

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380066

研究課題名(和文)胎児期の栄養が生活習慣病を誘導する機構に関するエピジェノムおよび統合オミクス解析

研究課題名(英文)Epigenomic and integrated omics analyses on the mechanism by which fetal nutrition induces life style-related diseases

研究代表者

加藤 久典(Kato, Hisanori)

東京大学・総括プロジェクト機構・教授

研究者番号：40211164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期の母親の栄養の悪化により、子の成長後の生活習慣病のリスクが上昇することが知られている。研究代表者らは、高血圧モデルラットSHRSPにおいて、胎児期低タンパク質曝露が成長後の遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにしてきた。本研究では、出生前後の腎臓での遺伝子発現変化を網羅的に調べたところ、細胞外マトリクスやアポトーシスに関わる遺伝子の変化が顕著であった。またこうした遺伝子の発現変化はDNAのメチル化などのいわゆるエピジェノミックな制御によることが知られており、妊娠期低タンパク質摂取による子のDNAメチル化の変化を網羅的に調べたところ、プロスタグランジンE2受容体遺伝子領域などに変化が認められた。

研究成果の概要(英文)：Malnutrition during pregnancy is known to increase the risk of life style-related diseases of the offspring after their maturation. We have previously revealed the effect of dietary low protein during pregnancy (maternal protein restriction, MPR), on gene expression in pups of SHRSP, a hypertensive rat model, after growth. In the present study, we exhaustively investigated the effects of the MPR on gene expression in the kidney of SHRSP, just before and after birth and found that many genes relating to extracellular matrix and apoptosis were affected. Such changes in gene expression have been attributed to so-called "epigenetic" modulations, which include changes in DNA methylation. Then we extensively analyzed the alterations in DNA methylation by using next generation sequencing technology in the kidney of MPR rats. Around twenty CpG islands were found to be differentially methylated, which involved the coding region of the prostaglandin E2 receptor gene.

研究分野：分子栄養学

キーワード：タンパク質栄養 エピジェネティクス 高血圧 胎児期 メチル化 マイクロアレイ メチローム

## 1. 研究開始当初の背景

胎児期の栄養状態と成人後の生活習慣病の発症リスクとの関連を示すことが疫学的あるいは実験的に示され、Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)と呼ばれて大きな注目を集めている。発達期に起こる不可逆な変化は、いわゆるエピジェネティックな修飾に由来すると考えられている。申請者は、これまでに脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat, 以下SHRSP)において、妊娠中に低タンパク質食(9%カゼイン食)を給与し、子を通常食で飼育した後に食塩負荷をすると、妊娠期通常食の子世代に比べて血圧が著しく高まること、脳卒中の発症も有意に早まることを報告している。この食塩感受性亢進の機構を、腎臓のDNAマイクロアレイ解析により解析したところ、キニノーゲンやNa/K ATPase(ATP1a1)の遺伝子発現の変化が関与していることを示唆する結果を得た。一方、アンジオテンシン受容体2型(AT2)の量の変化も食塩高感受性に寄与していることを報告した。栄養状態などの環境要因が、遺伝子の発現に比較的長期にわたって影響を及ぼす機構として、エピジェネティックな変化が指摘されている。特に、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化やメチル化などの状態によってその部位の遺伝子の発現が変化することが広く知られており、解析が行われている。胎児期や授乳期の栄養環境によって生じた血圧上昇には多因子の関与が想定されるため、エピジェネティクス解析に関しても、新世代シーケンサーやChIP-on-chipなどの技術の発展によりゲノムワイドな研究が必要とされている。加えて、従来の栄養関係のオミクス解析は、トランスクリプトームやプロテオーム、メタボロームに関して行われることが多かったが、エピゲノム解析が栄養の分野でどのように活用できるかを示すというのも、本研究の大きな目的のひとつである。

## 2. 研究の目的

高血圧モデルであるSHRSPラットにおいて、胎児期に低タンパク質食を摂取させると、成長後の食塩感受性が亢進し、血圧のさらなる上昇や脳卒中の発症を来す。この影響はさらに次の世代にまで及ぶことから、エピジェネティックな変化が関わっていることが予想される。本研究は、様々なオミクス技術を活用して、このモデルにおける生活習慣病の胎児期起源の分子機構を探ることを目的とした。原因候補遺伝子に関して、プロモーター領域のDNAメチル化やヒストン修飾の変化を明らかにする。一方、エピジェネティックな変化をゲノムワイドに検索することを目指し、DNAメチル化やヒストンアセチル化等の網羅的解析を新世代のシーケンシング技術などを活用して進め、ニュートリエピジ

エノミクスの方向と可能性について発信することを目指した。

## 3. 研究の方法

妊娠ラット(SHRSP系、Wistar系)に通常食と低タンパク質食を与え飼育し、胎仔もしくは出産後の仔ラットから腎臓を採取した。飼育期間中は収縮期血圧、拡張期血圧の測定及び採尿を行い食塩負荷の影響をモニターした。臓器から抽出したRNAはDNAマイクロアレイ解析に供し、いくつかの遺伝子の発現に関してはリアルタイムPCRによって、mRNA量の結果を確認した。

メチル化網羅解析には次世代シーケンサーHiSeq2500を用いた。抽出したゲノムDNAからPBAT(Post Bisulfite-Conversion Adaptor Tagging)法によりバイサルファイト処理済みのシーケンスライブラリーを作製し、次世代シーケンサーによる配列取得後、参照配列へマッピングを行い、メチル化シトシンの同定を行った。

## 4. 研究成果

まず、SHRSPにおける母ラットへの低タンパク質食給餌が胎児および新生児の遺伝子発現に及ぼす影響について調べた。次に、妊娠中に低タンパク質食を給餌した母ラットより生まれた仔ラットの食塩感受性亢進に關与した標的遺伝子の検索を行った。さらに、胎児期の栄養状態の違いによる生活習慣病の発症にエピジェネティクスの変化が関与すると予想されていることから、低タンパク質暴露SHRSPにおけるDNAのメチル化の変化に注目し、次世代シーケンサーを用いたメチローム解析を試みた。最後にSHRSPで母ラットの低タンパク質食給餌に起因する仔ラットの食塩感受性亢進が遺伝素因を持たない正常血圧ラットでも観察されるかも併せて検討した。

<胎児期低タンパク質暴露を受けた胎児および出生児の血圧調節遺伝子発現解析>

妊娠したSHRSPに20%カゼイン食あるいは9%カゼイン食を給餌し、出産の1日前に胎仔の腎臓を摘出した(胎生21日齢;E21)。出産後、母ラットおよびその出生仔は市販飼料で飼育し、出生後15(D15)、28(D28)日に雄性仔ラットの腎臓を摘出し、得られたDNAマイクロアレイデータ全体に対してクラスター解析を行った。新生児期の仔ラット(D15)の場合は、母ラットの食餌ごとに近接したクラスターを形成したが、胎仔(E21)では群ごとに分かれなかったことから、腎臓の遺伝子発現プロファイルに対するインパクトは、胎児期よりむしろ出生後に大きいことが示された。E21では低タンパク質暴露によりステロイドホルモンの生合成に関わる遺伝子群の発現が上昇し、D15ではネフロン形成に關与する遺伝子(Egln3、Fos等)の発現変動が認められた。血圧調節因子であるアンジオテ

ンシン II は腎臓の形態形成や血圧調節因子の発達に作用することが報告されている。受容体 type2 (Agtr2) は胎児期に高発現し、出生後その発現は減少する。胎仔 (E21) の Agtr2 発現量は対照群と低タンパク質暴露群で同程度であった。出生後に Agtr2 発現量は減少するが、その減少は低タンパク質暴露を受けた仔ラットで鈍く、D28 の Agtr2 の発現量は対照群に比べ高い傾向にあった。これらの結果から、母ラットの低タンパク質暴露の遺伝子発現に対する影響は胎児期よりも出生後のほうがより大きくなった。

< 胎児期低タンパク質暴露 SHRSP の遺伝子発現解析 >

妊娠中に低タンパク質食を摂取した母から生まれた SHRSP の仔ラット (低タンパク質暴露 SHRSP) に、食塩の負荷を行ったところ、先行研究と同じように血圧上昇、尿へのアルブミン排泄量の増加が観察された。このラットの腎臓で DNA マイクロアレイ解析を行った結果、TGF-beta シグナリング経路のダウンレギュレーションおよび活性酸素種 (ROS) の除去に關与する遺伝子の発現増加が見られたことから、傷害を抑制する働きは低タンパク質暴露を受けた SHRSP でも正常に作用していることが示唆された。一方、細胞外マトリックスの増加に關与する遺伝子 (Fgf2, Timp1 等) およびアポトーシスの亢進に關与する遺伝子 (Apaf1, Endog) の発現が増加していた (図 1)。これらの因子が食塩負荷時の腎障害の進展に寄与していることが推測された。そこで、これらの変動が食塩負荷によるものかを調べるために、食塩水もしくは水道水を摂取した低タンパク質暴露 SHRSP での発現変動を調べた。その結果、食塩負荷の有りと無しでそれぞれクラスターを形成し、遺伝子発現プロファイルに対するインパクトは低タンパク質暴露の影響よりも食塩負荷による影響が大きいことが示された。

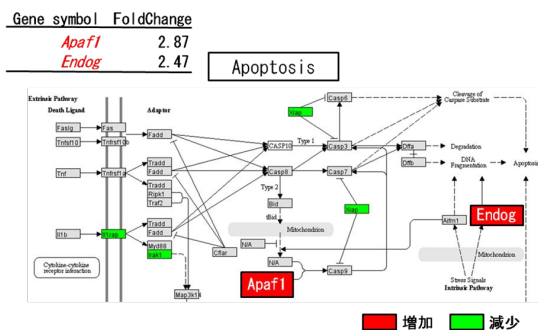


図 1 発現が変動していたアポトーシスパスウェイ関連の遺伝子

< 胎児期低タンパク質暴露に起因する高血圧症発症におけるエピゲノム解析の検討 >  
メチル化状態を網羅的に評価するために、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析 (メチローム解析) を行った。低タンパク質暴露

SHRSP の腎臓から抽出したゲノム DNA にバイサルファイト処理を行い、HiSeq2500 を用いて高速シーケンス解析を行った。得られたリードをラットリファレンス遺伝子配列へマッピングし網羅的メチル化解析を行ったところ、群間で顕著な差を示すメチル化 CpG アイランド領域が 20 箇所以上抽出された (図 1)。興味深い事に、その中の一つは血圧調節との関係が示唆されている prostaglandin E2 receptor (PTGER1) のコーディング領域内に存在していた。一方、先に見出された原因候補遺伝子近傍の CpG アイランドに注目してメチル化状態を調べたが群間で差を示すメチル化領域は検出されなかった。

< 胎児期低タンパク質暴露に起因する食塩感受性亢進機構の検討 >

仔ラットの食塩感受性亢進が遺伝素因を持たない正常血圧ラットでも観察されるかを Wistar ラットを用いて検討した。妊娠中に低タンパク質食を摂取した母 Wistar ラットから生まれた仔ラットの血圧は、食塩負荷前に比べ負荷後に有意に高値を示した。一方、正常タンパク質食を摂取した母ラットから生まれた仔ラット (対照群) の血圧に食塩負荷の影響は観察されなかった。以上のことから、胎児期低タンパク質暴露に起因する食塩感受性の亢進は SHRSP 特有の現象ではなく、正常血圧ラットでも同様に観察されることがわかった。

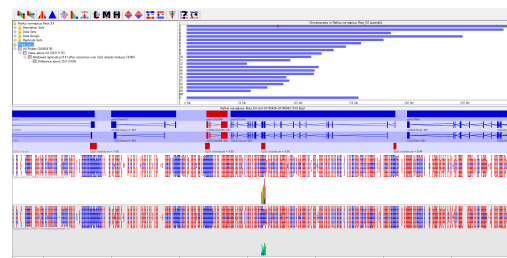


図 2 メチローム解析の結果の一部

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 5 件)

Otani, L., Sugimoto, N., Kaji, M., Murai, M., Chang, S.-J., Kato, H. and Murakami, T. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the enhancement of salt sensitivity caused by prenatal protein restriction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* 査読有、23, 892-899 (2012)

Imamura, W., Yoshimura, R., Takai, M., Yamamura, J., Kanamoto, R. and Kato, H.

Adverse effects of excessive leucine intake depend on dietary protein intake: A transcriptomic analysis to identify useful biomarkers. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 査読有、59, 45-55 (2013)

大谷りら、村上哲男、加藤久典 タンパク質栄養に起因する生活習慣病発症機序 胎児期から新生児期に刻まれる栄養の記憶、化学と生物、査読無、51, 785-788 (2013)

加藤久典 ニュートリゲノミクスの広がり と統合ニュートリオミクス、New Diet Therapy, 査読無、29(4), 15-22 (2014)

加藤久典 ニュートリゲノミクス 食品と栄養における網羅的解析、化学と工業、査読無、67, 122-124 (2014)

〔学会発表〕(計5件)

佐藤正幸、大谷りら、小山彩香、加藤久典、SHRSP における母ラットへの低タンパク質食給餌が胎児及び新生児ノ遺伝子発現に及ぼす影響、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 6 月 1 日(江別市)

加藤久典 DOHaD におけるタンパク質栄養 第 3 回日本 DOHaD 研究会シンポジウム、2014 年 7 月 25 日 (東京都)

Hisanori Kato、Multiomics analysis of food functionality、International Conference on Food for Health in Niigata 2014 2014 年 10 月 31 日 (新潟市)

加藤久典、ニュートリゲノミクスとエピジェネティクス、第 12 回補完代替医療学会、2014 年 11 月 1 日(東京都)

Otani, L., Sato, M., Saito, K., Miura, F., Shirahige, K. and Kato, H. Genome-wide methylation analysis of transgenerational effects of maternal protein. 12th Asian Congress of Nutrition. 2015 年 5 月 17 日(横浜市)

〔図書〕(計1件)

加藤久典、藤原葉子(編著) 「栄養科学イラストレイテッド：分子栄養学～遺伝子の基礎からわかる」羊土社 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 久典 (KATO, Hisanori)  
東京大学・総括プロジェクト機構・特任教授  
研究者番号：4 0 2 1 1 1 6 4

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：