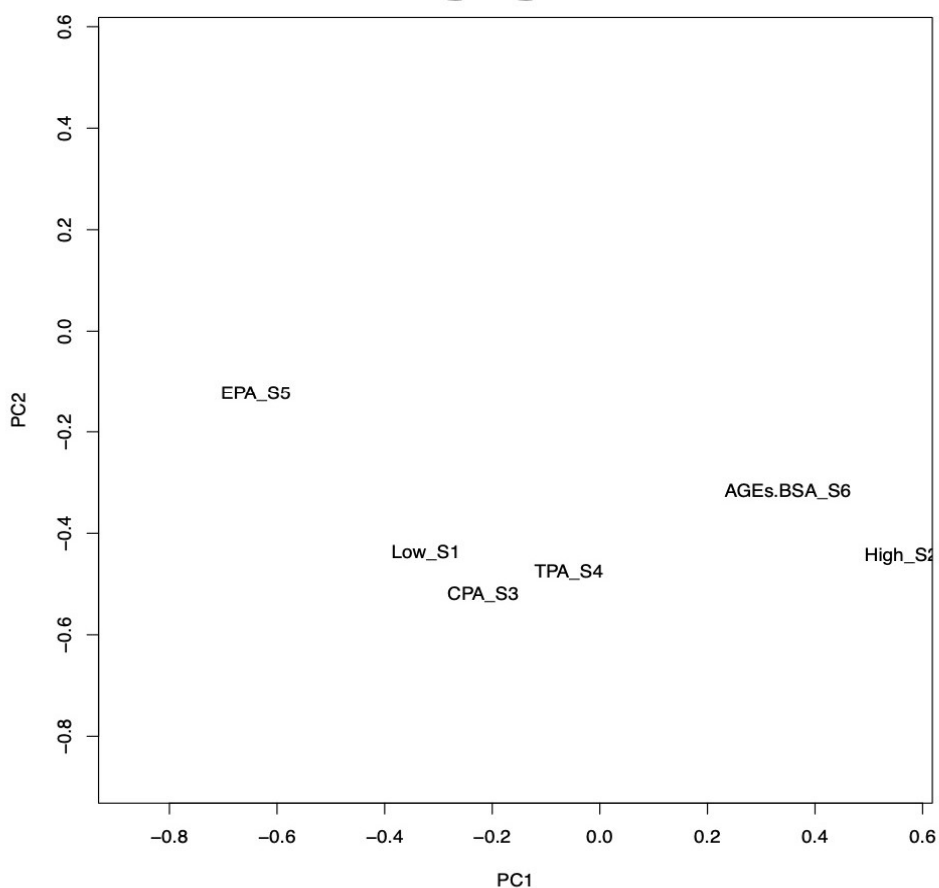


図 19 主成分分析による遺伝子プロファイリング

主成分分析(PCA; Principal Component Analysis)により、TPM 正規化遺伝子発現プロファイリングを行った。コントロールグルコース培養下と高グルコース培養下とでは遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが示されている。

# Top 20 Canonical Pathways

heatmap of activation z-score

Canonical Pathways	AN_result_	AN_result_	AN_result_	AN_result_	AN_result_
	TCC	TCC	TCC	TCC	TCC
	DESeq_Ge	DESeq_Ge	DESeq_Ge	DESeq_Ge	DESeq_Ge
	ne_Low_vs	ne_High_vs	ne_High_vs	ne_High_vs	ne_Low_vs
	_High_p0.0	_CPA_p0.0	_TPA_p0.0	_EPA	_AGES-
	5	5	5	p0.05	BSA p0.05
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	4.243	4	4	4	3
Unfolded protein response	-3.5	3.771	3.153	3.742	-3.051
Kinetochoe Metaphase Signaling Pathway	3.651	-3.024	-3.402	-3.528	3.578
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	-3.742	N/A	3.873	3	-2.449
Cyclins and Cell Cycle Regulation	2.714	-2.111	-3	-1.897	3
Estrogen-mediated S-phase Entry	2.53	-2.449	-2.333	-2.121	2.646
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	2.496	-2.496	-2.53	-1.155	3.051
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	-2.53	2.646	2	2.121	-1.633
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	-2.828	N/A	3	2.236	-2
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	-2.828	N/A	3	2.236	-2
Cholesterol Biosynthesis I	-2.828	N/A	3	2.236	-2
Endoplasmic Reticulum Stress Pathway	-1.89	1.89	1.89	2.449	-1.89
tRNA Charging	-2.449	2.449	2.449	N/A	-2.646
NER Pathway	2.714	-1.897	-2.828	-2.449	N/A
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	1.941	-1.508	-1.732	-1.941	2.333
Endocannabinoid Cancer Inhibition Pathway	-1.667	-1.414	2.111	1.667	-2.333
Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	-2.236	1.342	2.236	1.342	-2
Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway	1.134	-2	-2.449	-1.633	1.633
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	1.414	-1.633	-2.121	-1.89	1.633
Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	1	-2.333	-1.414	-1.342	2.53

# Top 20 Bio Functions

heatmap of activation z-score

Diseases and Bio Functions	AN_result_	AN_result_	AN_result_	AN_result_	AN_result_
	TCC	TCC	TCC	TCC	TCC
	DESeq_Ge	DESeq_Ge	DESeq_Ge	DESeq_Ge	DESeq_Ge
	ne_Low_vs	ne_High_vs	ne_High_vs	ne_High_vs	ne_Low_vs
	_High_p0.0	_CPA_p0.0	_TPA_p0.0	_EPA	_AGES-
	5	5	5	p0.05	BSA p0.05
Metabolism of DNA	3.163	-2.906	-3.208	-3.758	2.693
Proliferation of connective tissue cells	3.177	-3.08	-3.295	-2.948	3.138
Growth of connective tissue	3.054	-3.235	-3.291	-2.856	2.964
Cell transformation	2.796	-3.121	-2.821	-2.362	4.181
Apoptosis of cervical cancer cell lines	-3.45	2.817	2.728	2.403	-3.644
Alignment of chromosomes	3.045	-2.728	-3.045	-3.045	2.975
Cell viability of tumor cell lines	2.56	-2.259	-3.14	-2.419	4.38
Cell proliferation of fibroblasts	2.875	-2.992	-2.911	-3.264	2.319
Cell proliferation of carcinoma cell lines	2.815	-2.566	-2.989	-2.147	3.764
Cell proliferation of tumor cell lines	2.604	-3.005	-2.322	-2.177	3.826
Organismal death	-2.363	2.462	2.969	0.402	-5.432
Entry into interphase	2.636	-2.148	-2.781	-2.909	2.51
Migration of cells	1.618	-2.215	-1.586	-2.891	4.744
Formation of gamma H2AX nuclear focus	-3.209	3.231	3.209	3.084	N/A
Cell survival	2.459	-1.948	-2.637	-1.096	4.505
Vasculogenesis	2.352	-2.498	-1.682	-1.693	4.417
Dysgenesis	-1.593	3.362	1.428	1.895	-3.867
Cell movement	1.246	-1.907	-1.627	-2.482	4.744
Chromosomal congression of chromosomes	2.538	-2.138	-2.538	-2.345	2.138
Cell viability	2.249	-1.795	-2.406	-1.175	3.994

図 20 変動遺伝子データからのパスウェイ解析におけるヒートマップ

IPA プログラムを用いてパスウェイ解析を行い、バイオパスウェイとバイオファンクションのそれぞれトップ 10 データを示す。

## 2020 年度 研究成果の発表(学会発表・論文掲載・著書など)

### ○ 学会発表

1. Akio Nakamura and Ritsuko Kawaharada, Effects of intrauterine exposure of advanced glycation end-products on foetal neuronal cells in a diabetic mother, The 7th International Conference on Nutrition and Growth, 27-29 August 2020 | Virtual Conference.
2. 大上 桜香、野口 礼於奈、清水 愛美、中村 彰男、鳥海 旭世、吉崎 瞳、徳永 弥月、佐々木 洋、石田 千聡、河原田 律子、細胞モデルで考える妊娠中の子宮内高血糖環境が脳神経細胞への与える影響、第 67 回 日本栄養改善学会学術総会、札幌、Web 開催、2020 年 9 月 2-4 日
3. 中村 彰男、大上 桜香、鳥海 旭世、吉崎 瞳、徳永 弥月、野口 礼於奈、石田 千聡、河原田 律子、子宮内高血糖環境におけるラット新生児神経細胞に対する AGEs の影響、第 93 回日本生化学会大会、東京、Web 開催、2020 年 9 月 14-16 日 P-776
4. 岡田-山口 千沙、中村 彰男、荒木 琢磨、佐々木 亜由美、秦野 伸二、竹腰 進、小濱 一弘、金子 堯子、Biochemical analysis for the *Physarum* starvation response 第 93 回日本生化学会大会、東京、Web 開催、2020 年 9 月 14-16 日 P-750
5. 青木 敦子、松島 照彦、山崎 壮、中村 彰男、ジ・トリペプチドが紫外線照射ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン及びエラスチン産生に及ぼす影響の解析、第 42 回日本臨床栄養学会、新潟、Web 開催、2020 年 10 月 10-11 日 O-18
6. 大上 桜香、野口 礼於奈、中村 彰男、河原田 律子、子宮内高血糖環境が次世代に与える影響～新生仔ラットの脳神経細胞への影響～、第 42 回日本臨床栄養学会、新潟、Web 開催、2020 年 10 月 10-11 日 O-45
7. 河原田 律子、小濱 智子、中村 彰男、細胞モデルで考える妊娠中の子宮内高血糖環境が脳神経細胞への与える影響、第 36 回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会・IADPSG2020(同時開催)、Web 開催、2020 年 11 月 13-26 日
8. 徳永 弥月、河原田 律子、石田 千聡、中村 彰男、高血糖環境下における骨格筋芽細胞の分化に与える脂肪酸の影響、第 94 回日本薬理学会、札幌、Web 開催、2021 年 3 月 8-10 日

○ 論文

2. 河原田 律子, 中村 彰男, 妊婦の栄養と免疫, 食と医療, 16, 50-56, 2021

○ 著書

1. 堀内 照夫, 遠藤 忠利, 河原田 律子 中村 彰男, 脂質・脂肪酸関連物質の使いこなし方 – 素材開発・機能創生・応用技術 –, テクノシステム, 2020, 111-116