

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：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：22659070

研究課題名（和文） ES細胞を用いた着床期特有の胎児エピゲノム環境感受性の解析

研究課題名（英文） Genome-wide promoter methylation patterns are altered by a food component, genistein, during embryonic stem cell differentiation

研究代表者

佐藤 憲子 (SATO NORIKO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：70280956

研究成果の概要（和文）：

望ましくない胎内環境で成育した胎児は、エピゲノム状態の変化が原因で、生後青年期～中年期を迎える頃に肥満や代謝異常等を呈しやすいと考えられている。胎児期のエピゲノム状態は特に着床期前後に大きく変動する。本研究では、着床直後の胚発生を模倣できる ES 細胞の *in vitro* 分化系を用いて、食品成分添加といった胎内環境変化モデルにおいて、数十遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態の変化を検出することができた。着床後の短い胎生期間に環境が変化することにより生じた DNA メチル化状態の差は、正常な新生 DNA メチル化が遂行された後に現れることを実験的に示したことは特に重要である。

研究成果の概要（英文）：

Environmental challenges during development affect the fetal epigenome, but the period(s) vulnerable to epigenetic dysregulation are not clear. By employing a soy phytoestrogen, genistein, that is known to alter the epigenetic states of the *A^{vy}* allele during embryogenesis, we have explored the sensitive period for epigenetic regulation. The post-implantation period, when *de novo* DNA methylation actively proceeds, is amenable to *in vitro* analysis using a mouse embryonic stem (ES) cell differentiation system. Mouse ES cells were differentiated in the presence or absence of genistein, and DNA methylation patterns on day 10 were compared by microarray-based promoter methylation analysis coupled with a methylation-sensitive endonuclease (HpaII/McrBC)-dependent enrichment procedure. Moderate changes in methylation levels were observed in a subset of promoters following genistein treatment. Detailed investigation of the *Ucp1* and *Sytl1* promoters further revealed that genistein does not affect *de novo* methylation occurring between day 0 and day 4, but interferes with subsequent regulatory processes and leads to a decrease in methylation level for both promoters. Genistein perturbed the methylation pattern of differentiated ES cells after *de novo* methylation. Our observations suggest that, for a subset of genes, regulation after *de novo* DNA methylation in the early embryo may be sensitive to genistein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1700000	0	1700000
2011年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
年度			
総計	2700000	300000	3000000

研究分野：エピゲノム

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：環境感受性、胎内環境、DNAメチル化—脱メチル化、着床期

1. 研究開始当初の背景

病態の根本原因となるエピゲノム状態が一旦胎生期に形成されてしまうと容易に変更されない。オランダ飢饉(1944年11月～1945年4月)を母親の胎内で経験した人々を対象とした疫学研究では、長い妊娠期間のうち、飢饉と重なったのが妊娠初期であったのか、中期あるいは後期であったのか、といった時間的タイミングを区別して、心血管病の発症率に違いがあるかどうかを検討している。その結果、飢饉が母親の妊娠初期に相当した場合に、その母親から生まれた人の心血管病発症率が60歳頃時点で有意に高くなっていることが明らかになった(Molecular and Cellular Endocrinology, 2001)。そのような疫学研究の結果と呼応して、末梢血中のゲノムDNAのDNAメチル化状態が調査され、IGF2やMEG3領域のDNAメチル化状態が、やはり妊娠初期に飢饉が重なった母親から生まれた人にも変化していたことが報告された(PNAS, 2008)。これらのことから、胎生初期に変化したエピゲノム状態が原因でメタボリックシンドロームのリスクが高くなっているのではないかと、胎生初期に決められたエピゲノム状態は一生続くのではないかと考えられる。

しかし、胎生初期の環境変化が、いつどのようにDNAメチル化状態を変化させるのかという点については、ほとんど研究されておらず、未知のことが多い。胎生初期には、特に着床期前後にゲノムのDNAメチル化状態が全般的にダイナミックに変化する。主たる変化は、受精後のDNAメチル化消去と着床後の新生DNAメチル化である。現在のところ、胎内環境がこの2つの過程に影響を与えるのではないかと、確かな証拠のないまま推測が議論されている状況である。

2. 研究の目的

成人病胎児期発症説は、好ましくない胎内環境によって肥満等の形質を規定するエピゲノム状態が胎生期に決定されると、あたかも遺伝形質のように維持されることの危険性を警告している。一般に体細胞ゲノムのDNAメチル化は受精後消去された後に着床前後に新生メチル化機構により再確立され、「メチル化模様」は安定的に維持される。しかし着床期の胎内環境の変化が「メチル化模様」に及ぼす影響は、まだ明白になっていない。そこで本研究はES細胞分化系を用いて着床期胚発生を模倣し、環境要因によるDNAメチル化状態の変化を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

着床直後の胚発生を模倣できるES細胞のin vitro分化系を用いて、培地に大豆成分ゲニステインを添加し、DNAメチル化状態にどのような変化が現れるか検討する。ゲニステインを用いた理由は、妊娠期の母親マウスの飼料にゲニステインを添加した場合に、仔マウスの特定の遺伝子領域のDNAメチル化状態が変化し、そのことが原因で毛色や肥満度などの表現型が変化することが報告されていたからである。まず、メチル化感受性酵素とプロモーターマイクロアレイを用いた方法でゲニステインによるDNAメチル化状態の変化を網羅的に解析する。さらに、ES細胞分化過程のいつの時点から、DNAメチル化状態に変化が生ずるのか、個別の遺伝子領域についてbisulfite sequencing法で解析する。

4. 研究成果

マウスES細胞を胚様体形成により分化させ、

心筋細胞の拍動が明確に確認されるまでの10日間、培地に植物性エストロゲン、ゲニステインを添加させた場合とさせない場合のDNAメチル化レベルの差を解析した。内胚葉、中胚葉、外胚葉マーカーの発現を調べる限り、ゲニステインを添加しても分化の系統の方向性に差は生じていなかった。網羅的に遺伝子プロモーター領域に与える影響を調

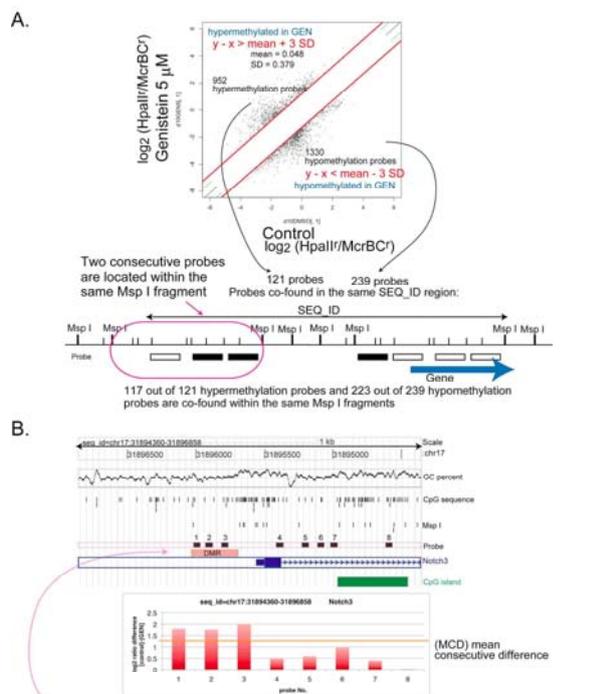
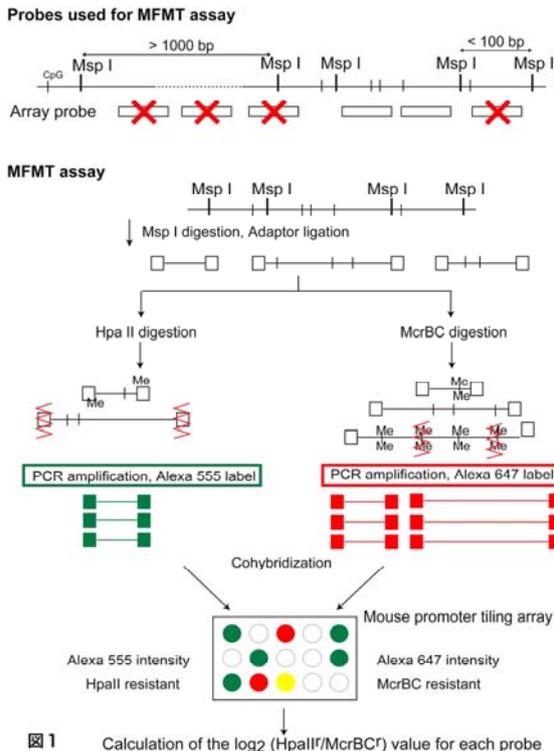
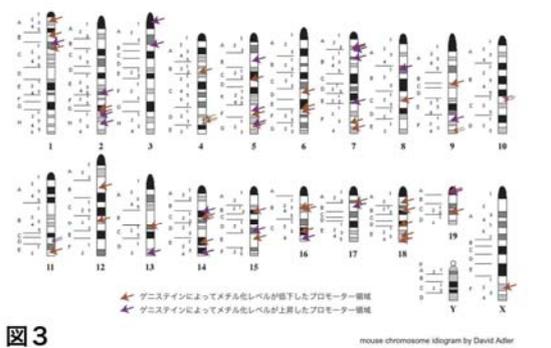
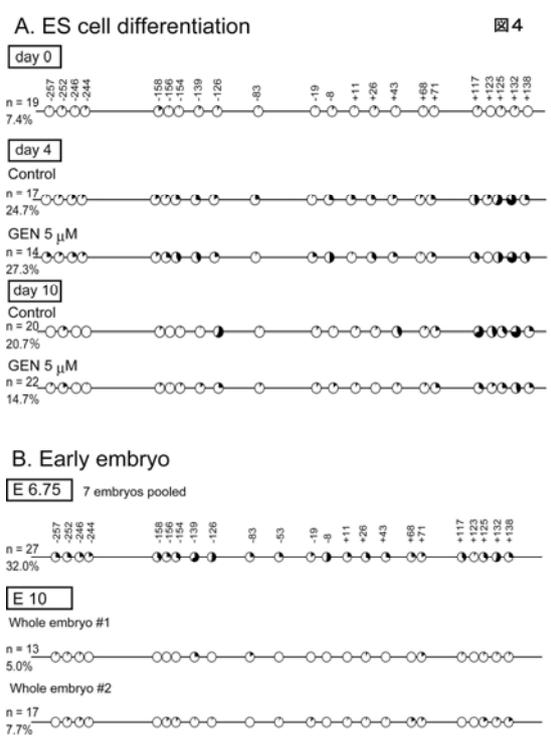


Figure 2 GEN-mediated DMR (differentially methylated region): MspI fragment within which \log_2 ratios of more than two consecutive probes are different between control and GEN

べるために、メチル化感受性制限酵素とプロモーターアレイ (MspI fragment-based DNA methylation typing, MFMT) を用いてゲニステインによるDNAメチル化状態の変化を解析した。(図1, 図2)



その結果、74カ所のプロモーター領域のDNAメチル化に差があることが判明したが、その差の程度は小さく、差のある領域は短く限定された領域であった。(図3)



このうちUcp1とSytl1の2つの遺伝子プロモーターについて、さらにDNAメチル化レベルが分化段階を追ってどのように変化するかを解析した。未分化状態から分化4日目まではゲニステインの有無に関わらず、両者のプロモーターとも新生DNAメチル化によりメチル化レベルが増加した。Ucp1とSytl1のプロモーターは4日目から10日目にかけ

でメチル化レベルが低下するが、その過程にゲニステインが影響を与え、Ucp1 については全般的な脱メチル化が促進され(図4)、Syt11 については特定のCpGサイトの脱メチル化が促進された。

母胎を介したゲニステインの効果はこれまでに A^{vy} アリールの DNA メチル化レベルを指標に解析されており、その変化は胚発生過程の三胚葉形成以前だと考えられている。本研究は、A^{vy} アリールのようなレトロトランスポゾン由来の遺伝子プロモーターではなく、内在性の遺伝子プロモーター領域に与えるゲニステインの影響を調べたものとして、初めての報告となる。胎内環境変化が遺伝子のエピゲノム状態を変え得るという実験結果はこれまでの先行研究を支持するものである。本研究の成果として、胎生期の初期という限定された時期の胎内環境変化がエピゲノム状態を変え得ることを示唆したこと、DNA メチル化状態に差が現れるのは、新生 DNA メチル化の完了後であることは、特に新たな知見を与えるものとなった。

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3件)

1) Sato N, (他5名), Genome-wide DNA methylation analysis reveals phytoestrogen modification of promoter methylation patterns during embryonic stem cell differentiation. PLoS ONE. 6(4): e19278, 2011

2) Isagawa T, Sato N (8名中5番目), DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers. PLoS ONE. 6(10): e26052, 2011.

3) Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K, Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N. Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells. Biochem Biophys Res Commun. 2011 ;412(2):366-372.

[学会発表](計5件)

1. Isagawa, T *et al.* "DNA methylation profiling in differentiation of embryonic stem cells into three germ layers." 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月, 神戸

2. 佐藤憲子 :ES細胞分化過程においてゲニステインが DNA メチル化状態に与える影響の解析,第4回日本エピジェネティクス研究会 2010年5月、米子
3. Sato N: Alteration of Ucp1 Promoter Methylation by Phytoestrogen in Mouse Embryoid Body Differentiation Culture, CDB Symposium 2011, March, 2011, Kobe
4. Sato N :Genome-wide DNA methylation analysis reveals Phytoestrogen Modification of Promoter Methylation Patterns During Embryonic Stem Cell Differentiation, Epigenetics and Developmental Programming Conference, March 2001, Newcastle upon Tyne, UK.
5. Sato N: Effects of Maternal Low Protein Diet on Methylation Variation in Leptin Promoter, WT – Scientific conference “Epigenomics of common disease”, September 2011, Hinxton, UK

[その他]

佐藤憲子「いのちが引き継ぐエピゲノム模様：環境とエピゲノムと健康について」学際生命科学東京コンソーシアム・市民講演会 2011年10月(於：学習院大学)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤憲子(代表)東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：70280956