

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 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591424

研究課題名（和文） エピジェネティクスにかかわるマグネシウムの可能性

研究課題名（英文） Impact of magnesium on epigenetics

研究代表者 高屋 淳二

(TAKAYA JUNJI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：80247923

研究成果の概要（和文）：近年マグネシウムの摂取不足は、メタボリックシンドロームの一因と考えられている。また胎児期に体験する低栄養に対する適応がプログラムされ、将来成人になってからメタボリックシンドロームを発症する。その機序として、エピジェネティクスが考えられている。ラットを用いて、母体の低マグネシウム状態が胎児の体重増加不良をきたし、しかもそのグルココルチコイド関連遺伝子にエピジェネティクス変化が生じることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Prenatal under-nutrition involves changes in the epigenetic regulation of specific genes. We investigated the effects of feeding pregnant rats a magnesium (Mg)-deficient diet on the methylation of cytosine-guanine (CpG) dinucleotides in hepatic glucocorticoid genes of neonatal offspring, compared with the controls. Mean methylation of the *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2* (Hsd11b2) promoter in the Mg-deficient offspring was higher than in controls. Ppara and Nr3c1 methylation status and expression did not differ between the groups. Therefore, a Mg-deficient diet alters glucocorticoid metabolism, predicting higher hepatic intracellular glucocorticoid concentrations, and is possibly a key mechanism that induces the metabolic complications of Mg deficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：胎児医学

1. 研究開始当初の背景

1980年代後半からBarkerらは「成人病胎児期発症説 (fetal origins of adult disease)」を提唱し、胎児期の低栄養が成人期の生活習慣病の素因になると注目されている。最近では、胎児期のみならず乳児期に臨界期が存在し、その時期までにセットされた素因が、将来の疾患発症を決定するという動物実験のデータが報告されている。遺伝と胎児期環境の要因に加え、エピジェネティクスがその機序解明の手がかりといえる。

エピジェネティクスとは、「DNA配列の変化を伴うことなく、後天的な作用により変異が生じる機構」で、胎児期や新生児期の環境が細胞分裂を経ても維持される。その本体は、DNAのメチル化や染色体ヒストン蛋白質のアセチル化であることが判明している。

低マグネシウム血症がメタボリックシンドロームと関連する疫学・実験データは数多く報告されている。私たちは既にヒト臍帯血の細胞内マグネシウムが出生体重と有意な相関があり、しかもインスリン抵抗性を示す指数とも強い相関があることを報告した。すなわち、胎児期の細胞内マグネシウムの低下が、将来のインスリン抵抗性を決定することを裏付けた。

2. 研究の目的

マグネシウムはビタミンB群や葉酸とともに酵素活性を補助することが知られている。「マグネシウムがDNAのメチル化に影響を与え、エピジェネティクス変化をおこす」という独創的な作業仮説をたて実験をおこなった。

3. 研究の方法

雌Wistarラット9週齢を2群に分け、飼料のマグネシウム含量を制限した群(Low Mg群)と、対照群(Control群)とした。飼料はク

レア(株)精製基礎配合に基づき作成し、飼料中マグネシウム濃度を0.003%(低マグネシウム群)に調整した(Table 1)。

Table 1 Diet ingredients

Ingredients (%)	Control	Low Mg
Milk casein	24.50	24.50
Corn starch	45.50	45.50
Granulated sugar	10.00	10.00
Corn oil	6.00	6.00
Cellulose powder	5.00	5.00
α -Starch	1.00	1.00
Vitamin mix	1.00	1.00
Mineral mix*	7.00	7.00
Magnesium	0.082	0.003

*Mineral mix is free of Mg.

対照10個体には、Table 1に示す標準飼料を与えた。飼料、飲水量はともに自由摂取とした。正常雄ラットと生後12週に交配させ、妊娠中も各群の食事を継続した。Low Mg群では、各母獣が出産する仔の数は少なく、しかも生存しえない仔もあった。出産した仔ラット(各群10匹)から、21日生日に肝臓を採取し、 -80°C に保存した。グルココルチコイド代謝に関連する peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α , 遺伝子略号 Ppara)、グルココルチコイド受容体 (GR, Nr3c1)、11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2 (11 β HSD-2, Hsd11b2) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量した(Table 2)。

Table 2 Primer sequences used in the measurement of mRNA expression by real-time RT-PCR

Gene	Primer (5'-3')	
Ppara	Forward	CTGGTTCATACCTGGAGGAAAG
	Reverse	TGGGAGGAGTGTGAGGAGGAGT
Nr3c1	Forward	TGTATCCAGAGAGCAGAGGCA
	Reverse	AGTCCCTGCTTGTCTTCTCTC
Hsd11b2	Forward	ATGACCTGATTTTCTTGTGTA
	Reverse	GTGGATATCATGTTGGAGAGAG
Gapdh	Forward	TGGGAGGAGTGTGAGGAGGAGT
	Reverse	ATGGTGTGAGAGCCGCACTA

Ppara, peroxisome proliferator-activated receptor α ; Nr3c1, glucocorticoid receptor; Hsd11b2, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase; Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

DNAメチル化はエピジェネティクスの主なメカニズムの一つとされる。冷凍保存した肝臓からDNAを抽出し、EZ DNAメチレーションキット(Zymo Research)を用いてバイサル

ファイト (Bisulfite) 処理を行った。処理後の DNA を個別に PCR 法で増幅した。GR、PPAR α 、11 β -HSD2 の各 DNA のメチル化をパイロシーケンス (リアルタイムシーケンシング) 法で測定した (Table 3)。

Table 3. Targets CpG sites and primers for pyrosequencing			
Gene	Primer (5'-3')	Size(bp)	
Ppara	Forward	ATGGGTATYGGAGGATTTGT	292
	Bisulfite-reverse	AGGATACGCGGCGGCGATCGCC	
	Bisulfite-primer	CGGGTCTTTTCTTCTTGA	
Nr3c1	Forward	TTGGT TTT TTT TTAAGTTGG	225
	Bisulfite-reverse	GGGATACGCGGCGGCGATCGCC	
	Bisulfite-primer	CGGGTCTTTTCTTCTTGA	
Hsd11b2	Forward	ATGGGTATYGGAGGATTTGT	192
	Bisulfite-reverse	AGGATACGCGGCGGCGATCGCC	
	Bisulfite-primer	CGGGTCTTTTCTTCTTGA	

Ppara, peroxisome proliferator activated receptor α ; Nr3c1, glucocorticoid receptor; Hsd11b2, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase

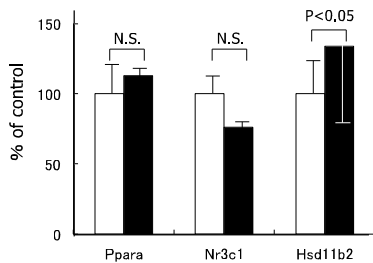
すなわち CpG サイトの T%/C%を解析してメチル化比率を決定した。PPAR α の 6 箇所、GR の 4 箇所、11 β -HSD2 の 5 箇所の CpG サイトを解析した。なお、当研究は関西医科大学動物実験委員会の計画承認を得ている。

4. 研究成果

21日生日における仔の体重は、Low Mg群で有意に小さかった (Low Mg群 ; 17.2 \pm 0.7 g、Control群 ; 30.8 \pm 0.6 g、 $p < 0.001$)。

mRNA発現量は、PPAR α 、グルココルチコイド受容体には差はなかったが、11 β HSD-2は低マグネシウム母獣の仔で有意に上昇していた (Figure 1, $P < 0.05$)。

Fig 1



PPAR α 6箇所 (Figure 2)、グルココルチコイド受容体 5箇所 (Figure 3) の CpG 領域におけるメチル化の変化に有意差はなかった。

Fig 2

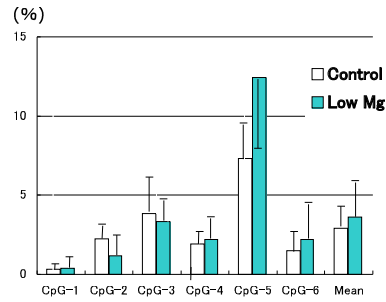
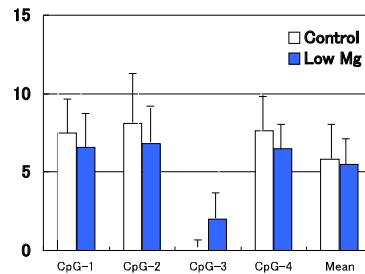
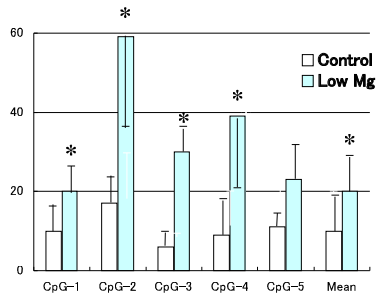


Fig 3



しかし 11 β HSD-2 遺伝子 5 箇所の CpG 領域におけるメチル化は、低マグネシウム母獣からの仔で有意に高値であった (Figure 4, $P < 0.05$)。性差に有意差は認めなかった。

Fig 4



考察

11 β HSD-2は、活性型グルココルチコイドを非活性型に変換する酵素で、11 β HSD-1と相反する作用をもつ。低マグネシウム母獣からの仔は、11 β HSD-2遺伝子のDNAプロモータ領域におけるメチル化変化を受け、遺伝子発現は抑制されると予想した。11 β HSD-2が抑制された場合、グルココルチコイドの活性が維持される。その結果インスリン抵

抗性をはじめ、メタボリックシンドロームをきたしやすい病態となる。メチル化が高まれば、遺伝子発現が低下することが知られている。しかし、生後21日での11 β HSD-2遺伝子の発現は上昇し、DNAメチル化も上昇しているという一見、矛盾する結果であった。11 β HSD-2遺伝子の発現亢進は、ストレスを代償するためと考えられ、DNAメチル化以外にその作用を凌駕する他因子の存在が考えられる。

母体のマグネシウム欠乏により、胎児の発育不全、体重増加不良がもたらされることが明らかになった。体重減少そのものが、仔のDNAメチル化に影響することも考えられる。母獣にカルシウムを制限した母獣ラットから出生した仔の肝臓では、11 β HSD-2遺伝子のメチル化には差がなく、11 β HSD-1遺伝子のメチル化が低下しており興味深い（未発表）。これまでも仔のメチル化には性差があるとの報告もあるが、本実験系では性差を認めなかった。

今後の更なる検討点としては、母獣に制限するマグネシウムの程度とその期間、および仔のどの成長段階でメチル化を測定するかが挙げられる。メチル化に変化を生じた場合も、成獣に至って、実際にインスリン抵抗性が高まっている表現型を確認しなければならない。

エピジェネティクスの調節には、DNAのメチル化以外にもヒストンの修飾や、最近ではmicroRNAが関与するとの報告もみられる。今回は蛋白の発現までは検討できなかったが、エピジェネティクスにおける複雑な調節機構が考えられる。仔へのマグネシウム補充でメチル化が修復できるならば、生活習慣病のあらたな予防対策が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

- ① Takaya J, Iharada A, Okihana H, Kaneko K. Upregulation of hepatic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 expression in calcium-deficient rats. *Ann Nutr Metab* 査読有 2011, 59:73-8
- ② Takaya J, Iharada A, Okihana H, Kaneko K. Magnesium deficiency in pregnant rats alters methylation of specific cytosines in the hepatic hydroxysteroid dehydrogenase-2 promoter of the offspring. *Epigenetics*. 査読有 2011, 6:573-8.
- ③ Takaya J, Kaneko K. Small for gestational age and magnesium in cord blood platelets: intrauterine magnesium deficiency may induce metabolic syndrome in later life. *J Pregnancy* 査読有 2011、2011 ; 270474

〔学会発表〕（計3件）

- ① 第9回日本小児栄養研究会 平成24年3月10日（西宮）
- ② 第93回米国内分泌学会学術会議（ENDO2011）2011年6月5日 米国・ボストン
- ③ 第30回日本マグネシウム学会学術集会 平成22年11月20日（神戸）

〔その他〕

毎日新聞 2011年6月23日 朝刊に紹介記事 “やっぱり 親のオンナ心 子太らず”

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高屋 淳二 (TAKAYA JUNJI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：80247923

(2) 研究分担者 無
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 無
()

研究者番号：