

平成 30 年 4 月 13 日現在

機関番号：44411

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01740

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームに対する脂肪酸によるエピジェネティクス制御の解明

研究課題名(英文)Elucidation of epigenetic control by fatty acid against metabolic syndrome

研究代表者

高橋 真由美 (TAKAHASHI, MAYUMI)

大阪女子短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：90596173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠期から授乳期に母親が摂取する油脂由来の脂肪酸が、次世代における生活習慣病の発症に影響を及ぼす可能性があり、その仕組みを明らかにするため、母獣マウスを妊娠中から授乳期にわたり高脂肪ラード食および高脂肪魚油食で飼育し、仔マウスの肝臓を解析した。母獣マウスの食餌により仔マウスの脂肪燃焼に関連する遺伝子はDNAメチル化の変化を伴い発現量が大きく異なっていたことより、母獣マウスが摂取する油脂由来の脂肪酸は仔マウスの肝臓でメチル化を介して遺伝子発現を制御する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Maternal fatty acids intake from dietary oil, during pregnancy to lactation, may affect the onset of lifestyle diseases in the next generation. To clarify the mechanism, maternal mice were feed high fat lard diet or high fat fish oil diet from pregnancy to lactation, and the liver of offspring were analyzed. The gene expression of neonatal liver showed difference, which accompanied changes of DNA methylation by maternal diet. Especially, large changes were observed in fatty acid metabolism related genes of maternal high fat fish oil diet group. Therefore, maternal dietary fatty acids could control the gene expression trough DNA methylation on specific metabolic pathway in neonatal liver, where organ is immature.

研究分野：応用栄養学

キーワード：DNAメチル化 脂肪酸 魚油 エピゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病は環境因子と遺伝素因が複雑に相互作用することにより発症する代表的な多因子疾患であるが、環境因子である食事による脂質の過剰摂取は、肥満をはじめとするメタボリックシンドローム、さらに冠動脈疾患のリスクを増加させることが数多く報告されている。また近年の日本人の食生活は脂質摂取量の増加に加え、肉・乳製品などの動物性脂質摂取の増加や、加工食品の利用やファストフードなどの外食に伴うラードやパーム油の摂取増加により飽和脂肪酸の摂取量が増加している。一方でn-3系脂肪酸の摂取量は減少しており、この傾向は子育て世代において著しい。

研究代表者らはこれまでに、動物実験において脂肪摂取量の増加に伴い肥満および糖尿病が増悪することや (*J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 45: 759, 1999)、摂取する脂肪酸により肥満および糖尿病の増悪に及ぼす影響が異なることを報告し (*Metabolism* 45: 1539, 1996)、特にn-3系脂肪酸を含む油脂についての抗肥満作用や耐糖能惹起抑制のメカニズムのひとつとして、核内受容体 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) を介していることを明らかにしてきた (*J. Biol. Chem.* 274:25892, 1999, *Am. J. Physiol.* 282:G338, 2002)。また疫学調査や動物モデルを用いた研究から、胎児期の栄養環境は成人期に発症する肥満や糖尿病などの生活習慣病の罹患感受性に影響を与えるという概念が提唱されているが (Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD)、研究代表者らは離乳前の脂質を主な栄養素とする新生仔マウスの肝臓では、脂肪合成の律速酵素である Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) 1 遺伝子の発現抑制が DNA メチル化酵素 Dnmt3b を介していることや (*Diabetes* 61:2442, 2012)、多くの脂肪酸酸化関連遺伝子では、母乳中の脂質リガンドによる PPAR の活性化が DNA メチル化の減少を惹起し、同遺伝子発現が増加することを見出した (*Diabetes in press*, 2015)。

乳汁の主成分である脂質の脂肪酸組成は母親の食事に大きく影響を受けることに加え、脂肪酸は受容体の活性化や、受容体を介した遺伝子発現制御作用によりインスリン抵抗性に関与することが報告されている。特にn-3系脂肪酸はその代謝産物が PPAR リガンドとして作用するという学術的背景や研究代表者ら独自のこれまでの研究成果を踏まえて、母親が摂取するn-3系脂肪酸や飽和脂肪酸は、臓器可塑性が高い時期である胎児・乳児期において DNA メチル化を介した糖脂質代謝関連遺伝子発現のエピジェネティクス制御を司ることで、児の将来のメタボリックシンドロームの罹患感受性を決定する可能性があるという本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究は従来までの研究代表者ら独自の研究成果を踏まえて、胎児期や臓器機能が未熟であり臓器可塑性が高いと考えられる乳児期における母親の摂取する脂肪酸組成が異なる油脂が、児の肝臓における DNA メチル化状態を変化させ遺伝子発現を制御するかを検討し、DNA メチル化によりエピジェネティクス制御を受ける遺伝子の同定を行うとともに機能解析を目指す。

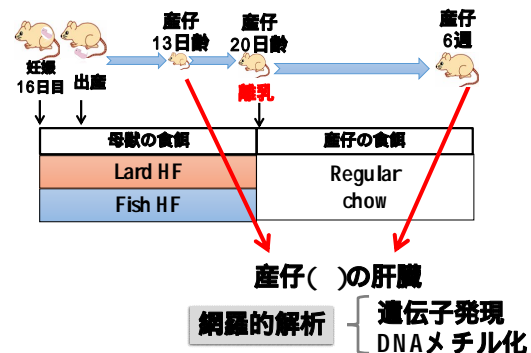
### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物および飼料

雌 C57BL/6J マウス妊娠 16 日目は 2 群に分け、ラード高脂肪食 (45kcal%脂肪含有) または魚油高脂肪食 (45kcal%脂肪含有) で産仔の離乳まで飼育した。

各飼料を摂取した母獣の産仔より、離乳前の生後 13 日齢と 6 週齢の産仔について組織を採取し解析をおこなった。なお離乳後から 6 週齢まで産仔は飼育繁殖用餌 CE2 (オリエンタル酵母株式会社) で飼育した (図 1)。飼育は室温 23 ± 2 度、湿度 50 ± 5% 明暗サイクル 12 時間 (7:00-19:00 明期) 条件下で、飼料および水は自由摂取とした。すべての動物実験は、大阪女子短期大学研究倫理委員会および東京医科歯科大学動物実験委員会 (No. 0090041) の指針に従った。

図 1. 実験デザイン



#### (2) 血清脂質の測定

血清トリグリセリド、総コレステロールは、酵素比色法により富士ドライケム7000Vを使用し測定した。

#### (3) 母乳中の脂肪酸分析

産仔マウス13日齢の胃より採取した母乳は生理食塩水と混和し乳汁ホモジェネートとし、クロロホルム・メタノール (2 : 1) 抽出後、メチルエステル化しメチル化脂肪酸としてガスクロマトグラフィーにより測定した。

#### (4) DNAマイクロアレイ

各飼料を摂取した母獣より得られた13日齢の産仔の肝臓は、セパゾール (ナカライテスク株式会社) を用いてトータルRNAを抽出後、

各群について同量を混合し antisense RNA amplification) により増幅後、Mouse Oligo chip 24K (東レ株式会社) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子パスウェイ解析は KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) をデータベースとし GeneCodis3 (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) を使用した。

#### (6) 網羅的DNAメチル化解析

各飼料を摂取した母獣より得られた13日齢および6週齢の産仔の肝臓より、ゲノムDNAをプロテイナーゼK法で精製し、MIAMI法 (Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers) によりDNAメチル化の網羅的解析を行った。

#### (7) 統計解析

データ解析には、GraphPad Prism (GraphPad) を用いた。正規性の検定後、paired Student's *t*-testを行った。データは平均 ± 標準偏差として表し、P値は0.05以下を統計的に有意であるとした。

### 4. 研究成果

各食餌群における母獣の摂餌量はラード高脂肪食が  $28.3 \pm 2.4$  kcal/日・匹、魚油高脂肪食が  $29.9 \pm 1.2$  kcal/日・匹で有意差はなかった。いっぽう各食餌群を摂取した母獣の産仔の13日齢における体重に差はなかったが、肝臓重量は母獣の魚油高脂肪食摂取の産仔群 (MFish-13D) は母獣のラード高脂肪食摂取の産仔群 (MLad-13D) と比較し有意に増加していた。

DNA マイクロアレイによる網羅的な肝臓での遺伝子発現の解析は、MFish-13D が MLad-13D と比較し1.5倍以上発現増加している遺伝子について KEGG によるパスウェイ解析を行った。その結果、04146 Peroxisome、00071 Fatty acid metabolism が抽出され、これらの遺伝子の多くが脂肪酸酸化に關与する遺伝子であった。代表的な脂肪酸酸化に關与する遺伝子である *Cpt1a* (Carnitine palmitoyltransferase 1A)、*Acox* (Acyl-CoA oxidase)、*Ehhadh* (Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase) についてリアルタイムPCR法で定量的に確認したところ、これらの遺伝子はMFish-13Dで著しく発現増加していた。

さらに、これらの遺伝子発現がエピジェネティックな変化を伴うかを明らかにするため、制限酵素感受性を利用したMIAMI法により網羅的DNAメチル化解析を行った結果、MFish-13DはMLad-13Dと比較し、DNA脱メチル化されている遺伝子数が多く、MFish-13Dで発現増加していた脂肪酸酸化に關与する遺伝子 *Cpt1a*、*Acox*、*Ehhadh* はいずれもDNA脱メチル化を伴っていた。さらに遺伝子発現が増加し、かつDNA脱メチル化している遺伝子につい

てKEGGによるパスウェイ解析を行ったところ、04146 Peroxisome、03320 PPAR signaling pathway、00071 Fatty acid metabolism に關与することが確認された。

母獣が摂取した食餌がおよぼす母乳の脂肪酸組成への影響を検討したところ、食餌中の油脂の脂肪酸組成をほぼ反映しており、炭素鎖20以上の脂肪酸はラード高脂肪食群の母乳にはほとんど認められず、EPAやDHAなどのn-3系脂肪酸が母獣の食餌由来であることが確認された。

以上の結果より母獣の食餌性脂肪酸が、母乳を介して産仔の肝臓における遺伝子発現を変化させること、この変化はDNAのメチル化を介して制御される可能性があることが示唆された。

MFish-13Dで観察されたDNA脱メチル化が、成獣期においても維持されているかを検討するため、離乳から6週齢まで普通食で各群の産仔を飼育した。体重、組織重量、血中脂質はいずれも有意差はなかった。網羅的DNAメチル化解析より、母獣の魚油高脂肪食摂取の産仔群6週齢 (MFish-6W) においても肝臓における脂肪酸酸化に關与する遺伝子 *Cpt1a*、*Acox*、*Ehhadh* はいずれもDNA脱メチル化を維持しており、DNA脱メチル化している遺伝子についてのKEGGによるパスウェイ解析では03320 PPAR signaling pathway、04146 Peroxisome、00071 Fatty acid metabolism パスウェイにある遺伝子のDNA脱メチル化は維持されていることが明らかとなった。

以上より母獣の食餌性脂肪酸が乳児期という器官が未成熟な時期において、特定の代謝経路におけるDNA脱メチル化をひきおこすことが示唆された。

乳児期において確立されたDNAメチル化状態は生涯を通して比較的安定しており、成人期における肝臓での脂質代謝や生活習慣病の感受性に影響を及ぼすことが示唆されているが、本研究においても食餌性脂肪酸により誘発されたと考えられる乳児期における脂肪酸酸化関連遺伝子のDNA脱メチル化は成獣になっても維持されていた。これは母獣の食餌性脂肪酸がDNAメチル化のようなゲノムのエピジェネティックな作用を介し、産仔のメタボリックシンドロームの罹患性を決定する大きな因子となる可能性を示している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Yuan X, Tsujimoto K, Hashimoto K, Kawahori K, Hanzawa N, Hamaguchi M, Seki T, Nawa M, Ehara T, Kitamura Y, Hatada I, Konishi M, Itoh N, Nakagawa Y, Shimano H, Takai-Igarashi T, Kamei Y, Ogawa Y: Epigenetic modulation of *Fgf21* in the perinatal mouse liver

ameliorates diet-induced obesity in adulthood. Nat Commun 査読有 9:636, 2018

Kawahori K, Hashimoto K, Yuan X, Tsujimoto K, Hanzawa N, Hamaguchi M, Kase S, Fujita K, Tagawa K, Okazawa H, Nakajima Y, Shibusawa N, Yamada M, Ogawa Y: Mild maternal hypothyroxinemia during pregnancy induces persistent DNA hypermethylation in the hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene in mouse offspring. Thyroid 査読有 28:395-406, 2018

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋真由美 (TAKAHASHI, Mayumi)  
大阪女子短期大学・生活科学科・教授  
研究者番号：90596173

### (2) 研究分担者

橋本貢士 (HASHIMOTO, Koshi)  
研究者番号：30396642

### (3) 連携研究者

山崎聖美 (YAMAZAKI, Tomomi)  
研究者番号：00218439

## 〔学会発表〕(計4件)

高橋真由美、袁勳梅、山崎聖美、橋本貢士、小川佳宏「母獣の食餌性脂肪酸による仔の肝臓における遺伝子発現とDNAメチル化の検討」第38回日本肥満学会, 2017

高橋真由美、袁勳梅、山崎聖美、橋本貢士、小川佳宏「母獣が摂取する飽和脂肪酸およびn-3系脂肪酸油脂による仔の肝臓でのDNAメチル化への影響」第71回日本栄養・食糧学会大会, 2017

高橋真由美、袁勳梅、山崎聖美、橋本貢士、小川佳宏「母獣の食餌性脂肪酸による仔の肝臓における遺伝子発現制御の検討」第37回日本肥満学会, 2016

高橋真由美、袁勳梅、橋本貢士、小川佳宏「母獣が摂取する飽和脂肪酸およびn-3系不飽和脂肪酸油脂が及ぼす仔の肝臓における遺伝子発現への影響」第70回日本栄養・食糧学会大会, 2016

## 〔図書〕(計5件)

橋本貢士、小川佳宏「母乳栄養とDOHaD」金原出版、産婦人科の実際 66:1011-1017, 2017

橋本貢士、小川佳宏「脂質代謝 DNAメチル化による肝脂質代謝制御機構」肝・胆・膵、アークメディア、75:111-117, 2017

橋本貢士、小川佳宏「代謝メモリーとDevelopmental Origins of Health and Disease(DOHaD)学説」最新医学社、最新医学、72:678-684, 2017

辻本和峰、橋本貢士、袁勳梅、川堀健一、榛澤望、小川佳宏「DNAメチル化による糖脂質代謝制御機構」メディカルレビュー社、The Lipid、28:263-268, 2017

高橋真由美、小川佳宏「糖尿病をはじめとする代謝疾患とエピゲノム」医歯薬出版、別冊・医学のあゆみ クリニカルエピゲノミクス、109-115, 2016