

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 11 月 29 日現在

機関番号：30105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23617021

研究課題名(和文) 母体栄養による胎盤機能のエピジェネティック制御：DOHaDでの疾患発生機構として

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of placental function by maternal nutrition as a mechanism of disease in DOHaD

研究代表者

小山田 正人 (Oyamada, Masahito)

藤女子大学・人間生活学部・教授

研究者番号：30183255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：DOHaDとは、妊娠中から出生後の発達期における栄養を含む環境因子が、成人期の健康や生活習慣病をはじめとする非感染性疾患の発症に影響を及ぼすという理論である。本研究では、DOHaDでの疾患発生機序として、母体栄養によるエピジェネティック制御が重要で、その制御対象としてギャップ結合タンパク質コネキシンを考え、コネキシンがエピジェネティック制御を含めて発現調節されることについて論文を発表した。さらに低出生体重児と若年女性のやせが高頻度である日本の現状は今後DOHaD関連の疾患の増加が予測され、DOHaD理論の社会への普及に関する研究を開始した。

研究成果の概要(英文)：Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis, whereby noncommunicable diseases (NCDs) including Type 2 diabetes, myocardial infarction, and stroke have been demonstrated to be influenced by the parents' biological environments; diet, exercise, etc., from pregnancy to about 2 years of age. We here hypothesized that epigenetic regulation of placental proteins by maternal nutrition plays important roles as a mechanism of DOHaD-related disease and that gap junctional proteins connexins are among those placental proteins. We published a paper showing that the expression of connexins is regulated by epigenetic mechanisms. In Japan, the percentage of low-birth-weight (<2,500 g) newborns has increased and more than 20% of women in their twenties are underweight (BMI, <18.5). These data have raised concern that chronic adult diseases related to DOHaD may further increase in the future. Thus, we have started researches on dissemination of the DOHaD concept among young Japanese.

研究分野：DOHaD

キーワード：DOHaD

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がん、循環器疾患、糖尿病及び COPD (慢性閉塞性肺疾患) を中心とした NCD (Non-Communicable Disease: 非感染性疾患) は、今後 10 年間で世界の死因の約 8 割にまで増加すると予測され、世界的な予防と管理が求められている。

(2) DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) は、胎生期から乳幼児期までの栄養をはじめとする環境が、NCD を含む成人期疾患の発症素因となるという理論であり (Barker DJ. Public Health 2012;126: 185-9)、それを支持する、妊婦の低栄養 (痩せ) や児の出生体重低下が、肥満、糖尿病、心筋梗塞、発達障害、精神疾患などの発症リスク因子であることを示すエビデンスが蓄積してきた (Hanson & Gluckman, Physiol Rev 2014;94: 1027-76)。

(3) 20~30 歳代女性の痩せが多く、出生時平均体重が減少し、2500g 以下の低出生体重児が 1 割に迫っている日本の現状は、今後 DOHaD に関連する成人の疾患が増加する危険性を示している。今後、日本での NCD 予防のためには、DOHaD の社会への普及活動が重要である。

## 2. 研究の目的

(1) DOHaD による疾患発生機構の一つとして、母体栄養による胎盤機能のエピジェネティック制御が重要で、グルコース輸送体と共同して働くギャップ結合タンパク質コネキシンが、その制御対象のひとつであると仮説を立てた。その基礎データとなる、胎盤におけるグルコース輸送機構としてのグルコース輸送体の局在を明らかにする。

(2) 胎盤において、グルコース輸送体と協同してグルコース輸送に重要な働きをしているギャップ結合タンパク質コネキシンについて、発現制御、特にエピジェネティック制御機構を明らかにする。

(3) DOHaD の社会への普及活動の基礎データとして、日本における DOHaD に対する理解度を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 胎盤におけるグルコース輸送機構としてのグルコース輸送体の局在を明らかにするため、マウス胎盤組織を用いて、グルコース輸送体 1 (glucose transporter 1, GLUT1) の免疫組織化学的解析を行った。

(2) 胎盤において GLUT1 と協同してグルコース輸送を行っているギャップ結合タンパク質コネキシンのエピジェネティック制御機構を明らかにするため、コネキシンの発現調節機構について、エピジェネティック制

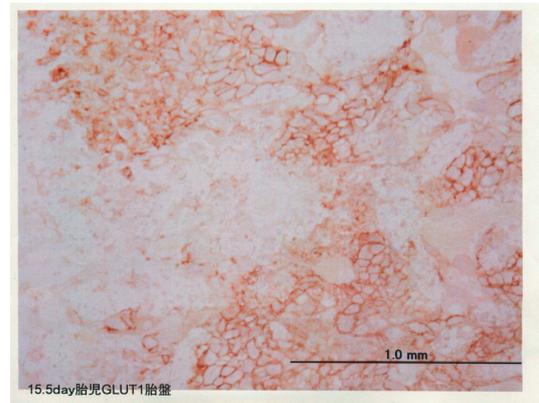
御を含めて、系統的レビューを行った。

(3) DOHaD に対する理解度を明らかにするため、日本人女子大学生約 1,000 名、年齢はおよそ 18~22 歳前後を対象に、Gage ら [Am J Clin Nutr 2011;94 (suppl): 2018S] による質問票を英語から下記のように日本語へと翻訳したものをを用いて、調査研究を行った。

## 4. 研究成果

(1) マウス胎盤におけるグルコース輸送体 1 (glucose transporter 1, GLUT1) の局在を免疫組織化学的方法により明らかにした。

下図は、妊娠 15.5 日のマウスの胎盤組織における GLUT1 の局在を免疫組織学的に解析した結果で、茶色で示す GLUT1 陽性のシグナルがマウス胎盤組織に観察された。これらの所見は、通常の栄養状態でも胎盤において、GLUT1 が豊富に発現し、グルコースの胎盤輸送に機能を果たしていることを示す。



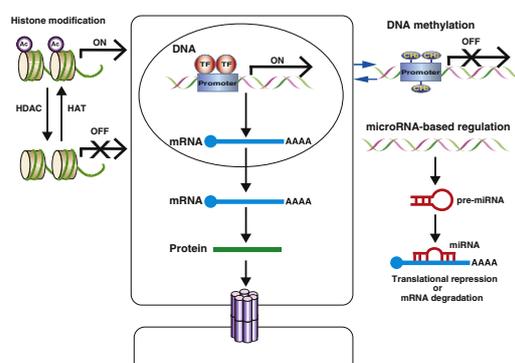
胎盤は血液組織関門 (blood tissue barrier) を有する器官のひとつで、胎児を母体血液中の有害な物質から守るためのバリアー機能を有しており、タイト結合が血液胎盤関門 (blood placental barrier) の構造的基盤となっている。一方、胎児は母体から血液を介して、栄養と酸素等の供給を受けなければならない。例えば栄養素が血液胎盤関門を通過するには、特別な仕組みが必要となる。そのうち、グルコースの胎盤を介した輸送の仕組みとしては、上で明らかにしたように GLUT1 があり、母親側の血液からグルコースを胎盤の細胞内に取り込む。

さらに、齧歯類の胎盤組織では、2 層の合胞体細胞 (母体側が合胞体細胞 I、胎仔側が合胞体細胞 II) が存在し、GLUT1 は、合胞体細胞 I の母体側と合胞体細胞 II の胎仔側に局在し、合胞体細胞 I と合胞体細胞 II との間には、ギャップ結合が存在している。すなわち、齧歯類では、母体血液中のグルコースは、合胞体細胞 I の母体側の細胞膜に存在する GLUT1 によって合胞体細胞 I 内に取り込まれる。次に合胞体細胞 I 内のグルコースは、ギャップ結合を介して合胞体細胞 II の細胞質に輸送される。そして、合胞体細胞 II 内

のグルコースは、胎仔側の細胞膜に存在する GLUT1 によって、胎仔の血液中に輸送される (Takata, *Microsc Res Tech* 38:145, 1997)。このように、齧歯類におけるグルコースの胎盤組織を介した母体血液から胎仔血液への輸送は、GLUT1 とギャップ結合が共同して行われている。

(2) コネキシンの発現調節機構について、エピジェネティック制御を含めて、系統的レビューを行い、論文 (Oyamada et al., *Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta* 1828: 118-133, 2015) として発表した。

下記のように、コネキシンの発現が、DNA メチル化、ヒストン修飾、microRNA などのエピジェネティックプロセスにより制御され、コネキシン発現調節におけるエピジェネティック制御の重要性が多くの研究によって明らかにされていることを総括した。



### ① DNA メチル化による発現調節

胎盤組織で発現しているコネキシン 26 は、その遺伝子のプロモーターのメチル化によって発現が抑制される。この事実は、Chen ら (*Int J Cancer* 113, 14, 2005) が、ヒト肺がんにおいて、コネキシン 26 の発現が低下していること、コネキシン 26 の発現が低下している肺がん細胞株に脱メチル化剤 (5-aza-2'-deoxycytidine) を投与することによりコネキシン 26 の再発現を誘導できることより明らかにされている。

同様に、他のコネキシン遺伝子でもプロモーター領域のメチル化がコネキシンタンパク質の発現抑制と関連していることが、コネキシン 43、コネキシン 45 で分かっている。

### ② ヒストン修飾による発現調節

コネキシンの発現は、ヒストン修飾、そのうちでもヒストンのアセチル化によっても制御される。この事実は、ヒストン脱アセチル化阻害剤の処理によって、コネキシンの発現が増加することによって示されている。

例えば、ヒストン脱アセチル化阻害剤のひとつである suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) 処理によって、コネキシン 43 の mRNA とタンパク質の発現が増加し、その際、

アセチル化ヒストン H3/H4 の蓄積が起こる。また、もうひとつのヒストン脱アセチル化阻害剤である Trichostatin A (TSA) の処理でも、コネキシン 43 の発現増加が起こるが、その際、コネキシン 43 遺伝子の転写因子 AP-1 と Sp1 の responsive gene elements 周囲のヒストン H4 の高アセチル化が起こる。一方、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化によって、コネキシン 43 遺伝子の発現抑制が起こる。

コネキシン 43 以外では、コネキシン 36 の発現がヒストン修飾によって、調節されている。すなわち、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化によりコネキシン 36 の発現抑制が起こり、一方、ヒストン H3 の 4 番目のリジンのメチル化によりコネキシン 36 の発現が亢進する。

### ③ microRNA による発現調節

成熟 microRNA は単鎖の 22 ヌクレオチドよりなるタンパク質をコードしない RNA で、特異的な標的 mRNA の発現を抑制する。コネキシンの発現も複数の microRNA によって調節される。

例えば、筋芽細胞細胞が多核の筋線維に分化する過程で、筋特異的な microRNA である miR-206, miR-1 などが誘導され、コネキシン 43 の発現を抑制する。コネキシン 43 遺伝子の 3' -非翻訳領域に miR-206/miR-1 の結合部位があり、コネキシン 43 発現の抑制が起こる。また、心筋梗塞では、miR-1 の過剰発現が起こり、コネキシン 43 の発現抑制を起し、それが心筋梗塞における不整脈発生の原因となる。また、ラットの心筋梗塞モデルで、アンチセンス阻害によって miR-1 の発現を低下させると、コネキシン 43 の発現抑制が起こらず、不整脈発生を防止できる。

一方、コネキシン 40 の正常な発現には、miR-208a が必要である。miR-208a は、筋特異的な転写因子のひとつである GATA4 タンパク質の発現を上昇させることによって、コネキシン 40 の発現を誘導する。miR-208a の適正な発現が、心臓の刺激伝導系の機能に必須であり、miR-208a の過剰発現や機能喪失は、不整脈発生の原因となる。

筋芽細胞や心筋細胞以外でも、コネキシン 43 の発現は、microRNA によって調節されている。骨芽細胞の分化過程においても、コネキシン 43 は miR-206 の発現調節のターゲットとなる。miR-206 は骨芽細胞で発現しているが、骨芽細胞から骨細胞への分化する過程で、その発現が減少する。また、miR-206 の過剰発現は、骨芽細胞から骨細胞への分化を抑制し、コネキシン 43 タンパク質の発現を減少させる。一方、miR-206 のノックダウンは分化を促進する。

以上のように、齧歯類の胎盤において GLUT1 とともにグルコース輸送機構を形成するギャップ結合タンパク質コネキシンの発現は、エピジェネティックに制御されている。

(3) DOHaD の社会への普及活動の基礎データとして、DOHaD に対する理解度について、日本人女子大学生を対象に調査研究を行い、DOHaD に対する理解度が低い現状を明らかにした。

① DOHaD に対する理解度を知るための日本語質問票の作成

DOHaD の社会への普及活動を行うためにはまず、DOHaD に対する認識の分析が必要と考えた。そのため、Gage ら [Am J Clin Nutr 2011;94 (suppl): 2018S] による質問票を日本語に翻訳し、下記のような DOHaD に対する理解度を知るための質問票を作成した。

② 日本人女子大学生 [食物栄養学科、保育学科、人間生活学科の3専攻の約1,000名(80名×3学科×4学年)で18~22歳前後]を対象とした調査の実施

上記の DOHaD に対する理解度を知るための質問票を用いて、具体的には、

- A. 1歳までの食事が、遺伝や生活習慣（遺伝・環境と生活習慣の要素）に比べて、成人になった時の健康にどの程度影響を及ぼすと考えているのか、
- B. 1歳までの食事が、生涯に渡った不健康な食嗜好、肥満症になるリスク、慢性疾患の発症にどの程度影響すると考えているのか、を訊ねた。

③ 調査結果

1歳までの食事が成人になった時の健康に、かなり強くあるいは強く影響すると答えた者の割合が全体の56.6%で、他の遺伝、環境あるいは生活習慣の要素に比べて、成人の健康への影響が小さいと認識していた。

1年生から4年生を全て合わせたとき、食物栄養学科、保育学科、人間生活学科の各3学科間に差はみられなかったが、食物栄養学科のみで学年進行に伴って、1歳までの食事が成人になった時の健康により強く影響すると回答する者の割合が増加していた。

「1歳までの食事が、生涯に渡った不健康な食嗜好、肥満症になるリスク、慢性疾患の発症などにどの程度影響すると考えているのか」について、研究対象の女子大学生は、1歳までの食事が、不健康な食嗜好（好き嫌

い(57.1%)や食物アレルギー(55.6%)への影響を強いと考える傾向が見られた。しかし、NCDとの関係性を考えた者は少なく、中でも癌への影響を強いと考えた者が最少であった(19.5%)。

④ 考察

研究対象の日本人女子大学生において、1歳までの食事が成人になった時の健康にかなり強く・強く影響すると答えた者の割合は56.6%と低く、ヨーロッパ5カ国の初産婦でのGageらの報告(63.7%)と同様に、DOHaDに対する低い理解度であることを明らかにした。授業内容にDOHaD教育を盛り込んでいる食物栄養学科のみで、学年進行に伴って、1歳までの食事が成人になった時の健康により強く影響すると回答する者の割合が増加していることが分かった。この結果は、栄養教育を行うことによりDOHaDの認識を高められる可能性を示唆しており、DOHaD普及活動の意義や価値・効果を示していると考えた。

以上の「日本人女子大生のDOHaDに対する認識の調査結果」を2013年11月、シンガポールで開催された国際DOHaD会議で発表したが、その際、DOHaD教育の世界的なパイオニアであるニュージーランド、オークランド大学のLiggins研究所のLENScience (The Liggins Education Network for Science) プログラムのJacqueline Bayディレクターと知己を得た。2014年3月、小山田がLiggins研究所を訪問し、DOHaDに関する理解度の国際比較は、栄養教育を含む介入を通じたNCDの予防対策の実施に貴重な情報をもたらし、重要であると合意に達して、共同研究を開始することとなった。そして、2015年3月に、小山田がLiggins研究所を再訪問し、DOHaDヘルスリテラシーを客観的に評価するための質問票を、一般大衆及び中学生とその親を対象にした一般用とヘルスプロフェッショナル用の2種類を英語で作成した。今後、日本とニュージーランドで、ヘルスプロフェッショナルとその学生、中高生とその保護者、一般大衆について、DOHaDに関するヘルスリテラシーについて調査を実施、その結果を比較し、DOHaD理論の社会への普及につなげて行きたいと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4件)

① Oyamada M, Takebe K, Oyamada, Y. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, Vol. 1828, 2013, pp.118-133, doi:10.1016/j.bbamem.2011.12.031

② Oyamada M, Takebe K, Endo A, Hara S, Oyamada, Y. Connexin expression and

gap-junctional intercellular communication in ES cells and iPS cells. Front Pharmacol, 査読有, Vol. 4, Article 85, 2013, pp. 1-8, doi:10.3389/fphar.2013.00085.

[学会発表] (計 16 件)

① Oyamada M et al, Characterising the potential of undergraduate courses to facilitate understanding of DOHaD concepts in populations of future health professionals, 9<sup>th</sup> World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, 8-11 November 2015, Cape Town, South Africa

② Endo A et al, A questionnaire survey to determine understanding of DOHaD concepts in populations of future registered dietitian/nutritionists, and present/future midwives in Japan, 9<sup>th</sup> World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, 8-11 November 2015, Cape Town, South Africa

③ Bay J et al, Characterising Public Understanding of DOHaD to Inform Communication Strategies. 9<sup>th</sup> World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, 8-11 November 2015, Cape Town, South Africa

④ Oyamada M et al, Assessing Understanding of the DOHaD Hypothesis in Target Communities to Inform Translational Intervention Design, 12th Asian Congress of Nutrition, 14-17 May 2015, Yokohama, Japan

⑤ 小山田正人ら、国際比較を目的とした DOHaD に関する認識についての質問票の作成、第 3 回日本 DOHaD 研究会学術集会、2014 年 7 月 25-26 日「国立成育医療研究センター（東京）」

⑥ Endo A et al, On Japanese female university students' perception of developmental origins of health and disease: A questionnaire survey, 8<sup>th</sup> World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, 17-21 November 2013, Singapore

⑦ 小山田正人、食品科学工学とエピジェネティクス：食品・栄養が遺伝子の働きを調節する、日本食品科学工学会第 59 回大会、2012 年 8 月 29-31 日「藤女子大学（北海道・札幌市）」

[その他]

ホームページ等：The Public Understanding of DOHaD Project（ニュージーランド、オー

克兰ド大学 Liggins 研究所、LENScience との共同研究, URL: <http://www.lenscience.auckland.ac.nz/en/about/our-research/Public-understanding-DOHaD.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山田正人 (OYAMADA, Masahito)  
藤女子大学・人間生活学部・教授  
研究者番号：30183255

(2) 研究分担者

武部久美子 (TAKEBE, Kumiko)  
藤女子大学・人間生活学部・教授  
研究者番号：60439495

(3) 研究協力者

Jacquie Bay  
Director, LENSscience  
Liggins Institute, The University of  
Auckland, New Zealand