

非肥満型高血糖発症 非ヒト哺乳動物の作製方法

日本大学 医学部 医学科 小児科学
准教授 長野 伸彦

2021年12月21日

発明の背景と概要

＜発明の概要＞

日本では総出生数は減少しているが低出生体重児は増加しており、その低出生体重児の将来の健康障害を減らすことが医療的・経済的・社会的に求められている。子宮内で低栄養に曝露された胎児は体重が減少するのみならず、その環境に適合するための体質変化が生じる。発達過程（胎児期や生後早期）と出生後の環境との不適合が、成人期のメタボリック症候群や糖尿病の発症に関与するというDOHaDの概念が現在定着している。しかしながら、このDOHaDのメカニズムに関しては未だ十分に解明されていない。我々は、子宮内虚血操作により低出生体重の産仔マウスが出生し、離乳後普通食で、成獣期に低体重にも関わらず高血糖を発症する動物モデルを初めて開発に成功した（特願2020-116354）。DOHaDを証明する適切なモデルマウスは今まで存在せず、我々の子宮内虚血により発症する低出生体重-高血糖発症マウスモデルは、ヒトの実臨床に近い動物モデルと考えている。この低出生体重-高血糖発症モデルマウスを用いて、成獣期までの体重の変化や成獣期の体組成や血糖の解析を行うことで、子宮内で低栄養に曝露されその環境に適合するための体質変化とその後の糖尿病の発症を基礎実験で解析することが可能となる。

＜発明の特徴＞

- ・本発明の低出生体重-高血糖発症モデルマウスは、ヒトの実臨床に近い動物モデルである。
- ・子宮内で低栄養に曝露されその環境に適合するための体質変化とその後の糖尿病の発症（DOHaD仮説）を基礎実験で解析することを可能にした。
- ・本発明の動物モデルを用いれば、低出生体重児-やせ型糖尿病の病態メカニズムを明らかにできる可能性がある。

DOHaD仮説(儉約表現型の胎児プログラミング)

女性のやせ志向

妊娠末期の母体の低栄養

生存のための胎児の適応・プログラミング

乳幼児期における
蛋白質の過剰摂取が
早期の体重のcatch-up
(adiposity rebound)
を引き起こす。

インスリン抵抗性の獲得・脂質異常
+

胎児発育不全・**低出生体重児**

富栄養環境

インスリン抵抗性・脂質
異常の持続

メタボリック症候群：
2型糖尿病・肥満・高血圧・高脂血症

出生後の環境との
ミスマッチ(DOHaD)

本アニマルモデルと既報の比較

	本モデル	既報①	既報②	既報③
構成	マウス妊娠後期 子宮動脈結紮	ラット妊娠後期 子宮動脈結紮	栄養制限型	遺伝子組み換え型
優位点	DOHaDの概念に近い。また実臨床に近く、更に成獣期まで観察を行い、成獣期に高血糖を呈することを証明している。	成獣期での高血糖は確認されていない。インスリン抵抗性、β細胞機能の評価を行っているのみであり、高血糖モデルではない。	母体低栄養のモデルである。実臨床とはかけ離れている。	遺伝子の機能解析が可能であるが、実臨床とはかけ離れている。
適用分野	DOHaD研究 糖尿病研究	DOHaD研究 糖尿病研究	DOHaD研究 糖尿病研究	糖尿病研究

想定される用途

- 低出生体重-糖尿病発症メカニズムの解明
- 低出生体重-糖尿病発症の予防・治療研究
(例: 栄養学的介入研究、投薬介入研究)

実用化に向けた技術的課題と今後の対応計画

実用化に向けた技術的課題

日本特許出願時点での実験数が少なかったため、さらに実験のn数を増やすべく実験を継続中。

今後の対応計画

栄養学的な介入や成長ホルモンの早期投与を行うことで高血糖や体組成に改善効果があるかを調べている。

さらに肝臓や脂肪の高血糖に関連する遺伝子の発現量解析やメタボローム解析を実施し、高血糖の発症機序の解明を行っている。

これら実用化のための研究を推進し、原出願から進歩性が出た場合には別特許として出願する計画である。

糖尿病は日本のみならずアジア(中国)および欧米においても患者数は多い。

人口及び患者数のいずれも多いアメリカおよび中国への海外特許出願を希望している。

今後アメリカおよび中国においては、アメリカ小児科学会等の国際シンポジウムなどの機会を利用し実施許諾先となる企業の開拓を進める。

2024年頃までに現地国におけるライセンシー開拓を進め、当該ライセンス先企業において実用化を目指す。

企業への期待

- 栄養補助食品作成技術を持つ、企業との共同研究を希望する。
- また、糖尿病発症予防食品や医薬品を開発中の企業、DOHaD分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

低出生体重児に伴う合併症

長期的な問題

成長

- 低身長、肥満
- メタボリックシンドロームの発症
 - 成人期の高血圧や糖尿病

発達

- 精神運動発達遅延
- 神経発達症群
 - 自閉スペクトラム症
 - 注意欠如/多動症
 - 限局性学習症

Case of type 2 diabetes possibly caused by excessive accumulation of visceral fat in a child born small-for-gestational age

Remi Kuwabara , Tatsuhiko Urakami* , Kei Yoshida , Ichiro Morioka

Department of Pediatrics, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

低出生体重で出生し、 小児期に2型糖尿病を発症した1例

Kuwabara et al. J Diabetes Investig. 2020, doi: 10.1111/jdi.13246.

【症例】 17歳男児

12歳4か月時(中学1年時)の学校検尿で初めて尿糖陽性を指摘され、他院で随時血糖126 mg/dL、HbA1c (NGSP) 6.9%であったため、当院を紹介受診した。

＜出生歴＞

在胎38週1日、体重2,226g(-1.81SD)、身長46.5cm(-0.83SD) SGA

＜家族歴＞

母方の祖母と曾祖母に2型糖尿病

＜栄養と発育＞

乳幼児期 母乳主体の混合栄養→偏食なし、食事量中等量

3歳時のKaup指数 15.0

学童期 6歳から肥満傾向

小学校高学年～通塾のため夕方に軽食を摂り、さらに21時以降に高脂質の食事を摂るなど食習慣が乱れがちになった

【初診時身体所見】

身長 141.5cm (-1.4SD)、体重 46.1kg、BMI 23.0

腹囲 81.6cm、腹囲身長比 0.58、肥満度 4.5%

血圧 86/42mmHg

高度な肥満ではない

項部に軽度の黒色表皮腫あり

外表奇形なし

Tanner 3期、精巣容積 8mL

【初診時血液検査所見】

＜空腹時血液検査＞

HbA1c (%)	6.7
グリコアルブミン (%)	15.7
T-cho (mg/dL)	154
HDL-cho (mg/dL)	42
LDL-cho (mg/dL)	102
TG (mg/dL)	35

AST (IU/L)	30
ALT (IU/L)	44
BUN (mg/dL)	21.4
Cr (mg/dL)	0.48
UA (mg/dL)	5.2

＜75gOGTT＞

	前	30分	60分	90分	120分
血糖 (mg/dL)	92	117	173	189	204
IRI (μ U/mL)	4.5	10.9	18.9	21.0	17.2

HOMA-IR 1.0、HOMA- β 55.9、 Δ IRI/ Δ PG 0.3

【初診時画像検査所見】

＜臍レベルの腹部単純CT＞

内臓脂肪面積(VAT) **103.0**cm² $\geq$ 60cm²

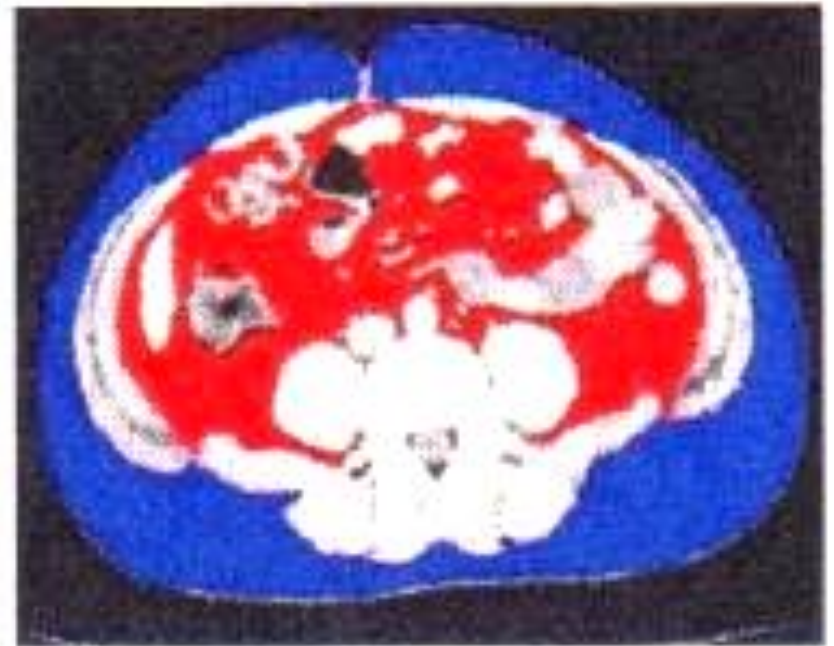
皮下脂肪面積(SAT) **135.6**cm²

VAT/SAT比 **0.76** $\geq$ 0.3

⇒ **内臓脂肪蓄積あり**

＜腹部超音波検査＞

脂肪肝あり



【経過】

ダバグリフロジンは、小児等を対象とした有効性及び安全性を指標とした臨床試験は実施されていない。

2型糖尿病と診断
食事療法(2000kcal/日)・運動療法

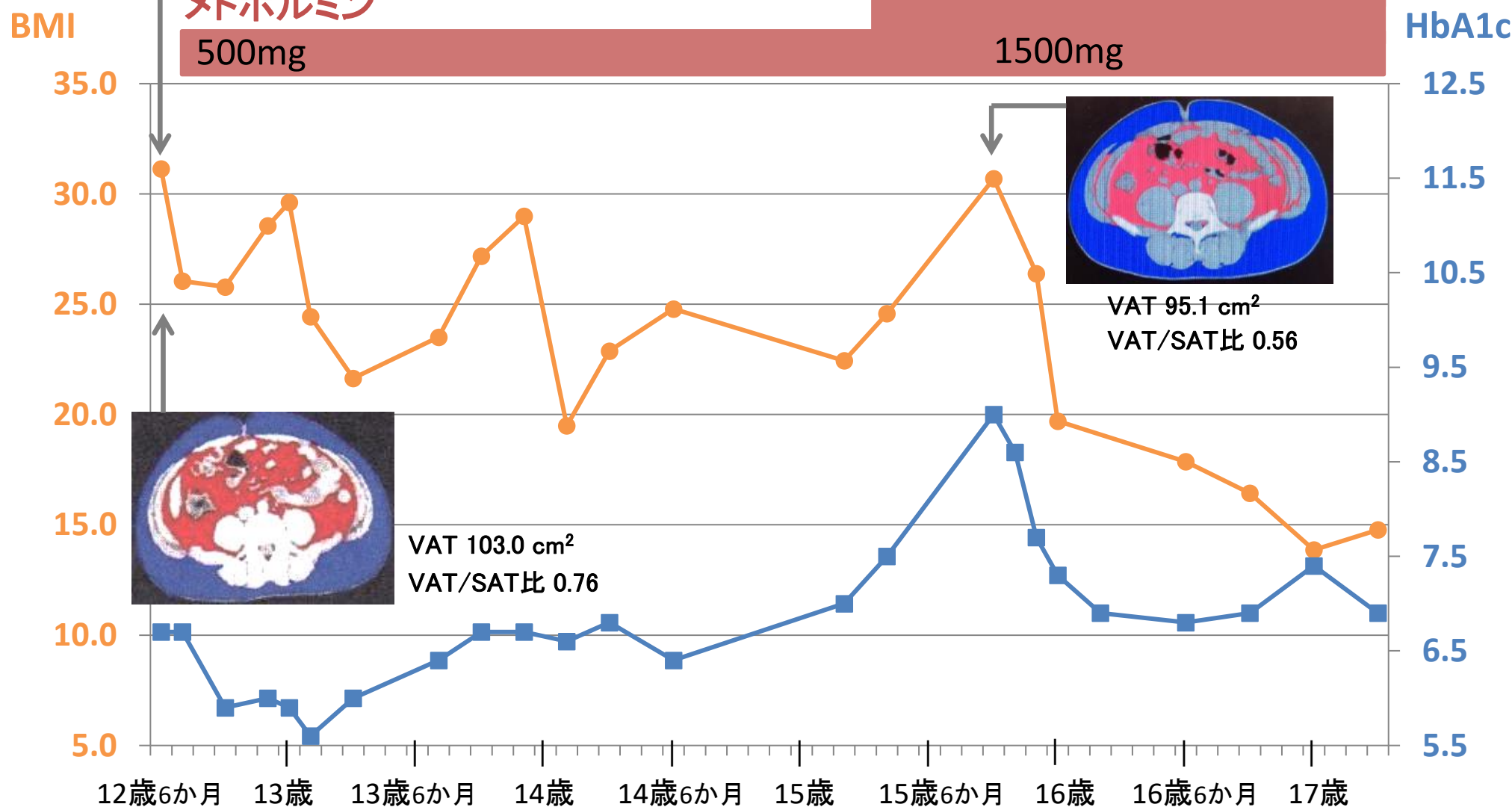
ダバグリフロジン

5mg

メトホルミン

500mg

1500mg

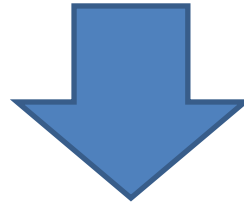


課題

低出生体重で出生後、富栄養の食環境で、肥満を伴って糖尿病を発症するアニマルモデルは存在している。

しかし、低出生体重児は、通常の食環境で、肥満を伴わずに、糖尿病を発症するリスクが高い。低出生体重児の糖尿病リスクの研究には、低出生体重で出生後、通常の食環境で、肥満を伴わずに糖尿病を発症するアニマルモデルが有用と考えられるが、そのようなアニマルモデルは存在していない。

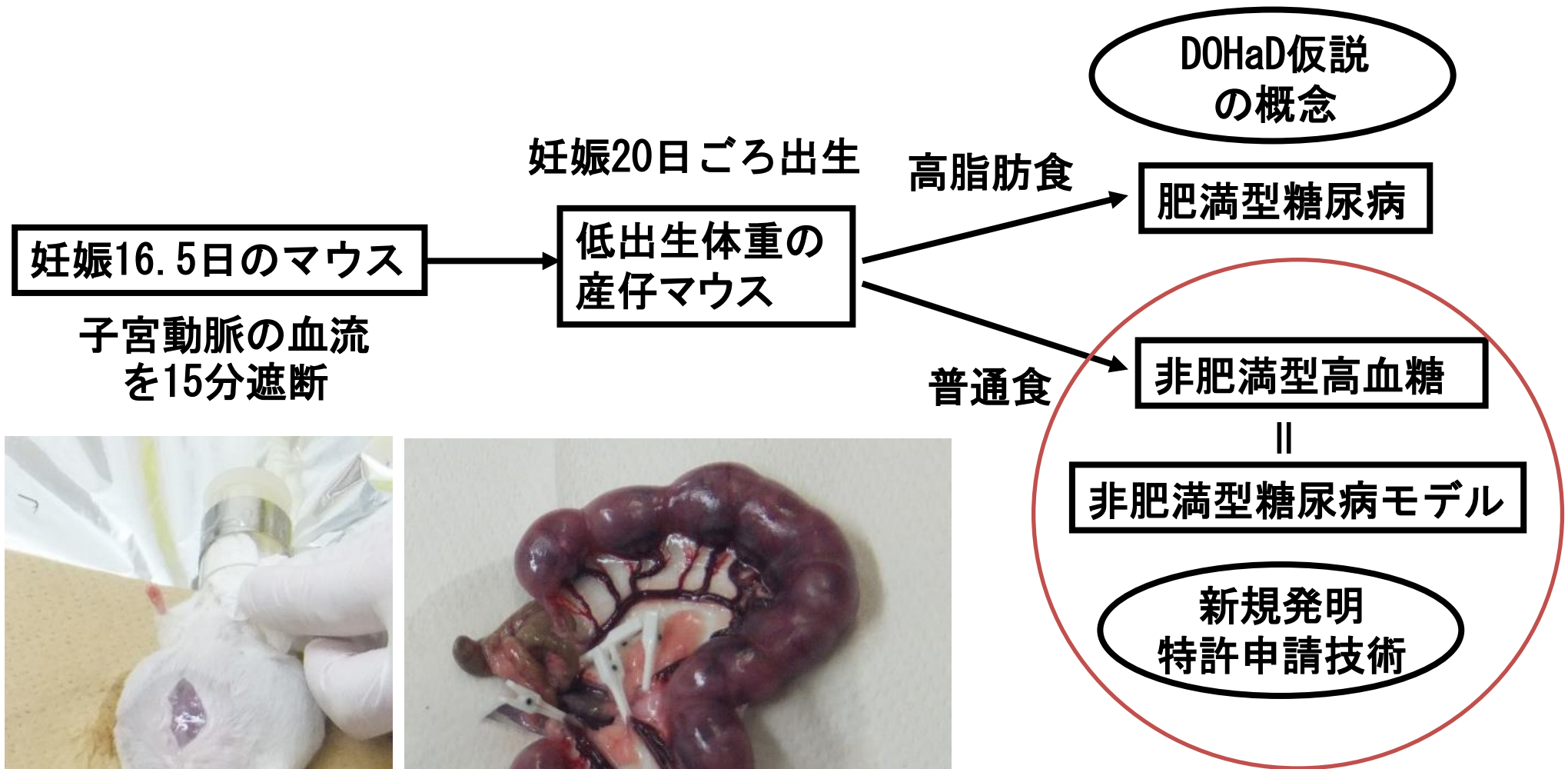
このような低出生体重で出生し、非肥満で生活習慣病を発症する病態を解明したい！



動物モデルの開発に成功！

名称	:	非肥満型高血糖発症非ヒト哺乳動物の作製方法
出願人	:	学校法人日本大学
発明者	:	長野伸彦、森岡一郎、清水翔一、片山大地
出願番号	:	特願2020-116354
出願日	:	2020年7月6日

低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデル



方法



虚血群と
コントロール群

0週齢



離乳
母マウス分析

4週齢

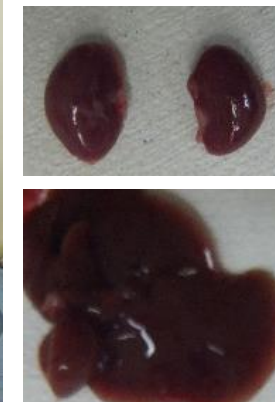
普通食・
高脂肪食
に分類

5週齢



尿検査

7週齢



仔マウスの解析

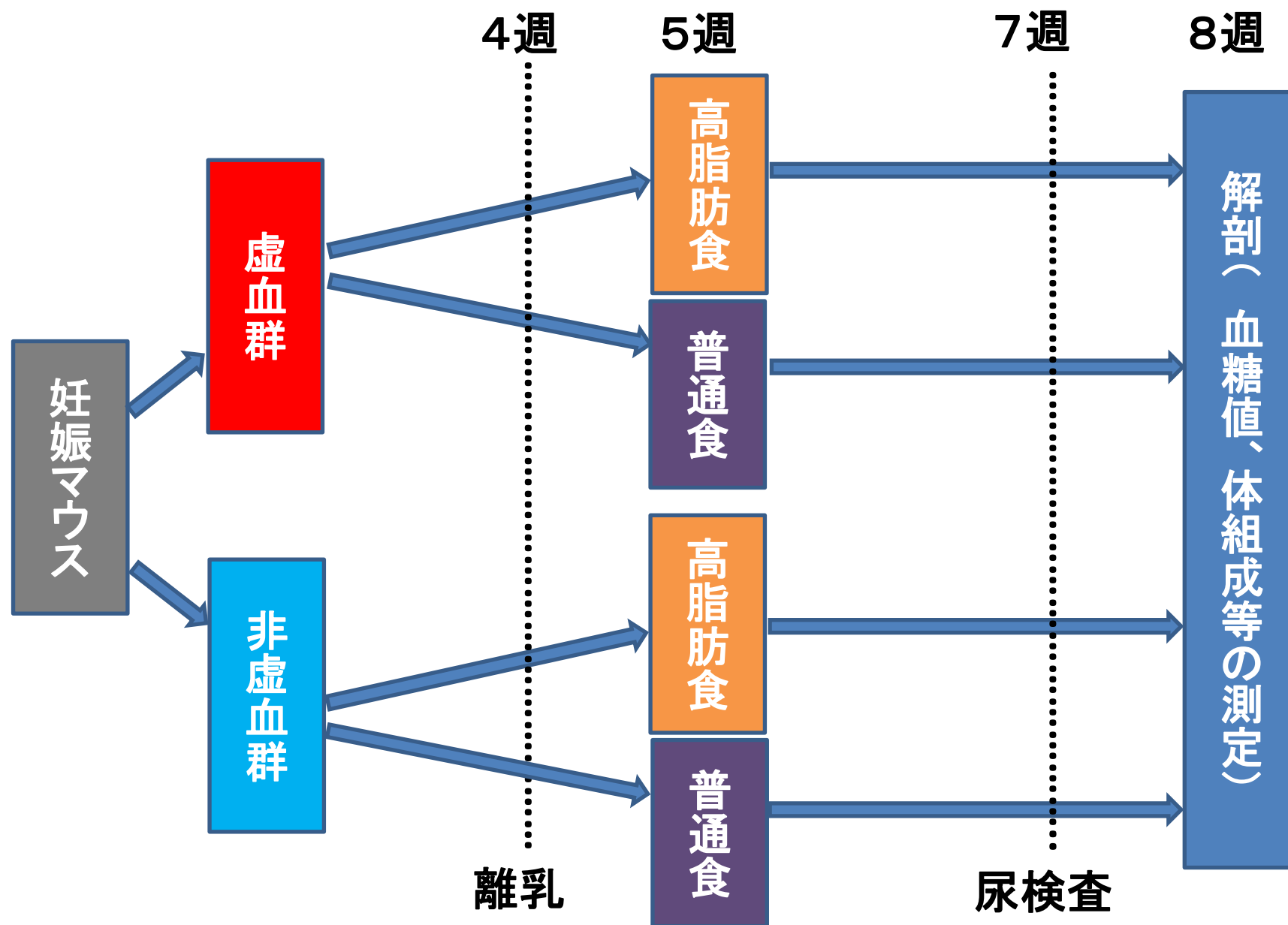
8週齢



子宮動脈の血流を15分遮断

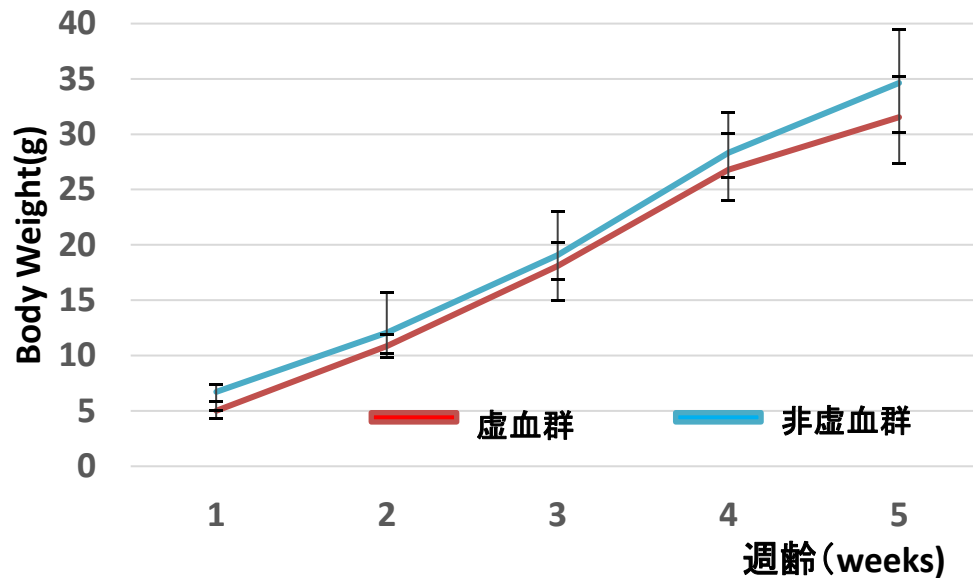


仔マウスの飼育



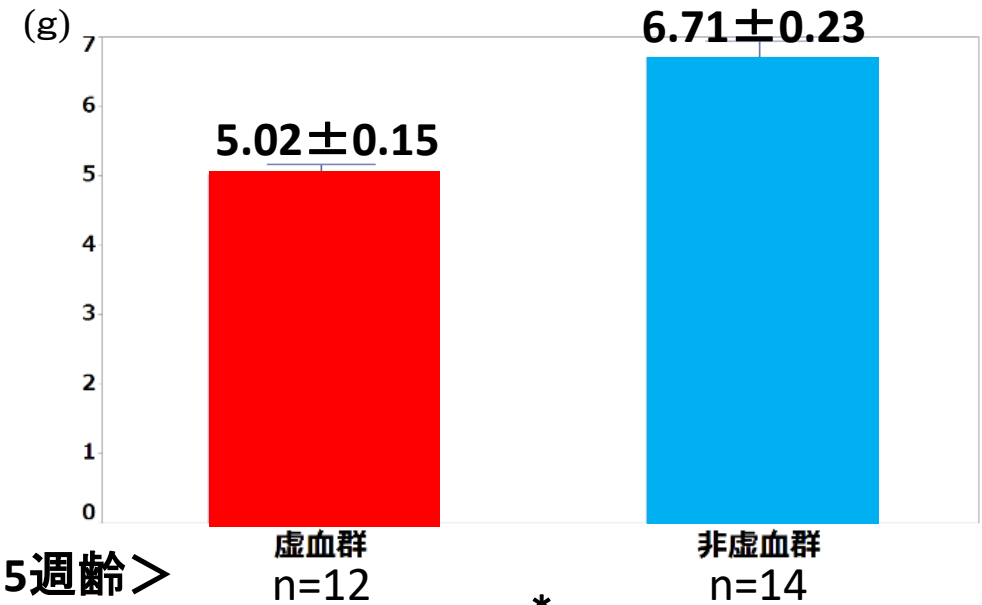
雌-体重推移(食事変更前)

雌-体重推移(食事変更前)

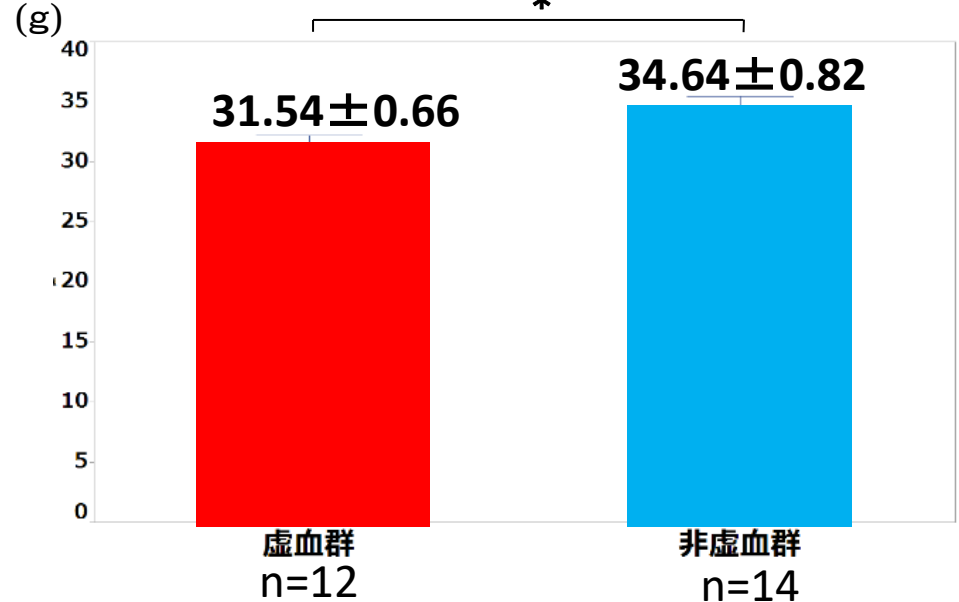


虚血群では低出生体重で出生し、
5週齢でも低体重であった。

<1週齢>

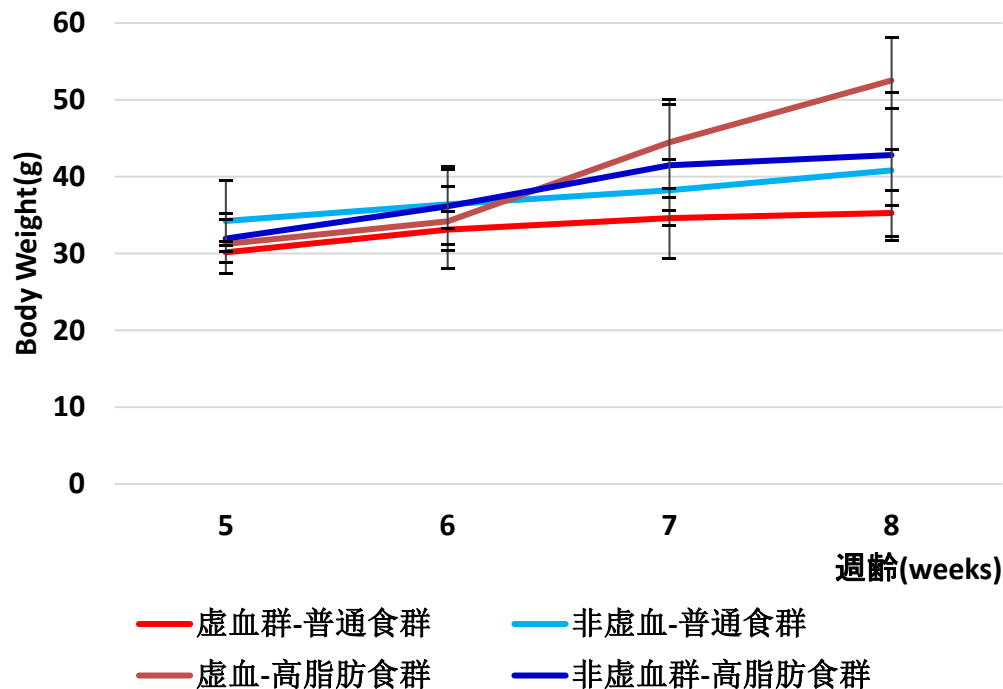


<5週齢>

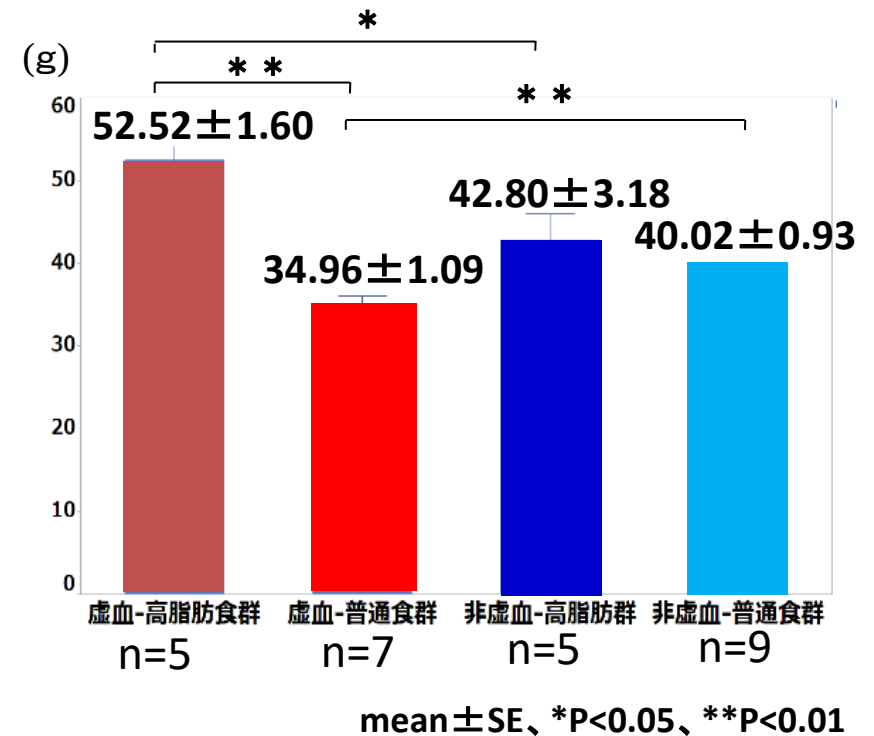


雌-体重推移(食事変更後)

雌-体重推移(食事変更後)

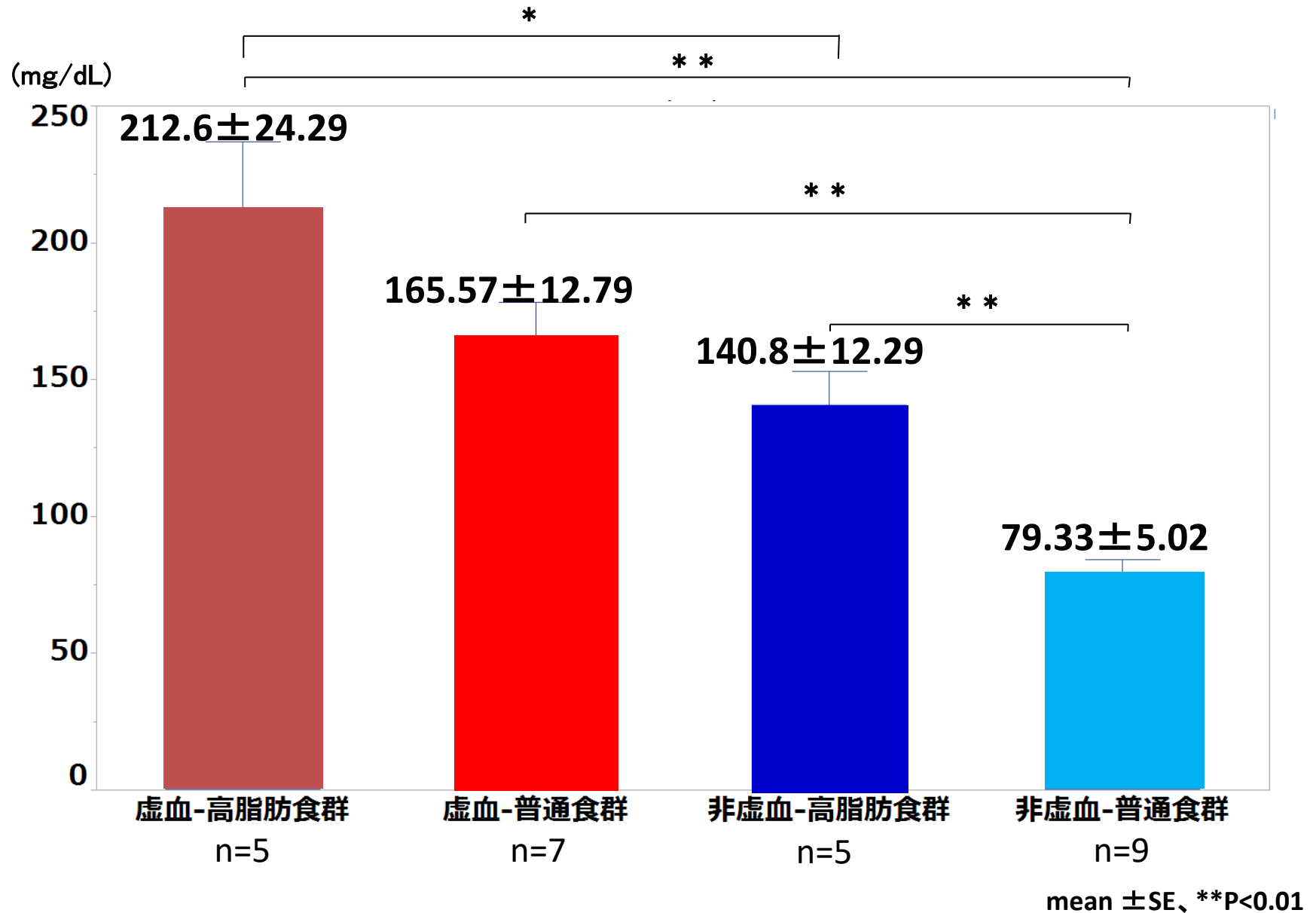


<8週齢>



成獣期に普通食で痩せ型を、高脂肪食では肥満を呈した。

血糖値



- ・虚血-普通食群は低出生体重で出生後、成獣期に痩せ型で高血糖を呈する。
- ・虚血-高脂肪食群は低出生体重で出生後、成獣期に肥満を伴う高血糖を呈する。

体組成計 (Impedi VET)

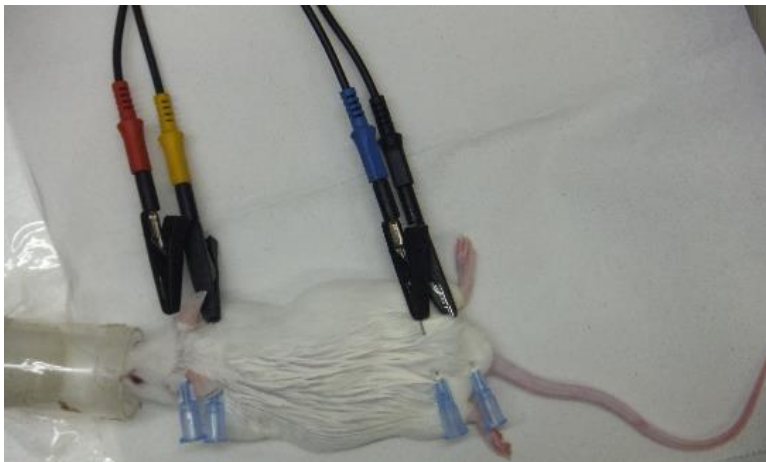


体組成計の原理

- BIA法は生体組織の電気抵抗値（生体インピーダンス）を測定することで、体脂肪率などの体組成を推定する方法です。
- 生体組織において、脂肪組織はほとんど電気を通しません。筋肉などの電解質を多く含む組織は電気を通しやすい性質があります。電気抵抗をはかることで脂肪とそれ以外の組織の割合を推測しています。

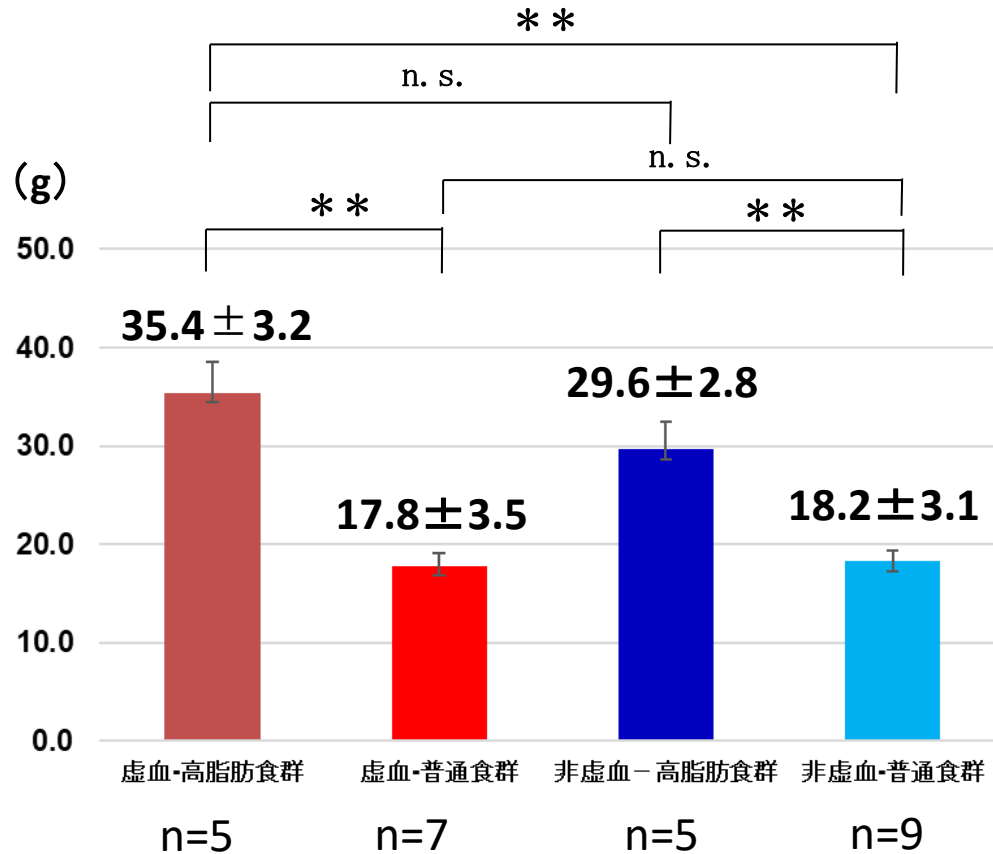
ImpediVET測定項目

- Body Mass Index (BMI) BMI指数、
体重(kg) ÷ (身長(m)の2乗)
- Total Body Water (TBW) 体内総水分量
- Intra-Cellular Fluid (ICF) 細胞内液量
- Extra-Cellular Fluid (ECF) 細胞外液量
- Fat Free Mass 除脂肪量
- Fat Mass 脂肪量

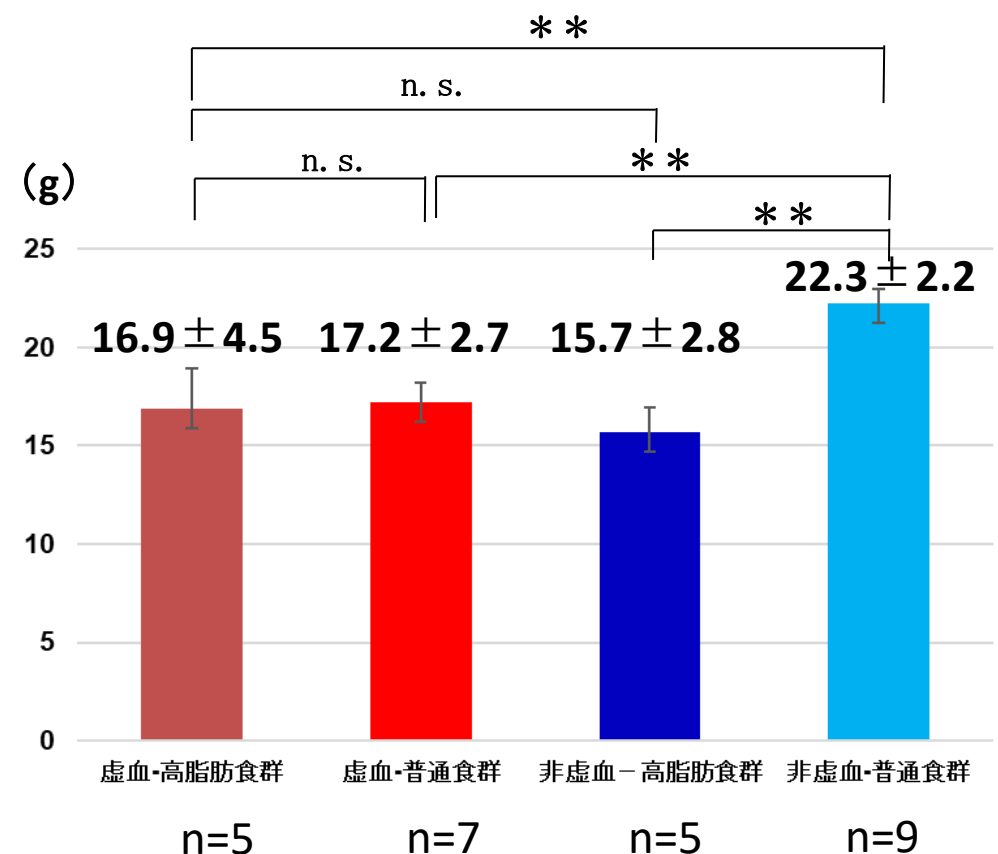


脂肪重量、除脂肪重量

〈脂肪重量〉



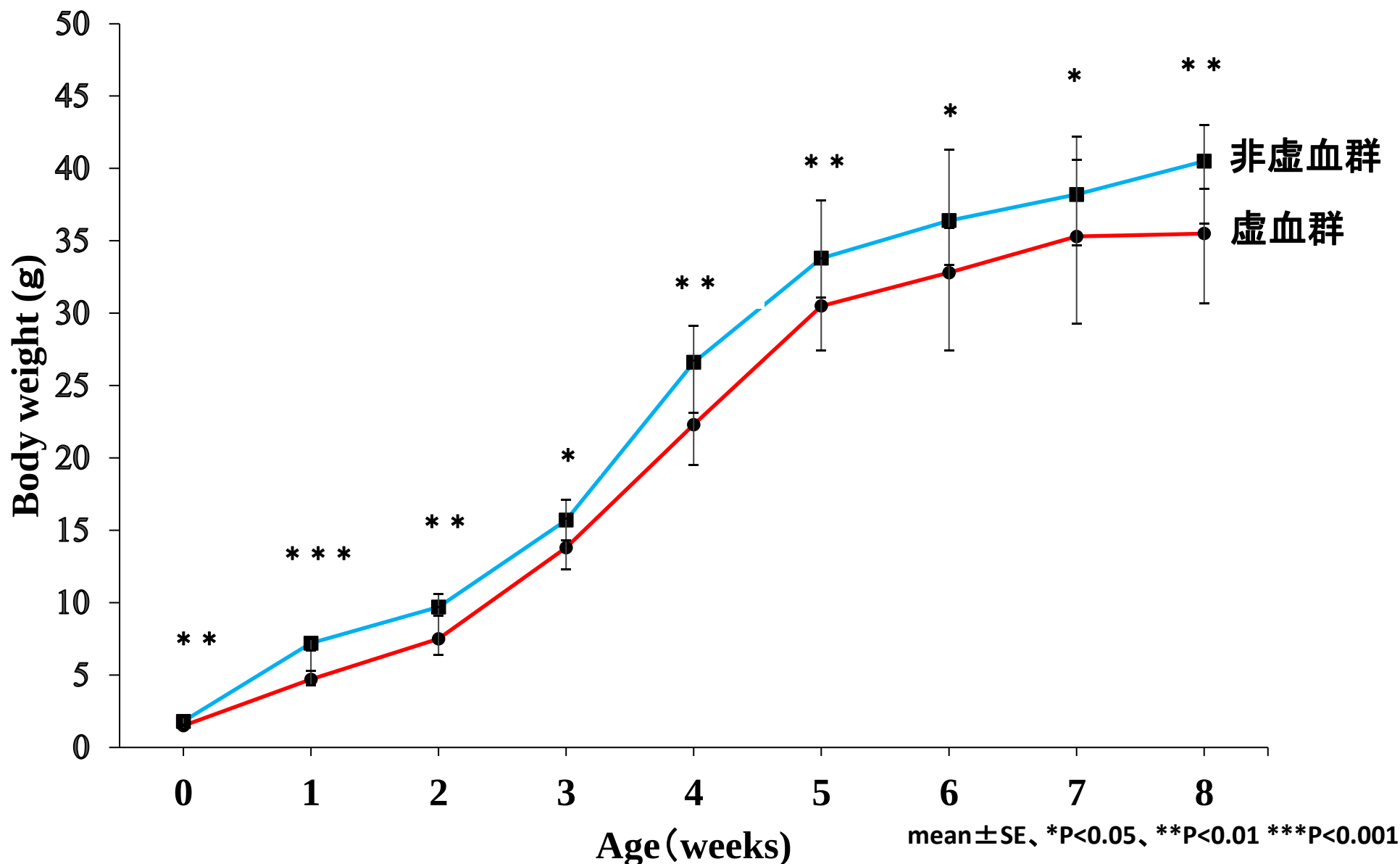
〈除脂肪重量〉



mean ± SE、*P<0.05、**P<0.01

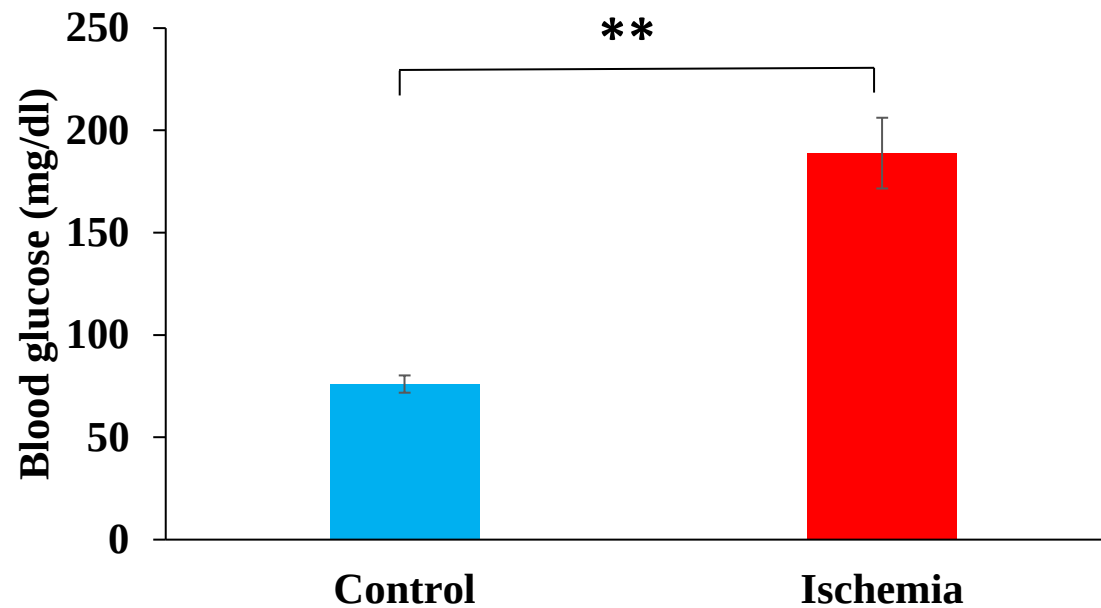
高脂肪食群は普通食群と比較して、脂肪重量が多かった。
8週齢でコントロール群が有意に除脂肪重量が多かった。

普通食群のみでの解析(体重推移)

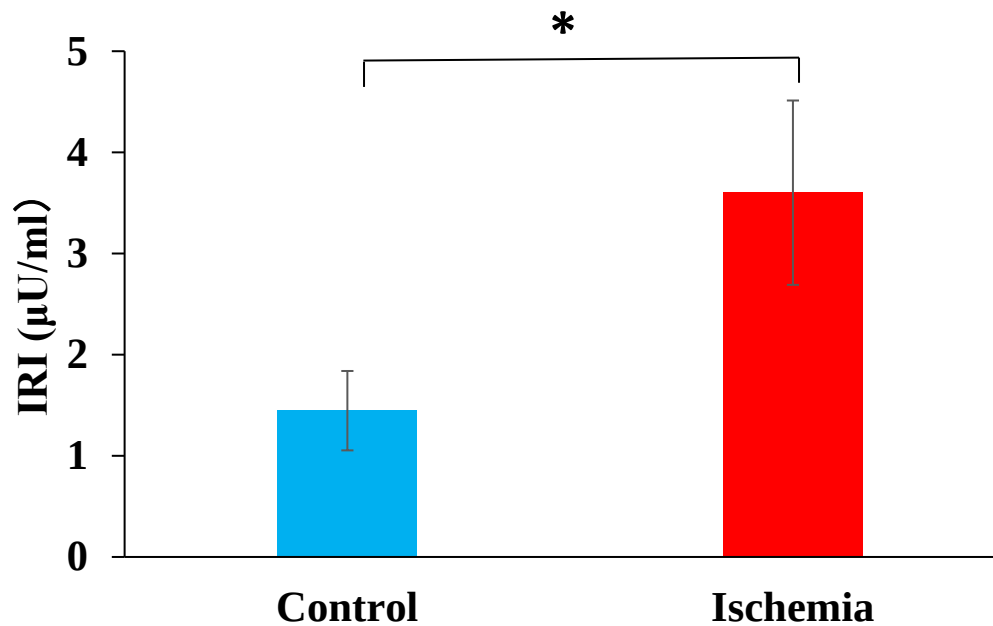


血糖、IRI、HOMA-R

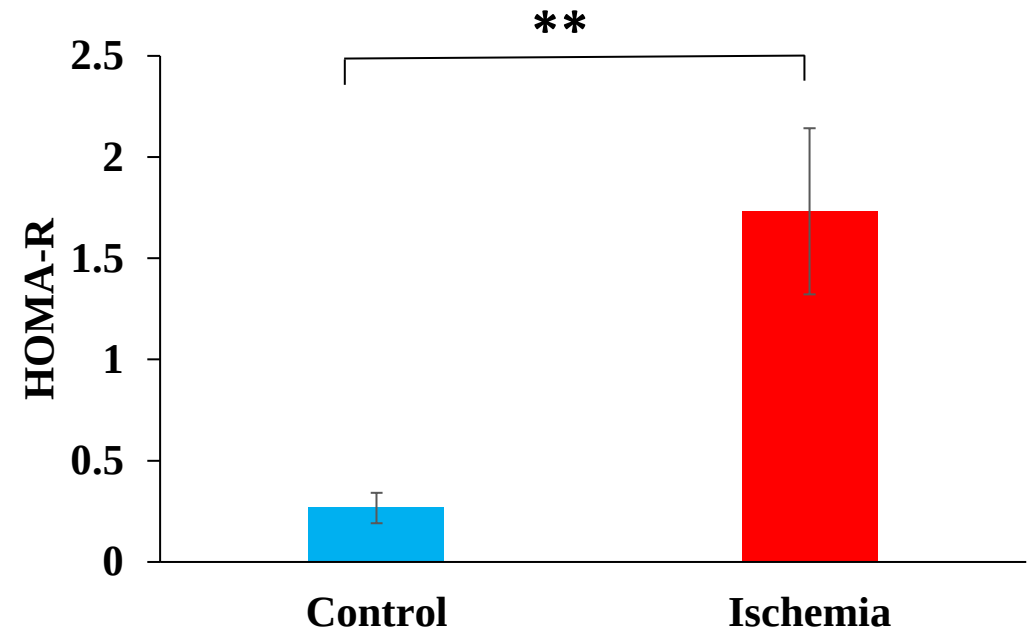
<血糖>



<IRI>



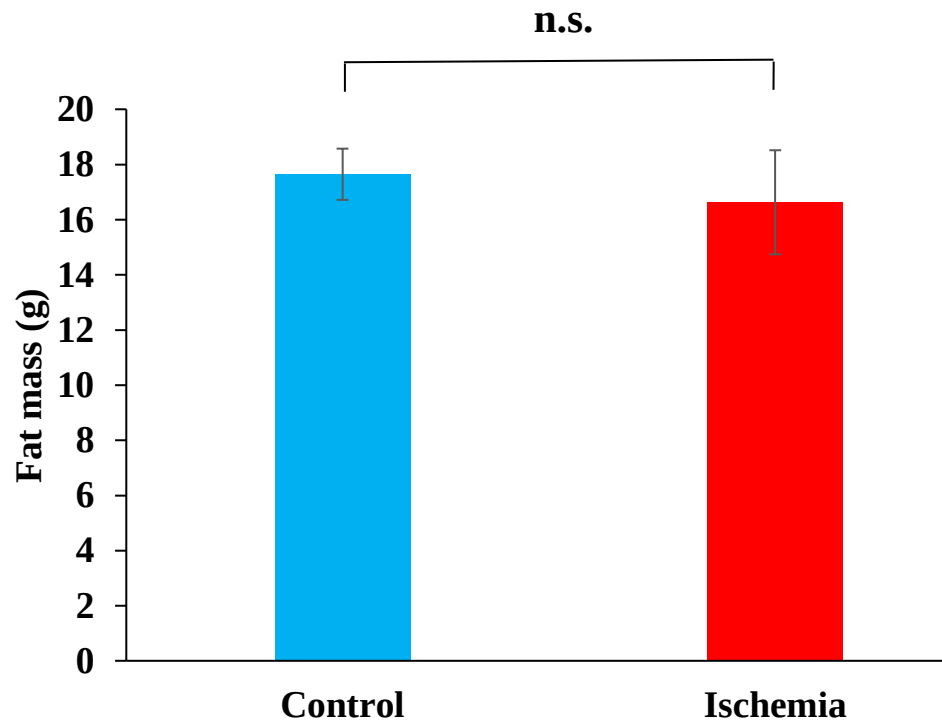
<HOMA-R>



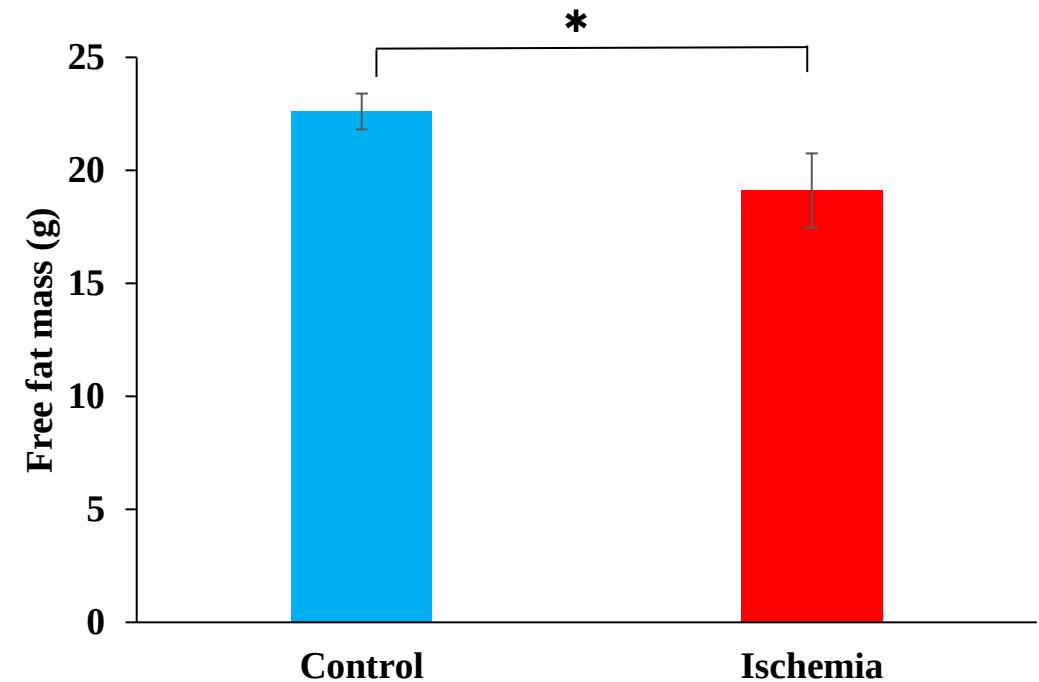
mean $\pm$ SE、*P<0.05、**P<0.01

脂肪重量、除脂肪重量

＜脂肪重量＞



＜除脂肪重量＞



mean $\pm$ SE、*P<0.05

8週齡でコントロール群が虚血群と比較し、有意に除脂肪重量が多かった。

低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルの開発

	出生体重 (g)	栄養	成獣期体重 (g)	血糖値 (mg/dl)
虚血 n=12	1.5	普通食 n=7	35.0	189
		高脂肪食 n=5	52.5	213
コントロール n=14	1.8	普通食 n=9	40.0	76
		高脂肪食 n=5	42.8	141

子宮内虚血操作を行うと出生体重は小さく出生する。その後、普通食で飼育すると成獣期の体重は小さいが、高血糖を呈する。

まとめ

- 子宮内虚血による低出生体重-高血糖発症モデルマウスは、ヒトの実臨床に近い動物モデルである。
- 子宮内で低栄養に曝露されその環境に適合するための体質変化とその後の糖尿病の発症(DOHaD仮説)を基礎実験で解析することを可能にした。
- 本発明の動物モデルを用いれば、低出生体重児-非肥満型糖尿病の病態メカニズムを明らかにできる可能性がある。

お問い合わせ先

日本大学産官学連携知財センター

TEL 03-5275-8139

FAX 03-5275-8328

e-mail nubic@nihon-u.ac.jp