

影響

受精率は調べた用量全てで Placebo 群に比べ有意差はなかった (図 3A)。体外発生率は 1.5 mg 群で有意に低下したが、0.25 mg 群では DHEA による発生率向上傾向が見られた (図 3B)。卵巣重量、体重、卵巣体重比には差異がなかったが、1 匹当たりの平均排卵数は用量が増加すると有意に低下した (図 4)。

4) 雌の血中ステロイド濃度への影響

Placebo 群に比べ DHEA 群は用量の上昇に伴い血中 DHEA 濃度が上昇する傾向があり (有意差なし)、血中 testosterone 濃度は 1.5 mg 群と 5 mg 群で DHEA 群が有意に高かった。一方、血中 progesterone 濃度と血中 estradiol 濃度は DHEA 群と Placebo 群の間でどの用量でも有意差はなかった (図 5)。

5) Resveratrol の精巣上体精子への影響

受精率 (図 6A) および体外発生率 (図 6B) は調べた用量全てで有意差はなかったが、Placebo 群に比べ Resveratrol 群において 0.1 mg で上昇傾向、1.0 mg で下降傾向が見られた。

6) Sirt1 および AR 受容体蛋白質発現への影響

精巣 Sirt1 蛋白質発現量に有意差はなかったものの、どの用量でも Resveratrol 投与群の方が高い傾向が見られた (図 7A)。増加率は 1.0 mg 群で若干低い傾向が見られた。

一方、精巣 AR 蛋白質発現量は Placebo 群に比べ Resveratrol 群において 0.1 mg で上昇傾向、0.5 mg で有意に下降 ($p=0.004$)、1.0 mg で下降傾向が見られた (図 7B)。

総合すると両蛋白質発現量は Resveratrol 低用量で上昇傾向、高用量で抑制傾向があった。

7) bpV(pic)と性腺刺激ホルモンを併用した過排卵誘起と受精率、発生率

予備実験から bpV(pic)の 300 $\mu\text{g}/\text{head}$ 投与は多すぎることで、3 $\mu\text{g}/\text{head}$ 投与群では 3 日目以降に 30 $\mu\text{g}/\text{head}$ 投与群では 2 日目以降に卵巣 MIS 含量が上昇する (すなわち卵胞発育が盛ん

になる;データは省略) ことなどから、bpV(pic)の投与量を 30 ないし 3 $\mu\text{g}/\text{head}$ とし、30 $\mu\text{g}/\text{head}$ 投与の後の Day 1 と Day 2、3 $\mu\text{g}/\text{head}$ 投与の後の Day 3 と Day 4 に PMSG を打ち始め排卵誘起するという 4 つの実験群を設定した。

排卵誘起の結果は、30 μg の Day 1 および 3 μg の Day 3、Day 4 で排卵数の分布が対照群に比べ bpV(pic)投与群の方が上にシフトする傾向、すなわち、排卵数の増加傾向が見られた。30 μg の Day 2 ではむしろ排卵数が減少傾向を示した (図 8)。

30 μg の Day 1 および 3 μg の Day 3 では受精率 (2-cell への発生率、図 9A) および発生率 (胚盤胞への発生率、図 9B) に bpV(pic)投与群と対照群の間に有意差は無かったが、30 μg の Day 2 および 3 μg の Day 4 では有意に bpV(pic)投与群が低かった。

D. 考察

DHEA は低用量では体外受精効率を上げるようだが、高用量では抑制的である。雌・雄双方にそれぞれ投与した結果は、劇的な効果が見られたわけではないが、繁殖効率を向上させる可能性を示唆した。ただし、雄では通常状態で AR に結合すべき testosterone が十分量あって (AR がすでに飽和している)、testosterone を増やしても AR への結合量が、すなわち男性ホルモンの効果が増えるわけではない、と考えられた。一方で、AR の量は受精能と関連しており (学会発表 25)、AR 量の調節こそが重要であろうと思われる。雌においては高用量では排卵数の低下が見られることから、用量の見極めが非常に重要である。DHEA は testosterone へ変換され、雌ではさらに Estrogen (マウスの場合 Estradiol) に変換されると考えたが、Estradiol の増加は見られなかった。よって、DHEA の効果は雄雌共に testosterone の効果であろう。雌での排卵数は testosterone が高値だと減少するが、受精率は若干向上することから、高濃度の testosterone はおそらく卵胞の選抜に効いて「質の悪い卵胞が閉鎖される」と考えられた。

Resveratrol の精巣上体精子の体外受精能への影響は軽微であった (図 6)。低用量で若干の向上傾向は見られるが、高用量では抑制的であった。精巣内サーチュイン (Sirt1) の増加は 1.3 倍程度で (図 7A)、確かにサーチュインの増加が誘導されたが、AR 量の増加は軽微で (図 7B)、受精能との関連は弱いと考えられる。サーチュインが存在しないと重篤な精子形成異常を来すが、サーチュインが既に相当量存在する場合は、増加させても効果は変わらないということであろう。これらのことから Resveratrol 投与による繁殖性の向上効果は有望であるものの用量 (特に低用量での効果) を検討する必要があると考えられる。

雌個体への PTEN 阻害剤投与は、排卵数の上昇を来す有望な方法だと考えられた。PTEN 阻害剤の投与の後、PMSG と hCG による過排卵誘起により、対照群に比べ排卵数が多い傾向を見ることが出来た。bpV(pic)と PMSG の投与間隔と誘起排卵数の関係を見てみると、タイミングが重要で、特に遅れると排卵数増加効果は薄くなると思われた。

本研究では PTEN 阻害剤を 1 種類しか使っていない。いろいろな阻害剤が入手可能であるので、さらなる検討を行い、より効率の良い誘起排卵増加法を調べるべきであろう。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 結論

本研究の結果から「採卵・採精前にいわゆる不妊治療をマウスに施す」方法は有効な手段たり得ることが分かった。ただし、用量の検討が必須であり、ホルモン動態等を基に慎重に見極める必要がある。

本研究での最大の成果は、雌個体への PTEN 阻害剤と性腺刺激ホルモンを併用した誘起排卵数増加法が有望であることを見いだした点である。今後、さらに諸条件を検討したいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwata Y, Suzuki O, and Watanabe S. Decreased surface sialic acid content is a sensitive indicator of muscle damage. *Muscle and Nerve* 47(3):372-378, 2013.
2. Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 87(8):550-562, 2011.
3. Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J, Aoki F. Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet* 7(10):e1002279, 2011.
4. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative Western blots. *Exp. Anim.* 60(2):193-196, 2011.

2. 学会発表

1. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Sequence analysis of type VI collagen subunits in cardiomyopathic hamster hearts. *Experimental Biology 2010, Anaheim, CA, USA* (実験生物学 2010、2010 年 4 月 24 日～28 日)
2. 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎「マウス排卵誘起における hCG の血中動態」第 57 回日本実験動物学会総会、京都市、2010 年 5 月 12 日～14 日
3. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Heart miRNA cloning in cardiomyopathic (J2N-k) and normal (J2N-n) Syrian hamsters.

- GENETICS 2010: Model Organisms to Human Biology meeting, Boston, MA, USA (遺伝学 2010 ミーティング: モデル生物からヒト生物学へ, 2010 年 6 月 12 日~15 日)
4. 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田・内尾こずえ, 松田潤一郎「シリアンハムスター卵巣凍結保存における卵巣サイズの影響」 第 103 回日本繁殖生物学会総会、十和田市、2010 年 9 月 2 日~4 日
 5. 小浦美奈子, 島かおる, 中村和臣, 野口洋子, 鈴木 治, 鈴木和男, 亀岡洋祐, 松田潤一郎. 急速進行性糸球体腎炎モデル SCG/ThpNkc マウスの繁殖及び腎炎の発症状況について. 第 44 回日本実験動物技術者協会総会 旭川 2010 年 9 月 3,4 日.
 6. 中村和臣, 小浦美奈子, 野口洋子, 鈴木 治, 松田潤一郎. BALB/c 凍結胚における個体復元率の改善. 第 44 回日本実験動物技術者協会総会, 旭川, 2010 年 9 月 3,4 日
 7. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. O-GlcNAcylation of heart proteins in cardiomyopathic (J2N-k) and normal (J2N-n) Syrian hamsters. 60th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Atlanta, GA, USA (第 61 回アメリカ実験動物学会年次総会, 2010 年 10 月 10 日~14 日)
 8. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Elevated O-GlcNAcylation of heart proteins in cardiomyopathic transgenic mice with St3gal2 transgene. 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Philadelphia, PA, USA (第 50 回アメリカ細胞生物学会年次総会、2010 年 12 月 11 日~15 日)
 9. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Effect of ovarian size on the viability of cryopreserved Syrian hamster ovaries. 37th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Orland, FL, USA. (第 37 回国際胚移植学会年次総会, オーランド, 2011 年 1 月 8 日~12 日)
 10. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Elevated O-GlcNAcylation of ATP synthase β subunits in cardiomyopathic hearts in Syrian hamsters, Experimental Biology 2011, Washington, DC, USA, 2011 年 04 月 9 日~13 日
 11. 鈴木 治, 小浦 美奈子, 野口 洋子, 山田・内尾 こずえ, 松田 潤一郎, シアル酸転移酵素過剰発現マウスの心筋症様心臓における Calreticulin の増加, 第 58 回日本実験動物学会総会, 東京, 2011 年 5 月 25 日~27 日
 12. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Sequence analysis of the ovarian Kiss1 cDNA in the Mongolian gerbil and Syrian hamster, ENDO 2011: The 93rd Annual Meeting & Expo, Boston, Massachusetts, USA, 2011 年 6 月 4 日~7 日
 13. 鈴木 治, 小浦 美奈子, 野口 洋子, 山田・内尾 こずえ, 松田 潤一郎, 雄への dehydroepiandrosterone 徐放剤投与がマウス体外受精へ及ぼす影響, 第 104 回日本繁殖生物学会大会, 盛岡, 2011 年 9 月 15 日~17 日
 14. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Increase of calreticulin in hearts of cardiomyopathic mice with sialyltransferase transgenes, 2011 AALAS National Meeting, San Diego, California, USA, 2011 年 10 月 2 日~6 日
 15. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Effects of dehydroepiandrosterone on androgen receptor protein expression in testes and epididymides in two strains of mice, 2011 annual meeting of the American Society for Cell Biology,

- Denver, Colorado, USA, 2011年12月3日～7日
16. 鈴木 治, 小浦 美奈子, 野口 洋子, 山田-内尾 こずえ, 松田 潤一郎, 拡張型心筋症の動物モデル2種 (マウスとハムスター)における心臓カルシニューリンの発現比較, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月13日～16日
 17. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Effects of dehydroepiandrosterone on sperm fertilizability in vitro and testicular gene expression, 38th Annual Conference of the IETS, Phoenix, Arizona, US, 2012年1月7日～10日
 18. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Altered neddylation in the heart of a mouse model for cardiomyopathy. Experimental Biology 2012. 平成24年4月21日～25日. San Diego, CA, USA
 19. 鈴木治, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎. PCRによるヘアレスマウスの遺伝子型判定法. 第59回日本実験動物学会総会. 平成24年5月24日～26日. 別府
 20. 小浦美奈子, 斉藤健一, 河相晶子, 中野正文, 野口洋子, 鈴木治, 松田潤一郎. クローズドコロニーddYマウスの中から発見されたてんかん様の症状を現すマウスについて. 第59回日本実験動物学会総会. 平成24年5月24日～26日. 別府
 21. 小浦美奈子, 河相晶子, 中野正文, 野口洋子, 鈴木治, 松田潤一郎. 創薬・難病研究を支える医薬基盤研究所「実験動物研究資源バンク」. 第59回日本実験動物学会総会. 平成24年5月24日～26日. 別府
 22. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Effects of dehydroepiandrosterone on female reproduction in mice. ENDO 2012. 平成24年6月23日～26日. Houston, TX, USA
 23. 鈴木治, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎. 卵巣内 PTEN 関連蛋白質量のマウス系統間比較. 第105回日本繁殖生物学会大会. 平成24年9月5日～8日. つくば
 24. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Analysis of the *Hr* gene in a hairless mouse strain (HR). 63rd AALAS National Meeting. 平成24年11月4日～8日. Minneapolis, MN, USA
 25. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Relationship of testicular androgen receptor protein expression with in vitro fertilizability of epididymal sperm in mice. 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 平成24年12月15日～19日. San Francisco, CA, USA
 26. Osamu Suzuki, Minako Koura, Yoko Noguchi, Kozue Uchio-Yamada, and Junichiro Matsuda. Reduced superovulation efficiency by high-dose treatment of dehydroepiandrosterone in mice. 2013 IETS Annual Conference. 平成25年1月18日～22日. Hannover, Germany
 27. Osamu Suzuki. High blood testosterone reduces superovulation efficiency in mice. 2nd Congress on Steroid Research. 平成25年3月10日～12日. Chicago, IL, USA
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

鈴木治, 岩田裕子. 筋傷害の簡便検査方法および筋傷害検査用キット. 特許第49974412号. 平成24年5月25日登録。

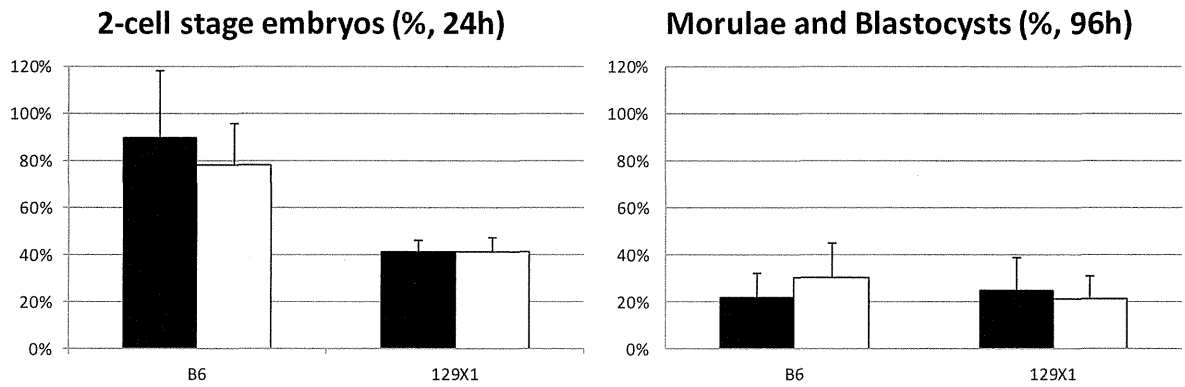


図 1. C57BL/6NCrSlc (B6) と 129X1/SvJJmsSlc (129X1) の精巢上体精子を用いた体外受精成績。placebo 群 (□) は全く DHEA を含まない徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より, DHEA 群 (■) は総量 5 mg の DHEA 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より得た精子で体外受精を行った。媒精後 24 時間での 2 細胞期への発生率 (受精率), 媒精後 96 時間での桑実胚と胚盤胞への発生率 (体外発生率) を求めた。どちらの系統でも, 受精率, 体外発生率について DHEA の有無で有意差はなかった (角度変換後, 供試卵子数で重み付けした 1 要因分散分析による)。

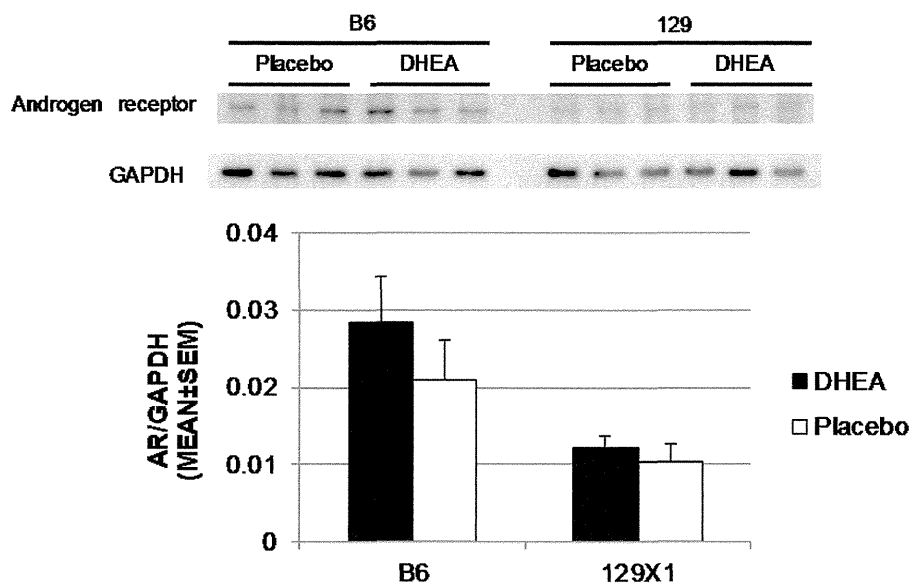


図 2. 精巢 AR 蛋白質の定量 Western Blot 解析(平均±標準誤差)。placebo 群 (□) は全く DHEA を含まない徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より, DHEA 群 (■) は総量 5 mg の DHEA 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より得た精巢から蛋白質を抽出した。系統間に有意差があったが, DHEA 処理の有無の間には有意差はなかった (2 要因分散分析による)。

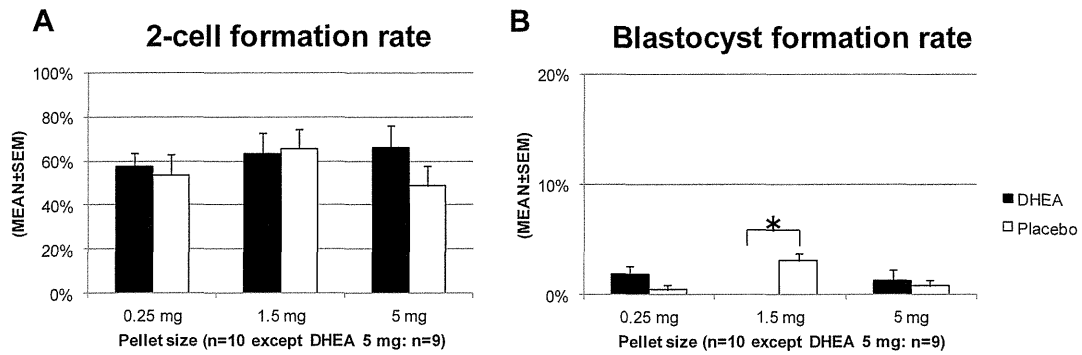


図3. 129X1/SvJMsSlc の過排卵誘起卵子を用いた体外受精成績 (平均±標準誤差, n=10, DHEA 5 mg 群のみ n=9)。DHEA 群(■)は 0.25, 1.5, もしくは 5 mg の DHEA 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より, Placebo 群 (□) は全く DHEA を含まない同形同大の徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より得た卵子で体外受精を行った。媒精後 24 時間での 2 細胞期への発生率 (A, 受精率に相当), 媒精後 96 時間での胚盤胞への発生率 (B, 体外発生率に相当) を求めた。角度変換後, 供試卵子数で重み付けした 1 要因分散分析によると, 受精率については調べた用量全てで Placebo 群に比べ有意差はなかったが, 体外発生率については, 1.5 mg 群で有意に低下した ($p < 0.05$)。0.25 mg 群では DHEA による発生率向上傾向が見られた ($p \approx 0.11$)。

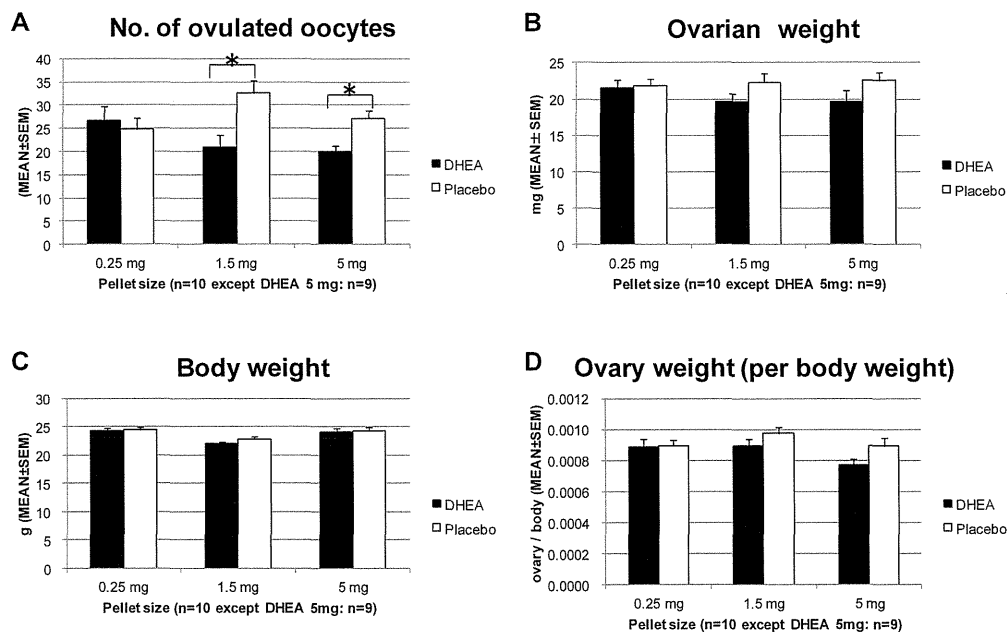


図4. 1匹当たりの平均排卵数 (A), 卵巣重量 (B), 体重 (C), および卵巣体重比 (平均±標準誤差, n=10, DHEA 5 mg 群のみ n=9)。DHEA 群(■)では 1.5 と 5 mg 群で Placebo 群 (□) に比べ有意に排卵数が低下した ($p < 0.05$)。卵巣重量, 体重, および卵巣体重比にはどの用量でも DHEA 群と Placebo 群との間で有意差はなかった。

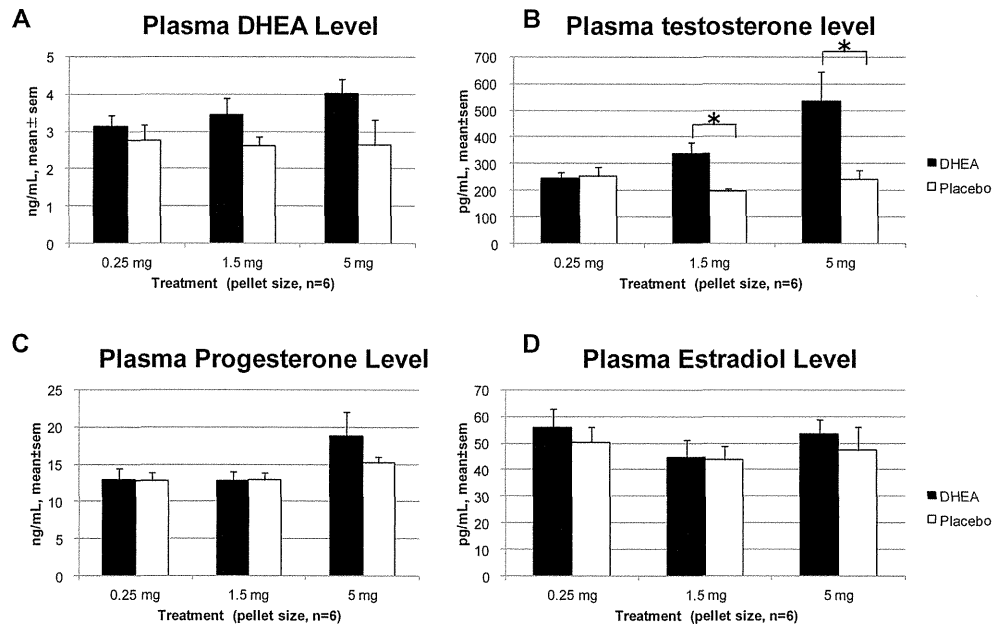


図 5. 採卵時の血中ホルモン濃度 (平均±標準誤差, n=6)。Placebo 群 (□) に比べ, DHEA 群(■) で用量の上昇に伴い血中 DHEA 濃度 (A) が上昇し (ただし, 有意差なし), 血中テストステロン濃度 (B) は 1.5 mg 群と 5 mg 群で DHEA 群が有意に高かった ($p < 0.05$)。血中プロゲステロン濃度 (C) と血中エストラジオール濃度 (D) は DHEA 群と Placebo 群の間でどの用量でも有意差はなかった。

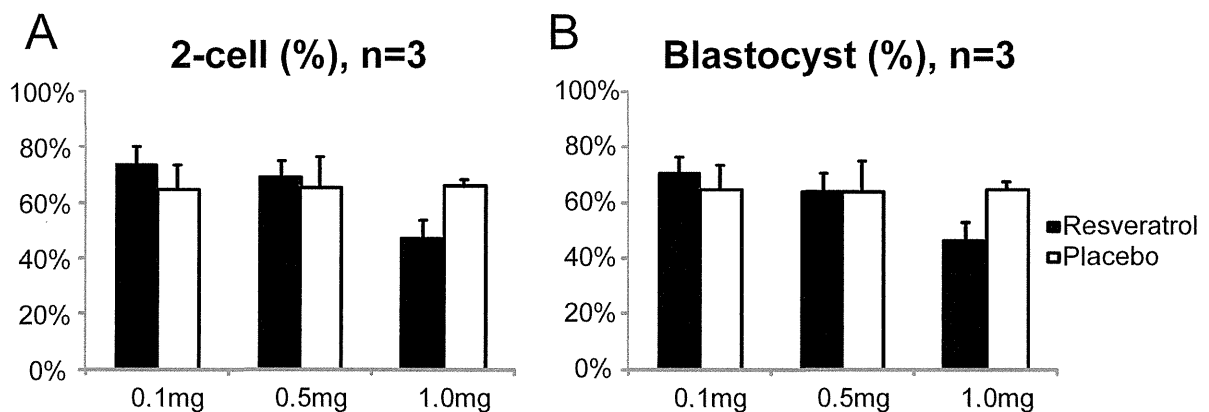


図 6. Resveratrol もしくは Placebo を投与した 129X1/SvJmsSlc の精巣上体精子を用いた体外受精成績 (平均±標準誤差, n=3)。Resveratrol 群(■)は 0.1, 0.5, もしくは 1 mg の Resveratrol 徐放性製剤を皮下に 3 週間入れておいた個体より, Placebo 群 (□) は全く Resveratrol を含まない同形同大の徐放性製剤を同期間皮下に入れておいた個体より得た精巣上体精子で体外受精を行った。媒精後 24 時間での 2 細胞期への発生率 (A, 受精率に相当), 媒精後 96 時間での胚盤胞への発生率 (B, 体外発生率に相当) を求めた。角度変換後, 供試卵子数で重み付けした 1 要因分散分析によると, 受精率・発生率ともに調べた用量全てで Placebo 群に比べ有意差はなかったが, Resveratrol 群において 0.1mg で上昇傾向, 1.0mg で下降傾向が見られた。

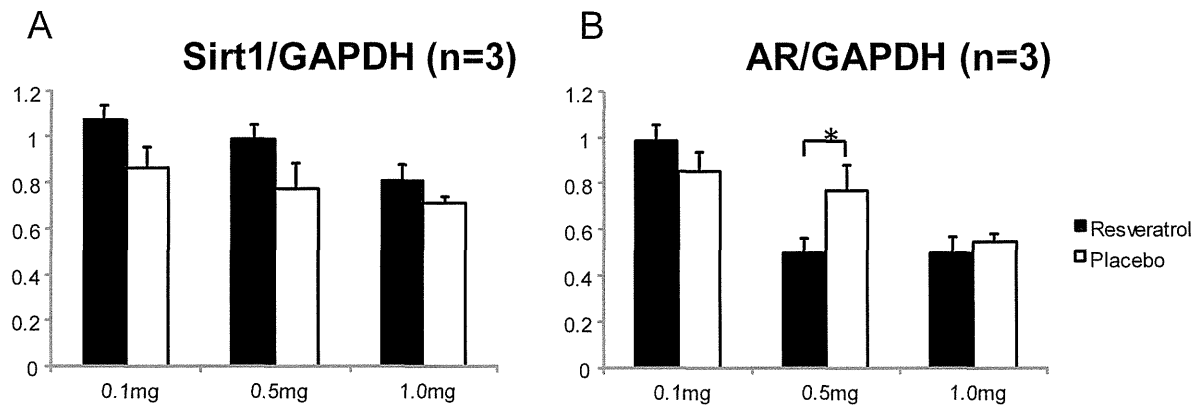


図7. 精巣に発現している Sirt1 (A) および Androgen Receptor (AR) (B) 蛋白量 (平均±標準誤差, n=3)。内部標準として Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を使用した。Sirt1 は全ての投与群で Resveratrol 群(■)が Placebo 群(□) に比べ上昇傾向を示した。AR は Resveratrol 群が Placebo 群に比べ 0.1mg で上昇傾向, 0.5mg で有意に低下 (p=0.004), 1.0mg で下降傾向が見られた。

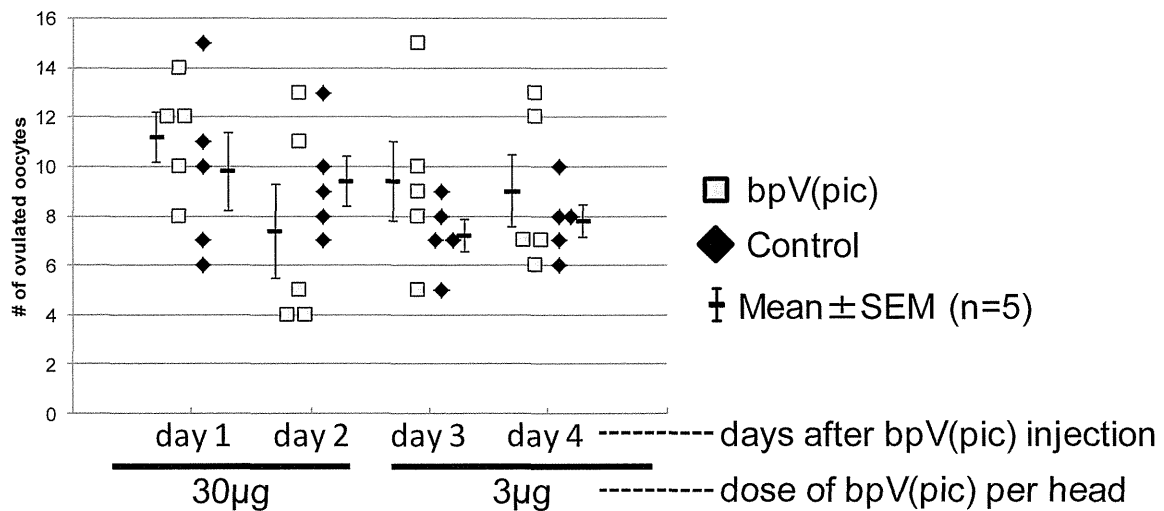


図8. bpV(pic)を併用した過排卵誘起 (n=5)。各実験群の個体毎の排卵数の分布を示す。左2群は bpV(pic)を 30 µg, 右の2群は 3 µg を投与した (対照はリンゲル液のみ)。bpV(pic)投与 (Day 0) のあと, 示した日から PMSG と hCG による誘起排卵を行った。30 µg の Day 1 および 3 µg の Day 3, Day 4 で排卵数の分布が対照群 (◆) に比べ bpV(pic)投与群 (□) の方が上にシフトする傾向, すなわち, 排卵数の増加傾向が見られた。30 µg の Day 2 ではむしろ排卵数が減少傾向を示した。

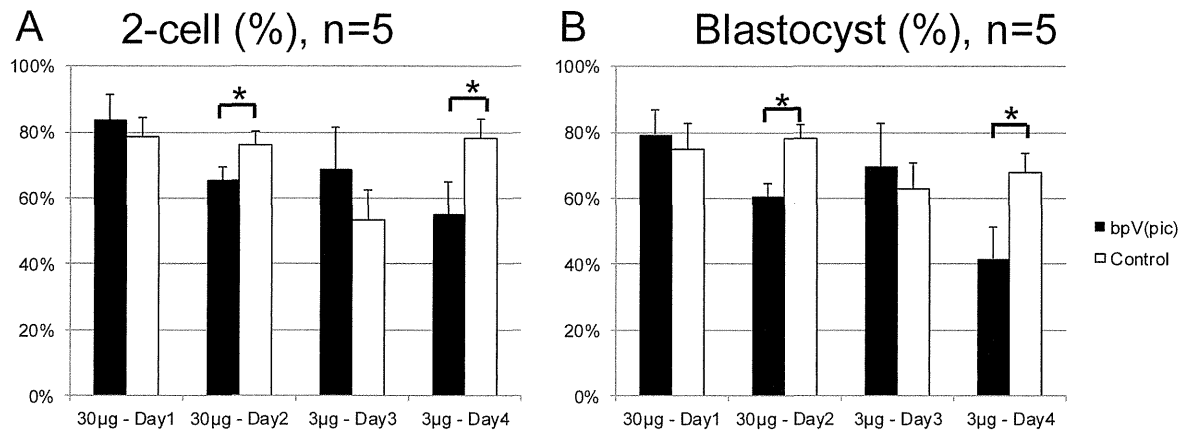


図9. bpV(pic)投与後に得られた卵子の受精率と発生率への影響。30 µg の Day 1 および 3 µg の Day 3 では受精率 (2-cell への発生率) および発生率 (胚盤胞への発生率) に有意差は無かったが、30 µg の Day 2 および 3 µg の Day 4 では対照群 (□) に比べて有意に bpV(pic)投与群 (■) が低かった。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

疾患モデルマウスの妊娠母体の病態解析と産仔の表現型への影響に関する研究

分担研究者： 内尾こずえ （独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 研究員

研究要旨

周産期医療研究推進のため、ヒトに近い霊長類を利用することが必須であるが、霊長類を用いた研究には多大な研究費、研究期間を要するため、並行してマウス等の齧歯類モデルを利用することも重要である。特にマウスは遺伝的に均一な系統が多く存在すること、良好な繁殖効率、短い妊娠期間、胚操作技術が確立しているため遺伝子改変が容易である等、汎用性が高いことが利点であり、マウスを利用した基礎的データが霊長類さらにはヒト疾患解明へ大いに貢献することが期待できる。本研究において周産期疾患病態解明のため、難治性ネフローゼ、全身性エリテマトーデスの難病モデルマウス妊娠期の病態を解析し、不妊治療や母体疾患がどのように産仔表現型へ影響するのか検討を行った。本研究での成果は、霊長類を用いた研究の一助となるとともにヒト周産期疾患の病態解明に貢献することが期待される。

A.研究目的

重篤な疾患による不妊、妊娠・出産による母体疾患の悪化、母体疾患が産児の健康状態に影響することは広く知られているが、残念ながらその機序については不明な点が多い。不妊治療においては、体外受精などの発生工学的手法が駆使されるケースが多いが、胚培養の行程によりゲノムへの後天的修飾をおよぼし、後々産児の表現型へ影響することが危惧されている。さらに母体疾患が産児にどのような影響をおよぼすかは不明な点が多く、詳細な解析を必要としている。

近年、発生工学的手法が発展し、マウス

は凍結胚保存、凍結胚の融解・移植を経て生体を安定的に得る技術が確立されていることや遺伝子改変が可能であることから様々な疾患モデルマウスが存在するため、周産期医療研究において利用価値が高い。マウスを利用し、不妊治療で行われる発生工学的手法が産仔表現型に与える影響、さらに妊娠・出産による母体疾患の病態変化、母体疾患が産児表現型に与える影響について解明することで、霊長類さらにはヒト疾患研究の一助となり得る。

そこで本研究では、難治性疾患であるネフローゼモデルマウスおよび全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスを用いて、不

妊治療が産仔に与える影響、母体疾患が産仔表現型に及ぼす影響および妊娠・出産による母体における疾患病態進行について精査した。

B.研究方法

<供試動物>

自然発症ネフローゼモデルマウス：医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにて維持している ICGN 系統を利用した。

全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウス：C57BL/6J-lpr/lpr および正常コントロールである C57BL/6J を日本エスエルシーより購入した。

<ネフローゼマウス産仔の作出>

体外受精により作製した ICGN マウス 2 細胞期胚をガラス化法 (EFS 法) にて凍結保存した。融解した ICGN 胚を偽妊娠雌性 ICGN マウス(n=4、GG 群)卵管および ICR マウス(n=4、RG 群)に 20 個ずつ (右卵管に 10 個、左卵管に 10 個) 移植を行い、産仔を得た (図 1 参照)。また自然交配で ICGN マウス産仔を作出した(Control 群)。両群とも産仔は 12 週齢にて供試した(図 1 参照)。

<SLE マウス産仔の作出>

雌性 C57BL/6J-lpr/lpr (SLE モデル)および雌性 C57BL/6J-lpr/+ (正常マウス)と雄性 C57BL/6J-lpr/lpr を交配し、産仔を作出した。lpr (Fas) の genotyping を行い、C57BL/6J-lpr/lpr 産仔を供試した。SLE マ

ウス由来の産仔を SLE 群、正常マウス由来の産仔を Normal 群とし、20 週齢のオス・メス、各群 8 匹ずつ供試した(図 2 参照)。

<母体および産仔の血清生化学検査>

血清中のアルブミン (Alb)、クレアチニン (CRE)、コレステロール(T-CHO)、尿素窒素 (BUN) を富士ドライケム 7000V にて測定した。

<抗 ds-DNA 抗体検査>

抗 ds-DNA 抗体検査キット (レビス) を用いて、SLE マウス血清中の抗 ds-DNA 抗体価を測定した。

<RNA 抽出および Real Time PCR>

ICGN マウス母体およびその産仔腎組織から total RNA を抽出後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems: ABI)を用いて、cDNA を合成した。TaqMan Gene Expression Assays (ABI)により I 型コラーゲン、TGF- β 1、TNF- α 、MCP-1、kim-1、usag-1、ifi202b、IFN- γ 、IL-13、CD3 (T 細胞)、CD20 (B 細胞)、F4/80(マクロファージ)、CD80 (M1 マクロファージ)、CD206 (M2 マクロファージ) の発現解析を行い、すべて GAPDH 比をとった。

<病理組織化学解析>

腎組織を 10%ホルマリンにて 24 時間固定後、パラフィン包埋した。3 μ m の切片を作製し、PAS 染色およびシリウスレッド染色

を行い、観察した。PAS 染色像を用い、半月体を形成している糸球体を数えた。また T 細胞のマーカーである CD3、B 細胞のマーカーである B220 およびマクロファージのマーカーである F4/80 を検出し、炎症の程度を精査した。

C.研究結果

不妊や流産のリスクが高い難治性疾患であるネフローゼ症候群、SLE に焦点を絞り、不妊治療や母体疾患が産仔表現型に与える影響について精査を行った。本研究で使用したネフローゼモデルである ICGN マウスは、腎糸球体を原発とする疾患を主体としているが、加齢とともに自己免疫疾患様の症状を示すことが最近になって明らかとなったため、腎病変に加え、SLE の症状についても検討した。さらに SLE モデルとして広く利用されている C57BL/6J-lpr/lpr についても検討を行った。

まずネフローゼ・SLE モデルである ICGN マウスを用い、不妊治療で実施される体外受精が新生仔の表現型にどのように影響するのか検討した。動物実験計画は図 1 に示したように、体外受精により作製した ICGN マウス 2 細胞期胚を偽妊娠雌性 ICR マウス卵管に移植を行って得た産仔 (RG 群)、ICGN マウス卵管に移植を行って得た産仔 (GG 群) および自然交配により得られた産仔 (Control 群) の 12 週齢時点での表現型を比較した。

産仔数：胚移植により生まれた平均産仔数は RG 群 11.75 匹、GG 群 4.25 匹であった。

産仔数に差があるのは、母体の body size に原因があると推察できる。RG 群の ICR マウス(母体)の平均体重が 39.39g であるのに対し、ICGN マウス(母体)は 26.14g である。また GG 群の産仔数は ICGN マウスの自然交配の産仔数と同等であった。

母体の表現型：GG 群の親マウスである経産 ICGN マウスと同週齢の未経産 ICGN マウスとの病態を比較すると、同程度であり、妊娠・出産による顕著な病態進行は認められなかった。また ICR マウスについても移植、出産により、表現型に変化はなかった。

産仔の表現型：以下の項目について解析した。

体重

3 週齢および 12 週齢での体重測定した結果を表 1 に示した。3 週齢時には、RG 群に比し、GG 群が低体重であったが、12 週齢時にはほぼ同等となった。GG 群と Control 群の体重は同等であった。

血清生化学解析結果

産仔の血清生化学解析の結果を表 2 に示した。GG 群に比べ RG 群はアルブミンが低く、BUN・クレアチニンが高いことが分かった。

遺伝子発現解析

Real Time PCR により、腎における尿細管傷害マーカー kim-1、usag-1、炎症に関与する TNF- α 、IFN- γ 、炎症細胞マーカー、線維化関連分子等の発現解析を行った (図 3：抜粋データ) その結果、尿細管傷害マーカーである kim-1、usag-1 については GG 群が高発現であった。一方、炎症に関

わる TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 などは GG 群に比べ、RG 群の方が高発現であった。さらに炎症細胞のマーカーである CD3 (T 細胞)、CD20 (B 細胞)、F4/80(マクロファージ)、CD80 (M1 マクロファージ)、CD206 (M2 マクロファージ) についても RG 群で発現が亢進しており、尿細管間質での炎症が重篤化していることが示唆された。また SLE で発現が亢進することが知られている ifi202b についても RG 群で発現の増加が認められた。Control 群に比し、胚操作を行った RG 群、GG 群は、腎組織において線維化マーカー、炎症マーカー、尿細管傷害マーカーのすべてにおいて発現が亢進していることが分かった。

病理組織化学解析結果

PAS 染色により GG 群、RG 群ともに糸球体メサンギウム領域の拡張、尿細管間質の線維化が認められたが、RG 群の方が重篤であった。特に RG 群は尿細管間質への炎症細胞の浸潤が重篤であること、一部の糸球体に半月体が観察された(図 4)。GG 群において半月体を形成している糸球体は全体の数%であったが RG 群においては、雄性で約 16%、雌性で約 24%の形成率であった。また Sirius red 染色の結果、RG 群において尿細管間質の線維化がより進行していることが分かった。さらに免疫染色の結果、RG 群、GG 群ともに尿細管間質に T 細胞、B 細胞の浸潤があるが、RG 群の方がより多くの浸潤細胞が観察され、炎症が重篤化していることが示唆された(図 5)。一方、マクロファージマーカー F4/80 の免疫染色

を行ったところ、両群ともに尿細管間質、糸球体周辺にマクロファージの浸潤が観察されたが、群間で大きな差は認められなかった。また両群ともメスの方がより多くマクロファージが浸潤していることが分かった。

抗核抗体解析

ELISA にて血清中の抗 dsDNA 抗体を測定した(図 6)。GG 群は 12 週齢の時点で dsDNA 抗体陰性であったが、RG 群では陽性であり、特に雌性マウスに dsDNA 抗体が高い傾向があった。(自己免疫疾患は性ホルモンが関与しているため性差があり、SLE に罹患する患者は 9 割以上、女性である。) また 12 週齢時のコントロール群も dsDNA 抗体は陰性であった。本研究でのデータは、母体疾患により自己免疫疾患様の症状が悪化する可能性、病態進行機序には雌雄差があることを示唆している。

以上の結果から、母体のネフローゼが産仔の腎病変進行に大きな影響を与えることが示唆された。

次に SLE マウスを用い、母体疾患が胎仔表現型に与える影響について検討した。SLE マウスとして FAS に変異をもつ C57BL/6-lpr/lpr マウスを利用した。動物実験計画は図 2 に示したように、FAS 変異をホモで持つメス SLE マウスから生まれた産仔 (SLE 群) およびヘテロでもつ正常マウスから生まれた産仔 (Normal 群) を自然交配により作出した。どちらの群の産仔も FAS 変異をホモで持つ共通の遺伝子型の C57BL/6-lpr/lpr マウスである。20 週齢の

オス・メス、各群 8 匹ずつ供試した。

母体の表現型: C57BL/6-lpr/lpr マウスは使用した週齢において、もともと腎炎の症状がほとんど観察されないため、妊娠・出産により病態が悪化しなかった。

産仔の表現型: 以下の項目について解析した。

体重・脾臓重量

体重は SLE 群の方が重い傾向にあった。脾臓重量は雄性マウスについては、どちらの群とも同程度であったが、雌性マウスは SLE 群の方が有意に重い傾向があった。

血清生化学検査

Alb, BUN は 2 群間で差がなかった。一方、Cre は SLE 群の方が高い傾向にあり、腎機能が低下していることが示唆された。

抗核抗体解析

ELISA にて血清中の抗 dsDNA 抗体を測定した。Normal 群は dsDNA 抗体陰性であったが、SLE 群では陽性であり、特に雌性マウスに dsDNA 抗体が高い傾向があった。

以上の SLE マウスを用いた研究結果から、母体疾患が産仔の SLE 病態進行に大きな影響を与えることが示唆された。

D. 考察

本研究において難治性疾患である難治性ネフローゼ症候群・SLE モデルマウス ICGN 系統および SLE モデルである C57BL/6-lpr/lpr 系統を利用し、不妊治療や母体疾患が産仔表現型に与える影響について検討を行った。

①胚培養の影響（不妊治療の影響）

体外受精で作出した ICGN 胚を偽妊娠雌性 ICGN マウス卵管に移植して得た産仔と自然交配で得た産仔の病態を比較した結果、表現型に大きな差が認められた。体外受精由来の産仔の方が炎症や線維症が重篤化し、ネフローゼの進行が加速することが明らかとなった。このことは体外受精のような胚培養の行程を含むことで、エピジェネティックな変化が生じることを示唆している。難治性疾患による不妊の解決策として体外受精は有効な手法に変わりないが、新生児の表現型には注意を払う必要があると考えられる。

②母体疾患→産仔表現型

SLE モデル C57BL/6-lpr/lpr マウスを使用した研究において、FAS 変異をホモで持つメス SLE マウスから産まれた産仔（SLE 群）およびヘテロでもつ正常マウスから産まれた産仔（Normal 群）を自然交配により作出し、表現型を比較したところ、SLE 群のみ自己抗体産生、腎機能悪化、splenomegaly が認められた。どちらの群の産仔も FAS 変異をホモで持つ共通の遺伝子型の C57BL/6-lpr/lpr マウスであるが、SLE に罹患した母体から生まれることで病態が悪化することが分かった。母体 C57BL/6-lpr/lpr マウス血清中の抗核抗体が産仔に影響を及ぼし、産仔の自己抗体産生、腎機能悪化、splenomegaly に関与したと考えられる。

③母体疾患+不妊治療→産仔表現型

融解した ICGN 胚を偽妊娠雌性 ICR マウスおよび ICGN マウス卵管に移植を行い、

生まれた産仔の病態解析を行った結果、産仔の genotype は同じであるにも関わらず、母体の違いが産仔の phenotype を変化させることがわかった。正常 ICR 雌性マウスから生まれた産仔の方がより病態進行が著しく、12 週齢時において SLE 様の病変が確認された。このことは② SLE モデル C57BL/6-lpr/lpr マウスを用いた解析データと矛盾するものであった。即ちネフローゼモデル ICGN マウスは正常 ICR マウスから生まれると病態進行が加速していたが、SLE モデルの場合は SLE を罹患するマウスから生まれると病態進行が加速していた。ICGN マウスは生後間もなく腎疾患が進行し、成体になっても標準系統と比べ body size が小さく、繁殖効率が大変悪い系統である。ICGN マウスは通常自然交配において、小さな母体から小さく生まれ、産仔数も少ない。また乳汁のタンパク含有量が低いため、成長も遅く、離乳時の体重は正常系統に比して軽い。一方、体外受精から得た ICGN 胚を正常 ICR マウスに移植した場合、自然交配由来の ICGN マウスより大きく生まれ、産仔数も多い。これは母胎内および出生後の母乳から十分な栄養が獲得できるためと考えられる。正常な系統であれば、申し分のない環境であるが、もともと糸球体に異常がある ICGN 系統にとっては、母胎および授乳期の高栄養状態（高タンパク状態）が糸球体への負荷を増大させている可能性がある。このことは ICR マウス移植した場合、低アルブミン血症が進行していること、全身性浮腫になる確立が増

大していることから、糸球体基底膜の損傷が急速に進行していることが推察される。ネフローゼ患者にとって高タンパク食摂取が腎に負担をかけることが知られており、今回の研究で用いた ICGN マウスにとって、正常メスマウスの母胎環境および母乳に含まれるタンパク量が過度であった可能性が考えられる。さらに①で示したように、胚培養の行程を含むことで、ネフローゼの進行が加速するため、胚培養が病態進行にさらなる拍車をかけたものと推察される。

抗核抗体陰性の正常 ICR マウスに ICGN マウス胚を移植して得られた産仔において、早い時期から抗核抗体が認められたことについても SLE モデル C57BL/6-lpr/lpr の結果と矛盾する。本研究で用いたマウスモデルではこれ以上の詳細な解析が困難であるため、自己免疫疾患が悪化する機序を解明することを目的とし、現在新規モデルマウスを鋭意開発中である。ICGN マウスは遺伝的に均一なコントロールマウスが存在しないため、母体-産仔間の研究を行うには、胚操作が必須であり、自然交配だけの実験系を組むことができない。この欠点を克服する新規系統の樹立している。即ち ICGN マウスの複数の原因遺伝子領域を持つコンジュニック系統を作製し、ネフローゼのみ発症する系統、SLE のみ発症する系統、両方の特性を持つ系統を樹立し、自然交配により母体-産仔間の関係を精査する実験系を準備中である。母体疾患による産仔病態悪化のメカニズム解明がヒトでの周産期医療研究の一助となることが期待される。

以上の結果より、産仔の遺伝子型は同じであるにも関わらず、不妊治療や母体疾患が産仔の表現型を変化させることが明らかとなった。このことはゲノムへの後天的な修飾が様々な疾患の進行に大きく影響することを示唆している。他の疾患モデルについても検討し、メカニズムを解明することが重要だと考えられる。さらに実験動物バンクにおいて、一般的に凍結胚を融解、正常マウス卵管へ移植、生まれた産仔を分譲しているが、系統によっては産仔の表現型に注意を払う必要性が示唆された。

E. 結論

ネフローゼマウスおよび SLE マウスを用いた本研究により不妊治療や母体疾患が産仔表現型に多大な影響を与える可能性が明らかとなり、母体疾患が産仔に大きな影響を与えるという問題提起ができたことは非常に意義があったと考えられる。今後、ネフローゼ・SLE だけではなく様々な疾患について検討することが重要であり、小動物での精密な研究結果を蓄積することでバンク等の資源事業、霊長類を用いた研究への応用、ヒト周産期疾患研究へ貢献することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(書籍)

1. 山田-内尾こずえ、眞鍋昇 ‘腎疾患 自然発症モデル 「ネフローゼ症候群モデル (ICGN マウス)」’ 循環器疾患-

疾患モデルの作製と利用(編集者: 北徹・堀内久徳・柳田素子・猪原匡史・富本秀和・並河徹、出版社: 株式会社エル・アイ・シー)p260-263、2010年

(雑誌)

2. Kinehara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. *PLoS One*. 2013;8(1): e54122.
3. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Yu H, Moriguchi A, Rakugi H, Morishita R. Oral glucose loading modulates plasma β -amyloid level in alzheimer's disease patients: potential diagnostic method for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2012; 34(1): 25-30.
4. 山本 美江、内尾-山田 こずえ、高野 薫、小倉 淳郎、浅野 敏彦、中川 雅郎「ICR系マウスの遺伝子資源としての有用性」岡山実験動物研究会会報 第28号、p59-62、2012年
5. Sato N, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Fujisawa T, Rakugi H, Morishita R., Role of insulin signaling in the interaction between Alzheimer disease and diabetes mellitus: a missing link to therapeutic potential. *Current Aging Science*, 2011; 4(2): 118-127.
6. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y,

- Uchio-Yamada K, Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative western blots. *Exp Anim.* 2011; 60(2): 193-196.
7. Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1, 3GalNAc α 2, 3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2011; 87(8): 550-562.
 8. Kumagai A, Horike N, Satoh Y, Uebi T, Sasaki T, Itoh Y, Hirata Y, Uchio-Yamada K, Kitagawa K, Uesato S, Kawahara H, Takemori H, Nagaoka Y. A Potent Inhibitor of SIK2, 3, 3', 7-Trihydroxy-4'-Methoxyflavon (4'-O-Methylfisetin), Promotes Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells. *PLoS One.* 2011; 6(10): e26148.
 9. 里 直行・武田 朱公・内尾-山田こずえ・樂木 宏実、森下 竜一 「認知症の病態進行におけるインスリン抵抗性の役割」*実験医学* 5月号, p1250-1255, 2011年(和文総説)
 10. Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T, Uchio-Yamada K, Yoshioka H, Hamanaka R, Yano S, Yokoyama S, Mannen K, Kulkarni AB, Furukawa K, Ishii S. Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human α 1,4-galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease. *J Biochem.* 149(2): 161-170, 2011
 11. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R. Diabetes accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta desposition in Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 107(15): 7036-7041, 2010
- 2.学会発表
1. 里 直行、森-植田 茉莉、田中 稔久、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山 繁雄、武田 雅俊、樂木 宏実、森下 竜一 「アルツハイマー病APP Tgマウス脳における糖尿病によるタウ・リン酸化の促進」*脳心血管抗加齢研究会*2012、2012年11月18日、大阪（口頭）
 2. 里 直行、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、湯 久浩、守口 篤、樂木 宏実、森下 竜一 「糖負荷試験における血中 β アミロイド測定—アルツハイマー病診断補助方法としての可能性」*脳心血管抗加齢研究会*2012、2012年11月18日、大阪（口頭）

3. 里 直行、森-植田 茉莉、田中 稔久、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山 繁雄、武田 雅俊、樂木 宏実、森下 竜一 「糖尿病はAPPトランスジェニックマウス脳においてタウのリン酸化を促進する」 第31回日本認知症学会学術集会、2012年10月26-28日、つくば (口頭)
4. 武田 朱公、里 直行、内尾-山田 こずえ、湯 久浩、守口 篤、樂木 宏実、森下 竜一 「糖負荷後血中A β 値の変動とそのアルツハイマー病診断指標としての応用」 VAS-COG JAPAN 2012、2012年9月8日、東京 (口頭)
5. 里 直行、森-植田 茉莉、田中 稔久、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山 繁雄、武田 雅俊、樂木 宏実、森下 竜一 「糖尿病によるアルツハイマー病トランスジェニックマウス脳におけるタウのリン酸化の促進」 VAS-COG JAPAN 2012、2012年9月9日、東京 (口頭)
6. Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "Roles of beta-amyloid and insulin resistance in the interaction between diabetes mellitus and Alzheimer's disease" Gordon Research Conferences, Neurobiology of Brain Disorders Chair: Jie Shen, Vice Chair: Joachim J. Herz Stonehill College, August 5-10, 2012 (口頭)
7. Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "The mechanisms by which diabetes mellitus increases the risk of Alzheimer's disease" Keystone Symposia, Aging and Diseases of Aging, October 25, 2012, Tokyo (ポスター)
8. Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "Old APPxob/ob mice showed highly increased level of tau phosphorylation in brain" Neuroscience 2012, October 15, 2012, New Orleans (ポスター)
9. 里 直行、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、樂木 宏実、森下 竜一・「アルツハイマー病と糖尿病の相互的病態修飾」・第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月21日、札幌 (口頭)
10. 武田 朱公、里 直行、内尾-山田 こずえ、樂木 宏実、森下 竜一・「Diabetes accelerates memory dysfunction via cerebrovascular dysfunction in an Alzheimer mouse model with diabetes」・第18回日本血管生物医学会学術集会、2010年12月3日、大阪 (口頭)
11. 武田 朱公、里 直行、内尾-山田 こずえ、湯 久浩、守口 篤、樂木 宏実、森下 竜一・「糖代謝が血中 β ・アミロイド蛋白(A β)量に与える影響の検討：アルツハイマー病の新規診断指標への応用」・第18回日本血管生物医学会学術集会、2010年12月2日、大阪 (ポスター)
12. 武田 朱公、里 直行、内尾-山田 こずえ、

- 楽木 宏実、森下 竜一・「糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスにおける脳血管病態と脳内インスリンシグナルの変化」・第 29 回日本認知症学会総会、2010 年 11 月 5-6 日、名古屋 (ポスター)
13. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、湯 久浩、守口 篤、楽木 宏実、森下 竜一・「全身糖代謝が血中 A β 値に与える影響とその診断的応用についての検討」・第 4 回関西中部認知症研究会、2010 年 9 月 18 日、大阪 (口頭)
14. 里 直行、武田 朱公、内尾・山田 こそえ、楽木 宏実、森下 竜一・「アルツハイマー病と糖尿病の相互的病態修飾：Possible pathological interaction between diabetes mellitus and Alzheimer disease」・Neuro 2010 (第 33 回日本神経科学大会)、2010 年 9 月 3 日、神戸 (口頭)
15. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、篠原 充、楽木 宏実、森下 竜一・「アルツハイマー病病態における血管性危険因子の役割：糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスの解析から：Role of vascular risk factors in the pathogenesis of Alzheimer disease: Analysis of novel mouse models of Alzheimer disease with diabet」・Neuro 2010 (第 33 回日本神経科学大会)、2010 年 9 月 2 日、神戸 (口頭)
16. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、楽木 宏実、森下 竜一・「Mechanistic interaction between Alzheimer disease and diabetes mellitus」・第 1 回日本血管性認知障害研究会 (VAS-COG Japan 2010)、2010 年 8 月 28 日、東京 (口頭)
17. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、湯 久浩、守口 篤、楽木 宏実、森下 竜一・「Elevation of plasma A β level by glucose loading: possibility of diagnostic tool for Alzheimer disease」・第 1 回日本血管性認知障害研究会、2010 年 8 月 28 日、東京 (口頭)
18. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、澤田 京子、國枝 孝典、篠原 充、楽木 宏実、森下 竜一・「アルツハイマー病と糖尿病の相互的病態修飾機序の解明：糖尿病合併アルツハイマー病モデル動物の確立とその病態解析」・包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2010 年 7 月 29 日、札幌 (ポスター)
19. 武田 朱公、里 直行、内尾・山田 こそえ、澤田 京子、國枝 孝典、篠原 充、楽木 宏実、森下 竜一・「全身糖代謝が血中アミロイド β 蛋白濃度に与える影響の検討：糖負荷後血中 A β 値の変動を利用した新たなアルツハイマー病診断指標の探索」・包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2010 年 7 月 29 日、札幌 (ポスター)
20. 武田 朱公、里 直行、内尾 こそえ、澤田 京子、國枝 孝典、篠原 充、楽木 宏実、森下 竜一・「糖尿病は脳血管障害と脳内インスリンシグナルの障害を介してアルツハイマー病脳内病態を修飾する」第 10 回日本抗加齢医学会総会、2010 年 6 月 12 日、京都 (口頭)

21. 武田 朱公、里 直行、内尾 こずえ、澤田 京子、國枝 孝典、篠原 充、樂木 宏実、森下 竜一「糖負荷による血中A β の変動を利用した新たなアルツハイマー病診断指標の探索：全身糖代謝が血中A β 濃度に与える影響の検討」第10回日本抗加齢医学会総会、2010年6月12日、京都（ポスター）
22. 武田 朱公、里 直行、内尾-山田 こずえ、樂木 宏実、森下 竜一「糖尿病とアルツハイマー病の相互的病態修飾機序の解明：糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスの作成とその病態解析」第57回日本実験動物学会総会、2010年5月12日、京都（口頭）
23. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Rakugi H, Morishita R. Diabetes Accelerated Memory Dysfunction via Cerebrovascular Inflammation and Beta-Amyloid Deposition in Alzheimer Mouse Model: Generation of Novel Transgenic Mouse Models of Alzheimer Disease with Diabetes. Vascular Consequences of Obesity and Insulin Resistance-Pathobiology and Pharmacology, 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (ISH2010) , Vancouver, Canada (September 27, 2010)（口頭）
24. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R. Diabetes mellitus exacerbated learning impairment via cerebrovascular inflammation and disturbance of brain insulin signaling in Alzheimer mouse models with diabetes. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer Disease 2010 (ICAD2010), Honolulu, Hawaii (July 12, 2010)（ポスター）
25. 里 直行、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、樂木 宏実、森下 竜一・"糖尿病がアルツハイマー病の後天的危険因子である機序"・第52回 日本神経学会学術大会、2011年5月19日、名古屋（口頭）
26. Sato N, Takeda S, Ueda M, Yu H, Moriguchi A, Uchio-Yamada K, Rakugi H, Morishita R. "CHANGE IN PLASMA BETA-AMYLOID LEVEL AFTER GLUCOSE LOADING : A POSSIBLE BIOMARKER FOR ALZHEIMER DISEASE"・AAIC (Alzheimer Association International Conference) 2011, 2011 July 18, Paris（口頭）