

令和元年6月19日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12727

研究課題名(和文)胎児期低栄養による糖尿病発症リスク増大と関連するエピゲノムマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for epigenome markers associated with an elevated risk of diabetes due to undernutrition in the fetal period

研究代表者

合田 敏尚 (Goda, Toshinao)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：70195923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期後期に低栄養環境に曝されたラットでは、膵臓における発生・分化関連遺伝子の発現が低下し、インスリン分泌が低下するとともに、脂肪細胞において分化を制御する転写因子の発現が抑制され、インスリン感受性が低下することが示された。インスリン分泌能力の低い素因を持つ個体では、胎児期の低栄養は耐糖能異常をさらに悪化させることが示唆された。

胎児期に低栄養環境に曝露したラットの末梢血白血球を用い、血糖値の変動幅に対応した発現変動を示す遺伝子を探索したところ、炎症関連遺伝子であるIL-1、S100a8、S100a9、S100a11が、血糖上昇の履歴を示す感度の良いマーカー遺伝子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、胎児期の低栄養環境が、出生後の発達過程で膵臓ならびに脂肪組織における分化や成熟化に関わる遺伝子の発現の低下をもたらすため、糖負荷による急激な血糖上昇が起こりやすく、糖尿病のリスクを高めることを示したことと、胎児期の低栄養環境による血糖上昇の履歴を示す候補遺伝子として炎症性サイトカイン遺伝子を同定したことである。

本研究は、遺伝素因の点で膵臓からのインスリン分泌能力の低い日本人にとって、妊娠時の栄養管理と胎児期における低栄養の予防が、糖尿病の発症・進展リスクの抑制のために、いかに重要な根拠の一端を提示したものである。

研究成果の概要(英文)： We have demonstrated that the undernutrition in the late fetal period in the rat leads to a reduced expression of ontogeny/differentiation-related genes in the pancreas, and a repressed expression of the genes coding transcription factors related to adipocyte differentiation in the adipose tissue, which should be respectively responsible for reduced insulin secretion and insulin sensitivity. In an animal strain predisposed to a reduced capability of insulin secretion, the undernutrition in the fetal period made worse the postprandial hyperglycemia in adulthood.

In search of the genes responding closely to postprandial hyperglycemia in the peripheral leukocytes of rats subjected to undernutrition in the fetal period, we have shown that inflammation-related genes, e.g., IL-1b, S100a8, S100a9 and S100a11, are putatively sensitive marker genes reflecting a postprandial hyperglycemic history

研究分野：保健栄養学、栄養生理学

キーワード：胎児期低栄養 糖尿病 エピゲノム バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現代のわが国では、先進諸国の中では例外的に、低出生体重児の出生率が増加し続けており、妊娠中の女性の体重増加抑制志向がその一因であると考えられている。最近の疫学研究によって、胎児期の環境要因が、特定の遺伝子上に DNA のメチル化/脱メチル化などのエピジェネティックな変化をもたらすことを支持する知見が蓄積されてきた。

(2) 申請者らは、これまで、モデル動物ならびに健常者における食後血糖調節不良（食後高血糖）と関連する血液内生体指標（バイオマーカー）の網羅的な解析によって、末梢血白血球における炎症性サイトカイン（IL-1 など）およびインスリン抵抗性惹起因子（TNF など）の遺伝子発現の増大は、食後血糖調節不良を反映する鋭敏なバイオマーカーであることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) 胎児期低栄養モデルラットを用い、食後血糖上昇およびインスリン作用に関連する器官について、胎児期低栄養によって発現が大きく変動する遺伝子に焦点を当て、それらの遺伝子発現の変動機構を検討し、エピゲノム上の変化が予想される遺伝子を同定することを目的とした。さらに、末梢血白血球の炎症関連遺伝子の中から、血糖調節機能の低下の指標となる遺伝子上のエピゲノムマーカーを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Wistar 系の妊娠ラットの胎齢 10 日目から出産時まで、食事の摂取量を対照群の 50%となるように制限し、胎児期後期に低栄養環境に曝された仔ラット（胎児期低栄養群）を実験に用いた。対照群および胎児期低栄養群の仔ラットを標準固形飼料を用いて飼育し、出生後 13 日齢、20 日齢、27 日齢、42 日齢で、膵臓、肝臓、小腸および脂肪組織を採取し、各組織における発生・分化関連遺伝子およびインスリン作用の標的遺伝子の mRNA 発現量を、リアルタイム RT-PCR 法によって測定した。また、同様な方法で胎児期後期に低栄養環境に曝された仔ラットを、標準固形飼料あるいは高脂肪・高スクロース食を用いて 24 週齢まで飼育した後、グルコース経口負荷試験を行い、グルコース投与 180 分後までの血糖値と血漿インスリン濃度を測定した。

(2) 非肥満型 2 型糖尿病モデル GK ラットを用い、Wistar 系の妊娠ラットと同様に、胎齢 10 日目から出産時まで、食事の摂取量を対照群の 50%となるように制限し、胎児期後期に低栄養環境に曝された仔ラット（胎児期低栄養群）を作製した。出生後 35 日齢の時点で、グルコース経口負荷試験を行い、グルコース投与前および投与 180 分後の末梢血白血球における炎症関連遺伝子の mRNA 量を、リアルタイム RT-PCR 法によって測定した。42 日齢の時点で、膵臓および脂肪組織を採取し、発生・分化関連遺伝子およびインスリン作用の標的遺伝子の mRNA 発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 胎児期低栄養が成熟期における血糖調節機能に及ぼす影響：

Wistar 系の妊娠ラットの胎齢 10 日目から出産時まで、食事の摂取量を対照群の 50%となるように制限することによって胎児期後期に低栄養環境に曝された仔ラットを、標準固形飼料を用いて飼育し、23 週齢の時点でグルコース経口負荷試験を行ったところ、胎児期低栄養群では、対照群と比べて糖負荷後のインスリン分泌が低く、食後の血糖値が有意に高くなっていた。胎児期低栄養群におけるインスリン分泌能力の低下は、高脂肪・高スクロース食を摂取させた時には、特に顕著に認められた。

(2) 胎児期低栄養が成熟期の膵臓、肝臓および脂肪組織における遺伝子発現に及ぼす影響：

胎児期後期に低栄養環境に曝された仔ラットの膵臓における発生・分化関連遺伝子の発現を調べたところ、膵臓の発生・分化に必須である pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1) および neurogenin 3 (Ngn3) の遺伝子発現は、20 日齢および 27 日齢で有意に低下しており、膵臓重量も低下する傾向が見られた。24 週齢の時点では、対照群と比べて、肝臓における糖新生関連遺伝子の発現が有意に増大し、脂肪酸合成関連遺伝子の発現が有意に低下していた。また、胎児期低栄養群では、腸間膜脂肪組織において、脂肪細胞の分化に関与する転写因子 KLF5、KLF15、C/EBP α 、C/EBP β の発現が、対照群と比較して著しく低値を示し、脂肪酸合成関連遺伝子の発現が低下するとともに、炎症関連遺伝子の発現も増大していた。それゆえ、胎児期後期に低栄養環境に曝されたラットでは、脂肪細胞の分化を促進する転写因子の発現抑制を介して、腸間膜脂肪組織におけるインスリン感受性が低下しており、グルコースや脂肪酸の取り込み能力が低下していることが示唆された。

(3) 胎児期低栄養が成熟期の小腸における遺伝子発現に及ぼす影響：

胎児期後期に低栄養環境に曝された仔ラットの小腸における発生・分化関連遺伝子の発現を、Wistar 系ラットを用いて 13 日齢から 27 日齢まで調べたところ、小腸特異的な遺伝子発現に関与する転写因子 Cdx-2、HNF-1 α 、Foxa2、GATA4、核内受容体 TR、GR、ならびに転写共役因子 CBP、p300、GCN5 の発現が、対照群と比較して低値を示すとともに、糖質消化吸収関連遺伝子である SI、MGAM、トレハラーゼ、SGLT1 の遺伝子の発現が抑制された。胎児期低栄養により発現が著しく抑制された カロテン開裂酵素 (BCM01) 遺伝子をモデルにして検討したところ、胎児期に栄養制限を受けた 27 日齢のラットでは、小腸 BCM01 遺伝子近傍のヒストン H3 のアセチル化量と TR 1 の結合量が対照群よりも低下していることが明らかになった。

(4) 非肥満型 2 型糖尿病モデル GK ラットの膵臓および脂肪組織における遺伝子発現に及ぼす胎児期低栄養の影響：

妊娠した GK ラットの胎齢 10 日目から出産時まで、食事の摂取量を対照群の 50% となるように制限することによって胎児期後期に低栄養環境に曝された幼若 GK ラットにおいては、胎児期に栄養制限を受けた幼若 Wistar 系ラットと比べて、27 日齢における膵臓重量の低下が顕著であり、42 日齢では膵臓における発生・分化関連遺伝子の発現低下が顕著に認められるとともに、随時血糖が有意に高値を示した。また、胎児期に栄養制限を受けた GK ラットでは、腸間膜脂肪組織における脂肪細胞の分化・成熟化のマーカー遺伝子である PPAR α やアディポネクチンの遺伝子発現が著しく低下するとともに、脂肪酸合成関連遺伝子の転写因子である SREBP1 やグルココルチコイドホルモン受容体 GR、およびインスリン作用の標的である脂肪酸合成酵素やリポタンパク質リパーゼの遺伝子発現が著しく低下した。それゆえ、インスリン分泌能力が低い個体の場合には、胎児期の低栄養による膵臓機能の発達抑制と脂肪組織の分化・成熟化の抑制により、耐糖能異常が悪化する可能性が示唆された。

(5) 胎児期低栄養によって発現が変動する末梢血白血球における血糖上昇履歴マーカーの探索：

妊娠ラットの食事摂取量を妊娠 10 日目から出産時まで対照群の 50% となるように制限することによって胎児期後期に低栄養環境に曝された Wistar 系および GK の仔ラットを用い、5 週齢の時点でグルコースを経口負荷し、末梢血白血球において 3 時間後に発現が増大した炎症関連遺伝子について、発現量の増大幅が、胎児期低栄養に曝露した GK ラットにおいて特に顕著に見られる遺伝子を探索した。その結果、IL-1 β 、S100a8、S100a9、S100a11 の遺伝子が、血糖上

昇幅に対応した典型的な発現変動を示しており、これらが血糖上昇の履歴を示す感度の良いマーカー候補遺伝子である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- 1) Mochizuki, K., Osaki, A., Inamochi, Y., Goda, T., The induction of histone H3K4 methylation on the SI gene correlates with SI mRNA levels in enterocyte-like Caco-2 cells. *OBM Genetics*, 査読有, 10: 21926, 2018, doi: 10.21926/obm.genet.1804046.
- 2) Goda, T., Honma, K., Molecular regulations of mucosal maltase expressions. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 査読有, 66 (suppl 3): S14-S17, 2018, doi: 10.1097/MPG.
- 3) Sakurai, N., Inamochi, Y., Inoue, T., Hariya, N., Kawamura, M., Yamada, M., Dey, A., Nishiyama, A., Kubota, T., Ozato, K., Goda, T., BRD4 regulates adiponectin gene induction by recruiting the P-TEFb complex to the transcribed region of the gene. *Sci. Rep.* 査読有, 7: 11962, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12342-2.
- 4) Yamauchi, H., Honma, K., Mochizuki, K., Goda, T., Regulation of the circadian rhythmic expression of Sglt1 in the mouse small intestine through histone acetylation and the mRNA elongation factor, BRD4-P-TEFb. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 82: 1176-1179, 2017, doi: 10.1080/09168451.2018.1451743.
- 5) Honma, K., Kamikubo, M., Mochizuki, K., Goda, T., Insulin-induced inhibition of gluconeogenesis genes, including glutamic pyruvic transaminase 2, is associated with reduced histone acetylation in a human liver cell line. *Metabolism*, 査読有, 71: 118-124, 2017, doi: 10.1016/j.metabol.2017.03.009.
- 6) Yamada, A., Honma, K., Mochizuki, K., Goda, T., Brd4 regulates fructose-inducible lipid accumulation-related genes in the mouse liver. *Metabolism*, 査読有, 65, 1478-1488, 2016, doi: 10.1016/j.metabol.2016.07.001.
- 7) Inamochi, Y., Dey, A., Nishiyama, A., Kubota, T., Ozato, K., Goda, T., Mochizuki, K., Transcription elongation factor Brd4-P-TEFb accelerates intestinal differentiation-associated SLC2A5 gene expression. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 査読有, 7: 150-156, 2016, doi: 10.1016/j.bbrep.2016.05.016.
- 8) Honma, K., Mawatari, R., Ikeda, M., Mochizuki, K., Goda, T., Fasting during the suckling-weaning transient period of rats induces inflammatory gene expression in the adipose tissue and peripheral leukocytes. *Nutrition*, 査読有, 32: 1268-1274, 2016, doi: 10.1016/j.nut.2016.03.011.
- 9) Ikeda, M., Honma, K., Mochizuki, K., Goda, T., Fasting for 3 days during the suckling-weaning transient period in male rats induces metabolic abnormalities in the liver and is associated with impaired glucose tolerance. *Eur. J. Nutr.*, 査読有, 55: 1059-1067, 2016, doi: 10.1007/s00394-015-0919-9.
- 10) Honma, K., Hikosaka, M., Mochizuki, K., Goda, T., Loss of circadian rhythm of circulating insulin concentration induced by high-fat diet intake is associated with disrupted rhythmic expression of circadian clock genes in the liver. *Metabolism*, 査読有, 65: 482-491, 2016, doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.003.

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1) 合田敏尚ら、「インスリン抵抗性に対する栄養学的アプローチ」第 72 回日本栄養・食糧学会大会、2018 年 5 月、岡山
- 2) 合田敏尚ら、「非肥満型 2 型糖尿病モデル GK ラットにおける膵臓機能に及ぼす胎児期低栄養の影響」第 61 回糖尿病学会年次学術集会、2018 年 5 月、東京
- 3) 金芳如ら、「胎児期低栄養モデルラットにおける末梢白血球の炎症性サイトカイン発現の変化」第 61 回糖尿病学会年次学術集会、2018 年 5 月、東京
- 4) 望月和樹ら、「新規転写伸長エピゲノム調節機構と胎生期低栄養による生活習慣病発症との関連」第 41 回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、2018 年 11 月、横浜
- 5) 瀧賀祐生ら、「末梢白血球における炎症性サイトカイン遺伝子周辺のメチル化 DNA 検出方法の検討」第 72 回日本栄養・食糧学会大会、2018 年 5 月、岡山
- 6) 金芳如ら、「ラットの脂肪組織の遺伝子発現に及ぼす胎児期低栄養の影響」第 75 回日本栄養・食糧学会中支部大会、2018 年 11 月、静岡
- 7) Goda, T., Epigenetic alterations of inflammation biomarkers related with the onset and development of diabetes and metabolic diseases. The 12th China-Japan International Symposium, Feb. 2017, Hangzhou, China
- 8) 久保田美成ら、「非肥満型 2 型糖尿病モデル GK ラットにおける膵臓機能に及ぼす胎児期低栄養の影響」第 6 回日本 DOHaD 学会学術集会、2017 年 8 月、東京
- 9) Honma K. et al., Fasting during the suckling-weaning transient period in rats induces metabolic abnormalities in adulthood. 21st International Congress of Nutrition (ICN2017), Oct. 2017, Buenos Aires, Argentina
- 10) Goda T. et al., Plasma alanine aminotransferase (ALT) activity is a reliable biomarker for the risk of insulin resistance and diabetes predisposition. 21st International Congress of Nutrition (ICN2017), Oct. 2017, Buenos Aires, Argentina
- 11) 松本氣寧子ら、「胎児期低栄養が哺乳-離乳期の小腸消化吸収関連遺伝子発現に及ぼす影響」第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月、兵庫
- 12) 本間一江ら、「ヒストンアセチル化を介した小腸消化吸収関連遺伝子の転写制御」第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月、兵庫
- 13) 今井千裕ら、「好中球エラスターゼ活性阻害剤の食後高血糖動物モデルへの投与は動脈硬化関連遺伝子の発現を低下させる」第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月、京都
- 14) 望月和樹ら、「Relations between epigenetic regulation by dietary habits and DOHaD」第 56 回日本先天異常学会学術集会(シンポジウム)、2016 年 7 月、兵庫
- 15) 本間一江ら、「発達期の小腸における カロテン代謝関連酵素発現への胎児期低栄養の影響」第 5 回日本 DOHaD 研究会学術集会、2016 年 7 月、東京
- 16) Matsumoto K. et al., Effect of prenatal undernutrition on BCMO1 gene expression in rat jejunum at suckling-weaning period. The 3rd International Conference on Pharma and Food, Nov. 2016, Shizuoka, Japan
- 17) Goda T., Molecular regulations of mucosal maltase expressions. Starch Digestion Consortium Workshop (Complimentary Starch Feeding of the Young Child), Dec. 2016, Houston, USA

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Mochizuki, K., Hariya, N., Honma, K., Goda, T, Springer International Publishing AG, Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics, 2018.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/nutphys/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合田 敏尚 (GODA, Toshinao)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：70195923

(2) 研究分担者

本間 一江 (HONMA, Kazue)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80724765