

令和元年6月17日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06652

研究課題名(和文)母体の栄養環境を介した子のエピゲノム記憶遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of epigenetic memory gene in different maternal nutritional status

研究代表者

辻本 和峰 (TSUJIMOTO, Kazutaka)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20801525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期から乳児期に過栄養および低栄養に曝された児は、成長後に肥満や糖尿病、脂肪肝を発症する。この機構を解明するため、周産期に高脂肪食を摂餌した母マウスおよび摂餌制限を行った母マウスの産仔の肝臓を用いて、DNAメチル化変化を網羅的に解析した。異なる母体栄養環境が、仔マウスの肝臓において脂質合成遺伝子のDNAメチル化変化を介して発現を制御し、将来の脂肪肝形成に寄与してい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

乳仔期の栄養環境の差異が異なった代謝経路の遺伝子のDNAメチル化および発現に影響を与え、それが長期に維持されて、成獣期に肥満という同じ表現型をもたらすと考えられた。本研究成果は、DOHaD仮説の分子機構を明らかにするだけでなく、胎児期・乳児期の至適な栄養状態の分子生物学的理解に大きく貢献し、将来的に生活習慣病に対する究極の「先制医療」の開発につながることを期待された。

研究成果の概要(英文)：Maternal over-nutrition and under-nutrition during perinatal period may affect the development of obesity, diabetes, and fatty liver disease in adult offspring. To clarify the mechanism, dams were fed high fat diet or low calorie diet from pregnancy to lactation, and then we performed genome-wide analysis of DNA methylation in the liver from offspring. Different maternal nutritional status could regulate the fatty acid biosynthesis gene expression through DNA methylation change in neonatal liver, and these mechanism may contribute to developing fatty liver disease in later life.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 母体栄養環境 DOHaD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疫学的調査から、胎生期から乳児期の栄養環境変化が成人期の肥満や生活習慣病発症に影響する DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説 (Science 305: 1733-1736, 2004) が提唱され、その分子機構として DNA メチル化による代謝関連遺伝子発現制御が推測されている。これまで DOHaD 仮説を模したさまざまな動物実験が行われており、マウスは胎仔期から乳仔期に過栄養であっても低栄養であっても成獣期に肥満や脂肪肝を呈することが知られているが、その成立過程と分子機構は不明である。我々は先行研究において、マウス肝臓の遺伝子の DNA メチル化変化を経時的かつ網羅的に解析し、変化が最も大きい時期は乳仔期であることを見出している (Ehara T, Tsujimoto K et al. Diabetes 64:775-784, 2015)。この知見に基づき、二つの異なる栄養環境 (過栄養もしくは低栄養) が乳児期の肝臓において代謝関連遺伝子に共通した DNA メチル化変化を生じ、それが成長後の肥満や脂肪肝形成に影響しているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

二つの異なる母体栄養環境 (過栄養もしくは低栄養) が、乳仔期肝臓の遺伝子の DNA メチル化状態および発現にどのような影響を与えるのか次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により把握する。さらに各状態で育成した産仔マウスの成獣期に同様の解析を行い、乳仔期に受けた環境変化の影響が長期に維持されるか、また成長後の肥満や脂肪肝形成に影響するかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および飼料

過栄養群については、雌 C57BL/6J マウスに妊娠 7 週間前より高脂肪食 (40kcal%脂肪含有) で産仔の離乳まで飼育した。低栄養群については、研究協力者である伊東宏晃教授 (浜松医科大学産科婦人科) が確立したものをを用いた (*Sci Rep* 5:16867, 2015)。

さらに過栄養群の産仔は、離乳後 4 週齢から 14 週齢まで高脂肪食 (40kcal%脂肪含有) を負荷し、14 週齢で肝臓を採取して解析を行った。

(2) 血清糖質および脂質プロファイルの解析

血清トリグリセライド濃度、血清総コレステロール濃度、肝臓トリグリセライド含有量は酸素比色法により富士ドライケム 7000V を用いて測定した。また血清インスリン濃度はマウスインスリン測定キット (森永生化学研究所) を用いて測定した。

(3) 母乳中の脂肪酸分析

過栄養群および低栄養群の産仔マウス 16 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た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

過栄養群および低栄養群の産仔マウス 16 日齢の肝臓は、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 aRNA 法 (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て使用した。

(5) 網羅的 DNA メチル化解析

CpG rich なプロモーター領域を中心にシトシンのメチル化を 1 塩基の解像度でゲノムワイドに効率的に調べる方法である RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) 法によって DNA メチル化解析を行った。DNA を制限酵素で水解して断片化し、アダプター負荷、精製後 bisulfite 処理を行い、RRBS ライブラリーを作製した。

(6) 5 ヒドロキシメチル化シトシン (5hmC) の定量解析

胎仔期 (胎生 16 日齢) 新生仔期 (2 日齢) 乳仔期 (16 日齢) 離乳後 (4 週齢) 成獣期 (14 週齢) のマウス肝臓より、ゲノム DNA をプロテインアーゼ K 法で精製し、5hmC の定量解析を行った。実験手法は、研究協力者である幸田尚准教授 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 エピジェネティクス分野) が確立したものをを用いた。

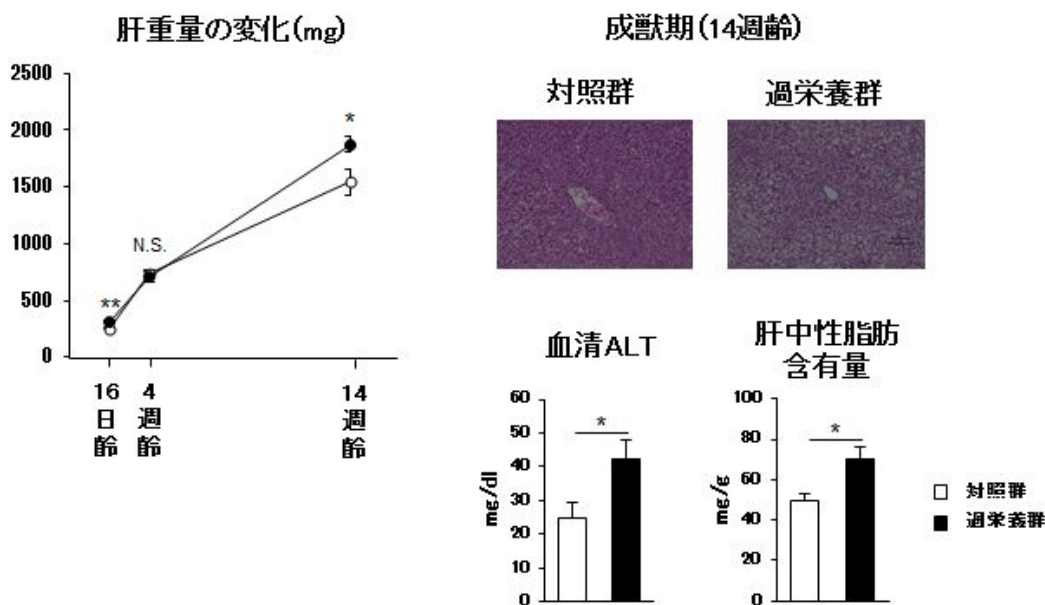
4. 研究成果

(1) 母体過栄養・低栄養モデルにおける代謝表現型解析

胎仔期~乳仔期における二つの異なる栄養環境が、成長後の代謝表現型にどのような影響を与えるのか解析した。過栄養群は、乳仔期 (16 日齢) に対照群と比較して体重および肝重量の増加、インスリン抵抗性の増大が認められ、離乳後 (4 週齢) には両群における体重および感

重量の差は一旦認められなくなった。成獣期（14週齢）には対照群と比較して肝重量の増加が認められ、血清総コレステロール濃度の増加、血清ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）の増加、肝臓における中性脂肪含有量の増加が認められた（図1）。一方で、低栄養群は、乳仔期（16日齢）に対照群と比較して体重および肝重量の減少が確認された。成獣期（17週齢）には対照群と比較して肝重量の増加が認められ、肝臓における中性脂肪含有量の増加が認められた。これらから、栄養環境の違いが乳仔期において肝臓に強い影響を与えること、また成獣期の脂質代謝異常、脂肪肝形成に寄与することが示唆された。

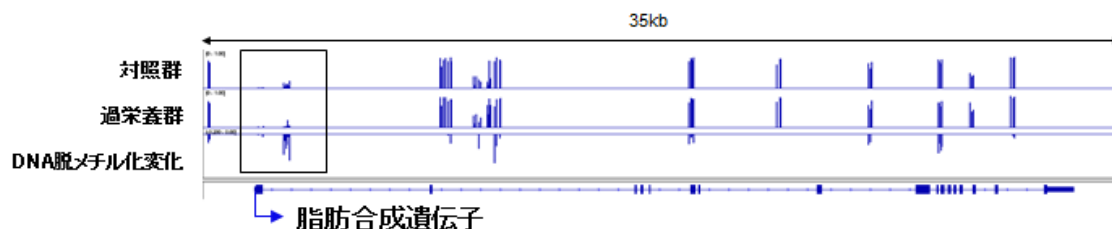
図1．母体過栄養モデルの代謝表現型



(2) 母体過栄養・低栄養モデルにおけるDNAメチル化および遺伝子発現の網羅解析

続いて、胎仔期～乳仔期における二つの異なる栄養環境が、肝臓の遺伝子のDNAメチル化および遺伝子発現にどのような変化を与えるのか網羅的に解析した。過栄養群と対照群の乳仔期（16日齢）の肝臓を用いて、網羅的DNAメチル化解析（RRBS法）および網羅的遺伝子発現解析（DNAマイクロアレイ）を行い、両解析から得られたデータを組み合わせた。その結果、転写開始点近傍（±2000塩基対）でDNA脱メチル化変化が生じた遺伝子ほど発現量の変化が大きいことが判明した。さらにこの遺伝子群に絞って解析を進めると、過栄養群でDNAメチル化が低下しかつ発現が増加した遺伝子群は130遺伝子あり、脂質合成に関連する遺伝子群が多く抽出された。抽出された群の中で代表的な遺伝子については、個別にIGV(Integrative Genomics Viewer)による可視化(図2)およびバイサルファイトシーケンス法によるDNAメチル化率の算出を行った。

図2．脂質合成遺伝子のDNA脱メチル化変化



その結果、脂質合成関連遺伝子の有意なDNAメチル化低下（過栄養群 4.2%、対照群 9.3%）を確認した。リアルタイムPCR法による遺伝子発現解析では過栄養群で有意な発現上昇が認められた。一方で、低栄養群でDNAメチル化が低下し、かつ発現が増加した遺伝子群は175遺伝子あり、脂質代謝に関連する遺伝子群が多く抽出された。これらから、異なる母体栄養環境の違いが、乳仔肝において転写開始点近傍の領域を中心にDNAメチル化変化をもたらし、それが脂質関連遺伝子の発現亢進に寄与している可能性が示唆された。

(3) 過栄養および低栄養の母体から供給される乳汁の脂肪酸組成解析

特定の脂肪酸が乳仔肝にDNAメチル化変化をもたらすのかを検証するため、過栄養および

低栄養の母体から供給される乳汁の脂肪酸組成をガスクロマトグラフ質量分析計を用いて解析した。その結果、過栄養群では対照群と比較してステアリン酸(過栄養群 8.1%、対照群 3.1%)、オレイン酸(過栄養群 41.6%、対照群 25.0%)、リノレン酸(過栄養群 0.77%、対照群 0.57%)の有意な上昇が認められた。一方で、低栄養群では対照群と比較してオレイン酸(低栄養群 19.1%、対照群 24.0%)、アラキドン酸(低栄養群 0.41%、対照群 0.63%)の有意な低下が認められた。これらから、母獣から供給されるオレイン酸によって乳仔肝における DNA メチル化変化が誘発された可能性が示唆された。

(4) 成獣期における DNA メチル化および遺伝子発現の網羅解析

乳仔期に受けた環境変化の影響が成獣期まで長期に維持されるかを検討するため、過栄養マウスモデルにおいて成獣期に再度 DNA メチル化の網羅的解析を行った。その結果、乳仔期(16日齢)においても成獣期(14週齢)においても、DNA 脱メチル化変化が生じた遺伝子は 627 遺伝子あり、インスリン抵抗性やインスリンシグナルに関連する遺伝子群が抽出された。またこの解析結果の中で、乳仔期に DNA 脱メチル化変化および発現変化を生じていた脂質代謝関連遺伝子の一部は、成獣期においても DNA 脱メチル化変化を生じていた。これらの遺伝子群は DNA メチル化変化が長期に維持されているエピゲノム記憶遺伝子であると推測された。

(5) 胎仔期から成獣期における 5 ヒドロキシメチル化シトシン (5hmC) の定量解析

DNA 脱メチル化の形成には、DNA 脱メチル化酵素である TET (Ten-eleven translocation) の関連が推測される。異なる栄養環境が乳仔肝に DNA 脱メチル化変化を形成する分子機序を明らかにするため、TET による DNA 脱メチル化反応を反映する 5hmC の定量解析を行った。その結果、胎仔期から成獣期における肝臓の中で、乳仔期で最も 5hmC が増加していることが確認され、この時期において TET による DNA 脱メチル化反応が強く生じていることが判明した。

以上から、異なる母体栄養環境が乳仔肝において DNA メチル化変化を生じて脂質代謝遺伝子発現を制御し、将来の脂肪肝形成に寄与していることが示唆された。5hmC の定量解析の結果は、栄養環境の変化を介した DNA 脱メチル化反応が最も乳仔期に生じていることを示しており、肝臓における DNA メチル化変化が最も大きい時期は乳仔期であるという我々の先行研究の結果に一致していた。そして成獣期における DNA メチル化の網羅的解析の結果から、乳仔期に栄養環境を介して生じた脂質代謝遺伝子の DNA メチル化変化の一部は、成獣期まで長期に維持されていることが明らかになった。また脂肪酸解析の結果からは、乳汁に含まれる不飽和脂肪酸が DNA メチル化を介して産仔の生活習慣病発症の罹患性を決定する重要な因子であることが示唆された。この知見は、乳児期に摂取する脂肪酸の量に介入することで長期的に肥満や生活習慣病になりにくい体質を獲得することが可能であることを示しており、新たな生活習慣病治療法の創出につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Xunmei Yuan, Kazutaka Tsujimoto, Koshi Hashimoto, Kenichi Kawahori, Nozomi Hanzawa, Miho Hamaguchi, Takami Seki, Makiko Nawa, Tatsuya Ehara, Yohei Kitamura, Izuho Hatada, Morichika Konishi, Nobuyuki Itoh, Yoshimi Nakagawa, Hitoshi Shimano, Takako Takai-Igarashi, Yasutomi Kamei, and Yoshihiro Ogawa. Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. *Nature Communications* 査読有 9: 636, 2018.

DOI: 10.1038/s41467-018-03038-w.

2. Kenichi Kawahori, Koshi Hashimoto, Xunmei Yuan, Kazutaka Tsujimoto, Nozomi Hanzawa, Miho Hamaguchi, Saori Kase, Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, Yasuo Nakajima, Nobuyuki Shibusawa, Masanobu Yamada, and Yoshihiro Ogawa. 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.

DOI: 10.1089/thy.2017.0331.

3 . Koshi Hashimoto, Eijyun Nishihara, Masako Matsumoto, Shunichi Matsumoto, Yasuyo Nakajima, Kazutaka Tsujimoto, Hajime Yamakage, Noriko Satoh-Asahara, Noh Jaeduk Yoshimura, Koichi Ito, Akira Miyauchi, Masatomo Mori, Masanobu Yamada, and Yoshihiro Ogawa. Sialic Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lectin1 as a Novel Predictive Biomarker for Relapse in Graves' Disease: A Multicenter Study. *Thyroid 査読有* 28: 50-59, 2018.

DOI: 10.1089/thy.2017.0244.

〔学会発表〕(計3件)

- 1 . 辻本和峰、橋本貢士、袁勲梅、川堀健一、榛澤望、小川佳宏、山田哲也「乳仔期マウス肝臓のFibroblast growth factor 21(FGF21)遺伝子のエピゲノム記憶は成獣期の肥満を改善する」第23回アディポサイエンス・シンポジウム, 2018
- 2 . 辻本和峰、橋本貢士、袁勲梅、川堀健一、榛澤望、小川佳宏、山田哲也「Fibroblast growth factor 21(FGF21)遺伝子のエピゲノム記憶は将来の肥満を改善する」第39回肥満学会, 2018
- 3 . 辻本和峰、橋本貢士、袁勲梅、川堀健一、榛澤望、小川佳宏、山田哲也「母体栄養環境による糖脂質代謝のエピゲノム制御」第92回日本内分泌学会学術総会, 2019

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：橋本 貢士

ローマ字氏名：(HASHIMOTO, Koshi)

研究協力者氏名：伊東 宏晃

ローマ字氏名：(ITO, Hiroaki)

研究協力者氏名：中林 一彦

ローマ字氏名：(NAKABAYASHI, Kazuhiko)

研究協力者氏名：幸田 尚

ローマ字氏名：(KOHDA, Tadashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。