

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591409

研究課題名（和文）

胎生期の栄養因子による生活習慣病関連遺伝子のエピジェネティクス制御の異常

研究課題名（英文）

Epigenetic control of gene expression associated with adult diseases due to fetal nutritional factors

研究代表者

室月 淳（MUROTSUKI JUN）

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50239555

研究成果の概要（和文）：

DOHaD 仮説の機序として、胎児期の低栄養ストレスがゲノムのメチル化パターンに変化を起こすことが考えられている。われわれは妊娠マウスを栄養制限して、胎仔の遺伝子のエピジェネティック制御の変化を検証した。胎仔肝における OCT-4 および Sphk-1 遺伝子の上流領域の DNA メチル化パターンを解析し、プロモーターのメチル化は両群間に有意差はなかったが、ゲノム DNA のメチル化パターンの特異的な変化を明らかにした。OCT-4 および Sphk-1 遺伝子発現の変化により細胞の分化の異常を引き起こす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

One likely mechanism of the developmental origins hypothesis is via early nutritional influences on epigenetic gene modification consisting of the presence of a methyl group on the carbon 5 of a cytosine residue. We have tested the hypothesis that maternal low-protein diet altered epigenetic regulation of specific gene of the offspring. Hepatic Oct-4 or Sphk-1 methylation pattern of the genomic DNA is specific in low-protein diet group. Aberrant Oct-4 and Sphk-1 gene expression may cause perturbations in cell differentiation. We suggest that the epigenetic mechanism consisting of DNA methylation underlies the fetal programming theory.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：周産期医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：DOHaD 仮説，低タンパク食，メチル化，エピジェネティクス，妊娠マウス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は分化段階に応じて発現する遺伝子

を使い分けている。同じ DNA の配列情報をもとに、細胞に即した遺伝子発現を行うためには、塩基配列とは違う次元での制御が必要で

ある。それがゲノム DNA の化学修飾によるエピジェネティック制御系である。環境因子が組織特異的な遺伝子発現の変化を誘導することから、このエピジェネティックな変化と生活習慣病や難治性疾患発症との関連などが、臨床医学的にも近年大きく注目されている。

一方、周産期学領域において現在もっとも注目されているトピックスに、「成人病胎児期起源説 theory of fetal origin of adult disease」がある。英国の公衆衛生学者 David Barker は、子宮内胎児発育遅延 (IUGR) あるいは低出生体重が、成人期の高血圧や糖尿病、冠動脈疾患の発症に関係することを疫学的に見出した。これは生活習慣病の起源を胎児期の低酸素、低栄養状態に求める考え方であるが、病態生理学的にみたその発症メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

バーカーらが最初に報告したハートフォードシャーの疫学的データによると、出生時体重と虚血性心疾患による死亡率の間にみごとな相関が認められた。その後も大規模なコホート研究が繰り返され、虚血性心疾患だけではなく高血圧や糖尿病の発症リスクも出生時体重と関係していることが明らかになっている。

われわれは妊娠ヒツジを用いた実験で、胎仔胎盤に人工的な塞栓を繰り返した慢性低酸素、胎仔発育遅延モデルをつくり、子宮内環境に起因する長期ストレスによって胎仔の下垂体-副腎系を慢性的に刺激され、コルチゾールが過剰分泌されるようにリセッティングされるということ、コルチゾールの働きを不活性化する酵素 (11 $\beta$ -HSD) の発現が慢性低酸素により低下し、結果的にコルチゾールの作用が増強されることを報告した。これらの長期にわたるコルチゾール作用の増強は耐糖能低下や血圧の上昇を引き起こし、成人後の生活習慣病罹患のリスクを高めると示唆された。このように成人病胎児期起源説の病態生理学的検討はこれまでにいくつか行われてきており、胎内での発育分化の重要な時期に栄養障害に曝された胎児は、組織の構造や機能に何らかの永続的な変化を起こす (子宮内プログラミング) ということが明らかになったが、ゲノム DNA レベルにおける実際の成立機序に関しては今のところよくわかっていない。

マウスの成獣レベルにおいては、食餌、癌

への罹患率とエピジェネティクスをつなぐ興味深い研究がなされている。欧米での食事を想定した、高脂質、低カルシウム、低ビタミン、葉酸・メチオニン・コリン・食物繊維欠乏食を与えられた個体群では、18 ヶ月後にその 42% に腸性腫瘍の形成が認められた。食餌中のメチル基供与体の欠乏が、マウスでメチル化状態の異常を引き起こし、腸管上皮に前癌段階を作りだすことが明らかになった。

胎生期に形づくられるエピジェネティクス系が、成体での病気へのかかりやすさに影響する例としては AVY マウスの例が唯一知られている。このマウスは IAP レトロトランスポゾンが Agouti 遺伝子上流に組み込まれており、毛皮が黄色く、インスリン抵抗性を示す肥満個体に成長する。母獣に与える葉酸の量を増減させることにより、個体群レベルで胚のメチル化量を操作することができるのである。葉酸の増加は胎仔の IAP がメチル化により不活性化されることが示されている。この研究は、胎生期のエピジェネティックな因子によって表現型が大きく左右されることを示していて注目されるが、母獣に葉酸を与えるという特殊な条件下でのモデルであり、妊娠中の母獣の栄養状態が成長後の疾患の発症に影響を与えることを直接証明したものではない。

## 2. 研究の目的

本研究は、胎内での低栄養ストレスがゲノム DNA にエピジェネティックな変化を起こすという仮説を検証することを目的とする。生活習慣病の発症メカニズムを明らかにし、その発症予防のための適切な周産期管理を追求することを目的とする。その前段階として妊娠ラットを用いた動物実験により、胎内での低栄養ストレスがラット胎仔の細胞や組織に与えるエピジェネティックな影響を、特に CpG アイランドのメチル化を指標として正常胎仔との比較検討により明らかにする。

この実験モデルは、母獣に一般的なタンパク制限食を与えて胎仔発育遅延を起こし、子宮内での発育と DNA メチル化座位との相関を調べることにより、成長後の生活習慣病発症リスクを結びつけた DOHaD 理論を証明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

エピジェネティックな修飾として遺伝子は主として CG 連続配列のシトシンがメチル化され不活化される。CG 連続配列のうち、多くの組織特異的遺伝子の調節領域に CG が密に存在するところを CpG アイランドと呼ぶが、最近、CpG アイランドに焦点を当てたより高感度な restriction landmark genomic scanning (RLGS)法を用いた解析により、この部位はその発生段階によって特異的なメチル化パターンを示すことが明らかになってきた。この組織依存的にメチル化される領域 ( tissue dependent differentially methylated region: T-DMR) は、培養細胞を用いた予備実験において、さまざまな外的要因により後天的にそのメチル化パターンが変化することもわかった。

RLGS法による CpG アイランドのメチル化は、実験動物では C57B1/6 マウスで詳細な検討がなされているので、以下の実験はこの系統のマウスで行った。

自然交配後の妊娠マウスに、自由摂食とタンパク制限食 (全妊娠期間中) を行い、胎仔発育遅延モデル (IUGR マウス) を作成した。タンパク制限は 9%カゼイン食を用いた。タンパク制限による飼育群 (R) と自由接触のコントロール群 (C) に分けた。出生当日に新生仔の肝組織をアセトン-ドライアイスにより凍結保存した。その後定法にしたがってゲノム DNA を抽出した。

RLGS 法とは、Restriction Landmark Genomic Scanning の略で、高等動物および植物ゲノム DNA 上に散在する制限酵素の認識部位をランドマークとして、制限酵素切断部を直接標識し、検出する方法である。8塩基認識の制限酵素 Not I の認識部位の多くは CpG アイランドにあることが知られており、さらにこの酵素はメチル化感受性酵素であるために、CpG アイランドがメチル化されているとその部位を切断することができなくなる。したがってその部位をはさんだ適当なプライマーを設定することにより、メチル化の有無が PCR 法で簡便に判定することができる。

RLGS法で胎仔発生に関与する T-DMR のデータベースより適切なプライマー設定し、これらの細胞から抽出された NotI 消化後のゲノム DNA を PCR 法で増幅し、これらの T-DMR のメチル化パターンを決定した。低蛋白食で飼育された妊娠マウス胎仔、グルコルチコイ

ド投与された妊娠マウス胎仔、およびコントロール胎仔における、それぞれの各臓器細胞のゲノム DNA の T-DMR パターンを決定した。メチル化の異常がみられた CpG アイランドを中心に、実際に胎仔の各臓器細胞のゲノム DNA のメチル化の検索を行った。

#### 4. 研究成果

タンパク制限新生仔の Oct-4, Sphk-1 における組織特異的メチル化可変領域 (T-DMR) を明らかにした。ゲノムに散在する遺伝子領域の DNA メチル化パターンは細胞種に特有であり、細胞の DNA メチル化プロファイルをなす。シトシンのメチル化比率に関しては、Oct-4 および Sphk-1 に有意差を認めなかった。しかしメチル化部位に着目すると、Sphk-1 ではメチル化部位が異なるパターンを認め注目された。

胎児期のタンパク質制限により Oct-4 および Sphk-1 のメチル化比率には有意差を認めなかった。正常発達の過程において細胞の分化や増殖に関連する重要な遺伝子である Oct-4 や Sphk-1 においては、子宮内環境によってエピジェネティックな変化を特に来さないことが明らかになった。しかしメチル化パターンをくわしく観察すると、特に Sphk-1 に若干の違いが生じることが示唆された。これは CpA や CpT などの non-CpG のシトシンにメチル化が付加されており、それがパターンの違いとなった可能性がある。この点については今後の検討の課題である。

Sphk-1 に対するメチル化パターンへの影響が将来の疾患の発症にどのように寄与するかはいまだ不明である。単一の遺伝子のみによって DOHaD 理論が説明できるとは到底考え難く、いずれにしろ DOHaD 理論の検討のために今後はターゲットとなる遺伝子候補を絞り込んでいく必要がある。そのためにはマイクロアレイ法を用いて遺伝子発現を網羅的にみていくことが重要だろう。

予防医学の視点からみると、成人期の生活習慣病の起源を胎児期に求める DOHaD 理論は、適切な妊娠管理により発症予防の可能性を示唆してくれる。欧米では現在 DOHaD 理論に特に注目しており、潤沢な研究予算に裏打ちされた大規模な研究プロジェクトが進行中である。生活習慣病の発症リスクを低下させることができれば、国民の生活の質を改善す

るだけでなく、医療費全体の節減という実際のメリットも期待できるというわけである。適切な妊娠分娩管理によって、将来の児の健康に寄与できるとすれば、産婦人科医の社会的役割はますます大切なものになっていくと考えられる。

#### 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7件)

①Tanabe K, Murotsuki J, et al.  
Association of women's birth weight with their blood pressure during pregnancy and with the body size of their babies  
Tohoku Journal of Experimental Medicine (査読有) 224 ; 287-292 (2011)  
10.1620/tjem.224.287

②Sekiya T, Murotsuki J, et al.  
Ultrasonic diagnosis of fetal bone and small parts  
Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (査読有) 5; 45-55 (2011)  
10.5005/jp-journals-10009-1176

③Dulnuan DJ, Murotsuki J, et al.  
Antenatal three-dimensional sonographic features of Roberts syndrome  
Arch Gynecol Obstet (査読有) 284 ; 241-244 (2011)  
10.1007/s00404-011-1910-1

④室月淳  
四肢骨格の超音波像  
臨床婦人科産科 (査読無) 64 ; 612-617 (2011)

⑤Haruhiko Sago, Satoshi Hayashi  
Jun Murotsuki, et al  
The outcome and prognostic factors of twin-twin transfusion syndrome following fetoscopic laser surgery  
Prenatal Diagnosis (査読有) 30 ; 1185-1191 (2010)

⑥室月淳, 左合治彦, 林聡, 加藤有美, 難波由喜子, 伊藤裕司, 村越毅, 他

双胎間輸血症候群に対するレーザー手術による新生児合併症  
日本周産期・新生児医学会誌 (査読有) 46 ; 14-16 (2010)

⑦今井紀昭, 室月淳  
胎児の異常所見と疾患  
ペリネイタルケア (査読無) 28 ; 706-710 (2009)

[学会発表] (計2件)

①室月淳  
胎児心疾患に対するインターベンションー  
ISPD2010 報告  
第8回日本胎児治療学会、2010年11月12日、  
埼玉県川越市

②室月淳  
一絨毛膜双胎に生じる病態についての新しい概念と胎児治療  
第57回日産婦北日本連合地方部会(特別講演)、2009年8月29日、札幌

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

室月 淳 (MUROTSUKI JUN)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号 : 50239555

(2) 研究分担者

佐藤 多代 (SATO KAZUYO)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号 : 70375020

荒木 慶彦 (ARAKI YOSHIHIKO)  
順天堂大学・環境医学研究所・准教授  
研究者番号 : 70250933