

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10424

研究課題名(和文) 母の栄養環境が誘導する仔のエピジェネティックな代謝変化の機構解明と制御

研究課題名(英文) Elucidation and control of changes in epigenetic metabolism of offspring induced by the mother's nutritional environment

研究代表者

齋藤 健 (Saito, Takeshi)

北海道大学・保健科学研究所・客員研究員

研究者番号：40153811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：母親および仔ラットに高脂肪食を与えた高脂肪食摂取群では、肝臓中トリグリセリド(TG)濃度の有意な高値と血漿中TGの有意な低値を示すこと、原因として血中からの取込の促進と供給の抑制、TG合成の促進および鉄の蓄積と活性酸素の増加が関与することを示した。その機序にオートファジー機能の停滞が関与すること、授乳期母親のGTE摂取がこれらの機能低下を改善することを明らかにした。妊娠期母親への低タンパク質曝露は、仔の肝臓中の脂肪酸合成酵素の発現を低下させること、その背景には転写因子SREBP1cの活性低下があること、授乳期母親へのレスベラトロール投与は、FASの発現量を回復させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、妊娠期および授乳期の母親のエネルギー過剰摂取あるいは低エネルギー摂取は、成熟した子の肝臓中の脂肪酸合成異常や脂質の蓄積異常を主とする長期的な代謝異常を引き起こすこと、授乳期母親の緑茶抽出物やレスベラトロール等のポリフェノールの継続的な摂取は、この脂質代謝異常を軽減する働きがあることが明らかになり、母親の過食や低栄養によるエピジェネティックな作用と授乳期のポリフェノール摂取による改善効果に関する基礎的かつ重要な知見を得ることができた。この成果は、母親の栄養環境による次世代への負のエピジェネティックな変化に対する制御法および予防法の開発につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：The high-fat diet fed to mothers and pups in the high-fat diet group showed significantly higher levels of triglyceride (TG) in the liver and significantly lower levels of TG in the plasma, and that the causes involved accelerated uptake from the blood and suppressed supply, accelerated TG synthesis, and increased iron accumulation and reactive oxygen species. We found that stagnation of autophagy function is involved in the mechanism, and that GTE intake by lactating mothers ameliorates these dysfunctions.

Low protein exposure to gestational mothers decreased the expression of fatty acid synthase FAS in the liver of their pups, which was associated with decreased activity of the transcription factor SREBP1c, and administration of resveratrol to lactating mothers restored the expression level of FAS.

研究分野：衛生学および公衆衛生学分野関連:実験系を含む

キーワード：エピジェネティクス 低栄養 高脂肪食 ポリフェノール 糖・脂質代謝 オートファジー 次世代影響

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病、肥満、高血圧症、動脈硬化症などの生活習慣病の急激な増加が、世界的規模の深刻な社会問題となっている。これらの疾患の発症には、遺伝子要因と共に、食生活や運動等の環境因子が密接に関わっている。生活習慣病は典型的な多因子疾患でありその発症機構は複雑であるが、最近になって発達期の栄養要因等の環境要因が、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の変化(エピジェネティックな変化)とその影響が長期に継続する「エピゲノム記憶」を介して、成熟期以降の生活習慣病の発症や老化促進に関与していることが明らかになってきた。

妊娠期の母親の栄養状態は、母体だけでなく母体を通して胎生期、乳幼児期の心身の発育・成長や、成人期以降のメタボリックシンドローム、生活習慣病の発症や老化促進にも密接に関連している。妊娠中に母親が低栄養状態は、食料の乏しい発展途上国だけでなく、母親の偏食や痩せ願望を背景にして先進諸国でも多数認められている。一方で、妊娠期の母親の栄養の過剰摂取、特に糖分の過剰摂取による妊娠期糖尿病の発症や、その子供世代の脂質代謝異常などのメタボリックシンドロームの急激な増加が、アジア地域で深刻な社会問題となっている。

発達期の種々なストレスによる成人期以降の生活習慣病の発症や老化促進への影響を把握し、かつ予防するためには、エピジェネティックな変化の追求のみでは不十分で、その影響として脂質代謝・糖代謝・エネルギー代謝や密接に関連する活性酸素代謝、微量元素代謝など、生命や健康維持の根幹を成す代謝機構に対する影響を多角的かつ総合的に検討し、これらの代謝変動がどのように障害や疾病発現に至るのかを明らかにする必要がある、本研究ではここに焦点を当てて研究を推進しようとするものである。

2. 研究の目的

本研究では、発達期の栄養環境の異常によるストレスが成人期以降に及ぼす影響を、エピジェネティックな変化と「エピゲノム記憶」を介した脂質・糖・エネルギー代謝変動、特に、脂質代謝の制御を司るセンサー分子の機能あるいは感受性の変化から評価する。さらに、周産期における母親へのポリフェノール投与による仔の脂質・糖・エネルギー代謝異常の改善や活性酸素代謝や必須微量元素代謝の制御効果を明らかにし、妊娠期の母親の栄養環境の変化による仔の成人後の脂質代謝異常および生活関連疾患の発症を防ぐ物質を見つけ出し、その機能性物質を用いた制御法および予防法の開発を目指す。そのために、以下に示す研究を推進した。

(1)研究1では、周産期の母親および離乳後に高脂肪食(HFD)を持続的に与えられた雄性仔ラットの肝臓の脂質代謝とそれに伴う微量元素代謝の変動を明らかにする。さらに、授乳期における母親の緑茶抽出物(GTE)摂取が上記仔ラットの肝臓脂質代謝および微量元素代謝におよぼす長期的な効果について明らかにする。

(2)研究2では、肝臓における脂質代謝に重要な役割を担うオートファジー機能に、母ラットおよび仔ラットの長期高脂肪食摂取が、仔ラットの成熟期におけるオートファジー機能へ与える影響とこれに対する母ラットの授乳期におけるGTE摂取の効果について明らかにする。

(3)研究3では、妊娠期の母ラットを低タンパク状態に曝露した時の成熟仔ラットの脂肪酸合成経路の変動を明らかにすること、低タンパク状態による脂肪酸合成経路の変動に対するレスベラトロールの改善効果とそのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)研究1および研究2の対象

実験にはWistar系ラットを用い、母ラットの妊娠期(3週間)および授乳期(3週間)に高脂肪食(45%fat)を与え、離乳後の雄性仔ラットに高脂肪食(45%fat)を与えた群をFFF群、母ラットの妊娠期に高脂肪食、授乳期には緑茶抽出物含有高脂肪食(45%fat + 0.24%GTE)を与え、離乳後の雄性仔ラットに高脂肪食を与えた群をFGF群とした。対照群として母ラットの妊娠期および授乳期、離乳後の雄性仔ラットに通常食(13%fat)を与えたものをCCC群とした。雄性仔ラットを51週齢でエーテル麻酔下屠殺し、血液および肝臓を採取した。

(2)研究3の対象

妊娠期に8%タンパク食を、授乳期に20%タンパク食を与えた群をLPC群、妊娠期に8%タンパク食を、授乳期に20%タンパク食に加えレスベラトロール(20 mg/kg/day)を経口投与させた群をLPR群、妊娠期、授乳期に20%タンパク食を与えた群をCC群とした。雄性仔ラットに離乳後に通常食を与え、36週齢でエーテル麻酔下屠殺し、血液および肝臓を採取した。

(3)測定および解析方法

肝臓中および血漿中の中性脂肪 (TG) 濃度は LabAssay kit を用いて測定した。肝臓中の脂質合成タンパク質および脂質代謝に関連するタンパク質の測定にはウェスタンブロット法を用いて行った。同様に、オートファジー関連タンパク質の測定はウェスタンブロット法を用いて行った。肝臓中の微量元素の測定は、ICP-MS を用いて行った。酸化ストレスマーカーとして、8-OHdG の測定は kit を用いて行った。

統計解析は一元配置分散分析の後、多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

研究 1

(1)肝臓および血漿中の中性脂肪 (TG)

対照 (CCC) 群と比較して、肝臓中の TG 濃度は、高脂肪食 (FFF) 群で有意な高値を示した ($p < 0.05$)。一方、FFF 群の血漿 TG 濃度は、CCC 群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。しかし、高脂肪食 + GTE 食 (FGF) 群では、CCC 群と有意な差は認められなかった。

(2)51 週齢の雄仔ラットの肝臓中の脂肪合成関連タンパク質の発現

脂肪酸合成に関わる酵素群 ACC、FAS、SREBP-1 は、FFF 群で CCC 群と比較して有意な低値を示したが、FGF 群で回復傾向が見られた。また、TG の合成に関わるタンパク質では、食事由来の脂肪酸を基質として TG を合成する DGAT-1 に関しては、FFF 群で有意な高値を示し、FGF 群では正常化していた。体内で合成した脂肪酸を基質として TG を合成する DGAT-2 は FFF 群、FGF 群共に有意に低値を示した。

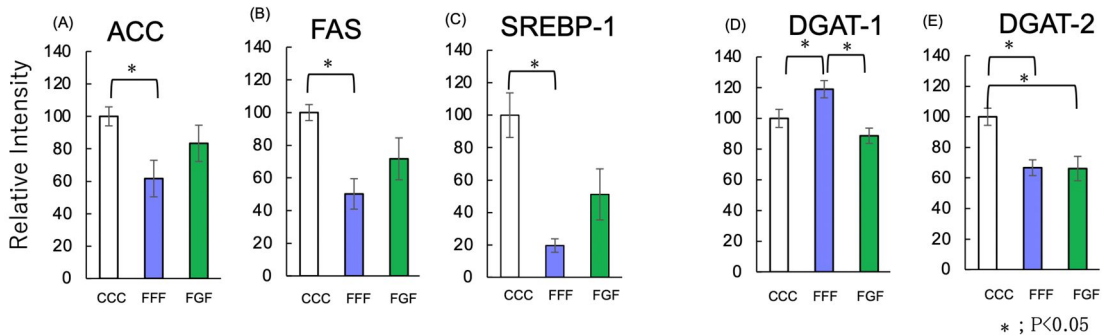


図1 HFD および HFD+GTE 摂取による仔ラットの肝臓中の脂肪合成関連タンパク質の変動

(3)51 週齢の雄仔ラットの肝臓中の脂質代謝関連タンパク質の発現

脂質とタンパク質とを結合させて血中への供給を行う MTP 量は、FFF 群で CCC 群と比較して低下傾向、FGF 群と比較して有意な低値を示した。

血中から肝臓への脂質の取り込みを行う LDL レセプターは CCC 群および FGF 群と比較して FFF 群で有意な高値を示した。胆汁酸合成に重要な CYP7A1 量には 3 群間に有意な差は認められなかった。

(4) 51 週齢の雄仔ラットの肝臓における微量元素濃度および DNA の酸化ストレスマーカー

肝臓中の Fe 濃度は、CCC 群と比較して FFF 群および FGF 群において有意な高値が認められ、一方 Mn 濃度は、対照群と比較して FFF 群および FGF 群において有意な低値が認められた。FFF 群の肝臓の DNA の酸化ストレスマーカーの 8-OHdG 量が CCC 群と比較して有意な高値を示した。

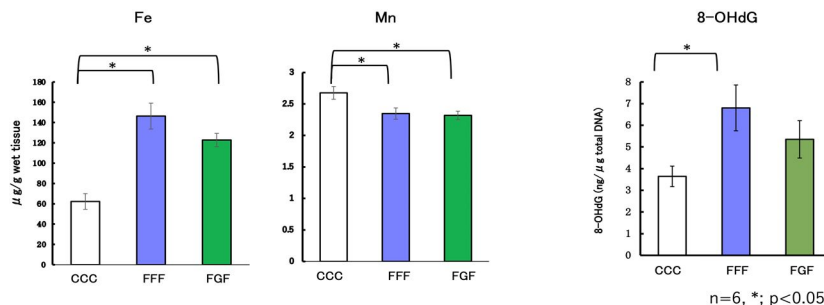


図2 仔ラット肝臓中の微量元素 (Fe, Mn) および酸化ストレスマーカーの変動

以上より、FFF 群において、食事由来の脂肪酸から脂肪合成の促進、脂質の肝臓への取り込みの促進、肝臓からの脂質の供給の低下が引き起こされていること、さらには、肝臓での脂肪酸

合成は抑制されていることが明らかになった。このことは、FFF 群では、食事由来の脂肪が肝臓に顕著に蓄積するよう脂質代謝が変化したことを示している。一方、FGF 群では、FFF 群と同様な HFD を摂取しているにもかかわらず、このような代謝異常は抑えられていた。このことは、授乳期の GTE 摂取が成人期の仔の脂質代謝異常を制御したと考えられる。従って、授乳期母親のポリフェノール摂取が子どもの肝臓の保護作用を示すこと、脂質代謝異常を含む疾患を長期的に予防する可能性が示された。

また、FFF 群および FGF 群で肝臓に鉄の過剰蓄積が認められたことから、HFD は肝臓での過酸化反応を増加させることが懸念された。本研究により FFF 群で酸化ストレスマーカーの 8-OHdG が有意に増加していることが明らかとなり、Fe の蓄積が酸化ストレス増加の一因として、肝臓の病態の増悪因子として作用していることが示唆された。

研究 2

(1) 不要物質を運搬するタンパク質の発現

不要物質を隔離膜へと運搬しオートファジーにより分解されるリン酸化 p62 (p-p62) 量が FFF 群において、CCC 群および FGF 群と比較して有意な高値を示した。

(2) オートファゴソーム形成に関わるタンパク質の発現

オートファゴソーム形成に重要な役割を担う Beclin1、Atg7 量および LC3-II に 3 群間で有意差は認められなかった。

(3) オートファゴソームとリソソームの融合に関わるタンパク質の発現

FFF 群において CCC 群と比較して、オートファゴソームとリソソームの融合の際に重要な SNARE タンパク質の Lamp2、vamp8、snap29 量はともに有意な高値を示した。一方、FGF 群は snap29 が有意な高値を示した以外は CCC 群と比較して有意な変動は認められなかった。

(4) オートファジー機能の制御に関わるタンパク質の発現

オートファジー機能の促進に関わるタンパク質である O-GlcNAc transferase (OGT) は、FFF 群において、CCC 群と比較して有意な低値を示したが、オートファジー機能の抑制に関わるタンパク質である O-GlcNAcase (OGA) は有意な変動を示さなかった。

表1 HFD および HFD+GTE 摂取による仔ラットの肝臓中のオートファジー関連タンパク質の変動

Transport				Autophagosomes						Fusion						Regulation					
p-p62		p62		Beclin1		atg7		LC3-II		Lamp2		Snap29		Vamp8		Stx7		OGT		OGA	
FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF	FFF	FGF
↑	↑	↑	↓							↑		↑	↑	↑	↓			↓			

↑: Significant changes compared to CCC group.

↑: Significant changes between FFF and FGF group.

以上より、FFF 群におけるリン酸化 p62 の増加は、オートファジーによる不要物の分解が滞っていることを示し、これが FFF 群の肝臓に中性脂肪が蓄積する原因の一つである可能性が示唆された。FFF 群でのオートファジー機能の停滞の作用機序は、食事ストレス刺激にオートファゴソーム形成が反応しないため、オートファゴソームとリソソームのバランスがとれず、これらの融合によるオートリソソームの形成が阻害されることに起因すると考えられた。その原因として、オートファゴソーム蛋白質のセリンまたはスレオニン残基に N-アセチルグルコサミンを付加し、肝臓でのオートファゴソーム形成を促進する O-GlcNAc transferase (OGT) の発現が HFD により低下することによることが示唆された。

GTE 投与群では、OGT の発現を正常レベルに保つことによって、高脂肪食摂取により誘発されるオートファジー機能不全を正常レベルまで改善させることが示唆された。

研究 3

(1) 36 週齢の雄仔ラットの肝臓中の脂肪酸合成酵素の発現

脂肪酸合成酵素である FAS は、LPC 群で CC 群と比較して有意な低値を示した。しかし、ACC のリン酸化率には、すべての群間に有意な差が認められなかった。

(2) 36 週齢の雄仔ラットの肝臓中の脂肪酸合成酵素の発現に関わる転写因子と関連タンパク質の発現

FAS の転写調節因子である SREBP1c の活性化は、LPC 群で CC 群と比較して有意な低値を示した。ゴルジ体にて SREBP1c を活性化に關与する S1P は、LPC 群で CC 群と比較して有意な低値を示した。SREBP1c が不活性時に複合体を形成している SCAP、小胞体上に存在し SREBP1c のゴルジ体への移行を阻害する Insig1 については、すべての群間で有意な差は認められなかった。また、AMPK はすべての群で有意な差は認められなかったが、リン酸化 AMPK は LPR 群で CC 群、LPC 群と比較して有意な高値を示した。

以上より、妊娠期母親への低タンパク質曝露は、成熟期に仔の肝臓中の脂肪酸合成酵素 FAS の発現を低下させることが明らかになった。その背景には、FAS の転写因子 SREBP1c の成熟に關与する S1P の発現の低下による SREBP1c の活性低下が關与していること、授乳期母親へのレスベラロール投与は、S1P の発現低下を改善し、SREBP1c の活性化と FAS の発現量を回復させて仔の肝臓中の脂肪酸合成低下を防ぐ働きがあることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakata Hokuto, Tohyama Harukazu, Fujita Wakako, Nakayama Shouta M.M., Ishizuka Mayumi, Yabe John, Munyinda Nosiku S., Sakala Doreen, Choongo Kennedy, Yamasaki Shojiro, Nagai Natsumi, Yoshida Takahiko, Saito Takeshi	4. 巻 279
2. 論文標題 The impact of elevated blood lead levels in children on maternal health-related quality of life	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 130490 ~ 130490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2021.130490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hossain Kaniz Fatima Binte, Akter Mahmuda, Rahman Md. Mostafizur, Sikder Md. Tajuddin, Rahaman Md. Shiblur, Yamasaki Shojiro, Kimura Goh, Tomihara Tomomi, Kurasaki Masaaki, Saito Takeshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Amelioration of Metal-Induced Cellular Stress by α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid through Antioxidative Effects in PC12 Cells and Caco-2 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 2126 ~ 2126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18042126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamasaki Shojiro, Kimura Goh, Koizumi Kazunari, Dai Ning, Ketema Rahel Mesfin, Tomihara Tomomi, Ueno Yukako, Ohno Yuki, Sato Shin, Kurasaki Masaaki, Hosokawa Toshiyuki, Saito Takeshi	4. 巻 64
2. 論文標題 Maternal green tea extract intake during lactation attenuates hepatic lipid accumulation in adult male rats exposed to a continuous high-fat diet from the foetal period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food & Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 5231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.29219/fnr.v64.5231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takeshi Saito and Masaaki Kurasaki
2. 発表標題 Effects of maternal high-fat diet and green tea extract Intake on autophagy in the liver of adult rat offspring
3. 学会等名 Scottish Section Conference 2023 of The Nutrition Society - Diet, health and inequalities (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤 健、大野由貴、山崎尚次郎、細川敏幸、蔵崎正明
2. 発表標題 母ラットの高脂肪食および緑茶抽出物摂取が仔ラットのオートファジー機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Saito, Tae Kawahara, Toshiyuki Hosokawa and Masaaki Kurasaki
2. 発表標題 Imbalance between ROS expression and their metabolic mechanisms causes accelerated aging in senescence accelerated mouse P10
3. 学会等名 8th International Symposium of the Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (FESTEM) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎尚二郎、ラヘル・メスフィン・ケテマ、大野由貴、小泉一成、戴寧、佐藤伸、蔵崎正明、細川敏幸、齋藤健
2. 発表標題 授乳期母ラットの緑茶抽出物摂取が雄性仔ラットの肝臓に対する長期的な保護効果
3. 学会等名 第92回日本衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤健
2. 発表標題 生体内微量元素と健康科学
3. 学会等名 第114回プラズマ分光分析研究会講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野 由貴、山崎 尚二郎、Rahel M Ketema、小泉 一成、戴 寧、佐藤 伸、藏崎 正明、齋藤 健
2. 発表標題 母ラットの高脂肪食、緑茶抽出物摂取が仔ラットのオートファジー機能へ及ぼす影響
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 尚二郎、ラヘル・メスフィン・ケテマ、大野 由貴、小泉 一成、戴 寧、佐藤 伸、藏崎 正明、細川敏幸、齋藤 健
2. 発表標題 授乳期の母ラットの緑茶抽出物摂取は、継続的に高脂肪食を与えられた51週齢雄性仔ラットの肝臓への脂質蓄積を抑制する
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Md. Mostafizur Rahman, Mst Kaniz Fatima Binte Hossain, Sadia Afrin, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 681
3. 書名 Effects of Metals on Human Health and Ecosystem in Design of Materials and Technologies for Environmental Remediation	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	藏崎 正明 (Kurasaki Masaaki) (80161727)	北海道大学・地球環境科学研究所・客員研究員 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関