

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590399

研究課題名(和文)生活習慣病に繋がるエピゲノム変化が胎生期低栄養により形成される機序の解明

研究課題名(英文) Prenatal exposure to a maternal low-protein diet affects nutritional stress response in the young adult mice.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の環境要因として初期の胎内環境の関与も重要である。本研究は、胎生期の中でも前期に着目し、その環境変化が老齢化する前の若い成体に与える影響についてマウスを用いて解析した。胎生前期低栄養による代謝や遺伝子発現の変化は自由摂食時には特に認められなかったが、絶食後に検出された。低栄養群では血漿遊離脂肪酸レベルがコントロール群に比べ有意に低かった。さらに低栄養群では肝臓のHsp90-Hsp70分子シャペロン経路遺伝子群の発現誘導が障害されていた。従来提唱されてきたクロマチン修飾の永続的变化とは別の機構、すなわちHsp90による調節機構もDOHaD現象に寄与する可能性を新たに示した。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies have shown that early embryonic exposure to low nutrition raises the risk of obesity, metabolic disorder and cardiovascular disease in the later life. Using mice, we studied the effects of maternal low protein (LP) diet during the early gestational period on the metabolic function of young offspring. We asked whether LP causes any change in the metabolic response against starvation. The plasma free fatty acids level was significantly lower in the LP than in the control mice. More intriguingly, the transcriptional induction of molecular chaperones, Hsp90 and Hsp70, was impaired in the liver of LP mice. This result prompted us to propose the novel idea that the mechanism regulated by molecular chaperones would also be involved in the DOHaD phenomena.

研究分野：エピゲノム

キーワード：胎内環境 形質頑健性 分子シャペロン Hsp90 Hsp70 DOHaD エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病は一般に中年以降に発症する多因子性疾患であり多因子に含まれる要因は環境か遺伝(親から子への形質継承)に大別される。環境要因としては本人の生活環境だけでなく親や祖父母の生活環境も関係している。特に出生前(胎生期)あるいは発生発達初期の環境の良し悪しが、生涯に続く健康状態に影響を与えるという現象は、多くの疫学研究及び動物実験によって認められており、DOHaD (Developmental Origin of Health and Disease)という考え方が広く受け入れられている。

胎生期には、受精、着床、三胚葉分化、組織分化、器官形成、器官の成熟と個体サイズの増大など多種多様なイベントが進行し、エネルギー代謝様式及びシグナル伝達様式も刻々変化する。この過程において、環境との相互作用様式は時期特異的に変化するはずである。しかし、好ましくない環境に曝露される期間が胎生期のどの時期であるかを規定してその効果について検討した研究は少ない。その数少ない中でも貴重な疫学研究が報告されており、胎生初期に低栄養などの悪環境に曝露された場合、胎生後期の曝露に比べて肥満、糖脂質代謝異常や心血管系疾患のリスクが高くなることが示されている。胎生前期に限定してその期間の環境変化が及ぼす影響を解析する事は重要である。

発生段階の初期、すなわち人生の始まりの頃の環境の影響が、どうして何十年も経過した後に生体に現れるのかという謎に対しては、その間に遺伝子の塩基配列はほぼ変化しないことを考えるとエピジェネティック修飾が環境によって変化することが原因だと説明できるのではないかと推測されている。DOHaDのこれまでの考え方としては、まず胎生期の環境変化でクロマチン修飾に永続的な変化が生ずるが、若いうちはその変化は小さく、加齢に伴って大きな変化となり疾患形質との関連が強まるとされている。しかし、いつからどのようなクロマチン修飾がおこるのかはあまり明らかでない。また加齢によってエピジェネティック修飾変化が増大する機構も明らかでない。

さらに、生活習慣病という疾患形質として異常が顕在化するのには中年以降であるが、実は病気と診断される以前から血中代謝中間体濃度等の変化は生じている。しかし、そのような若い時点で、胎生期環境変化によって引き起こされる違いを具体的に検出できるのかどうかという点は明らかではない。

2. 研究の目的

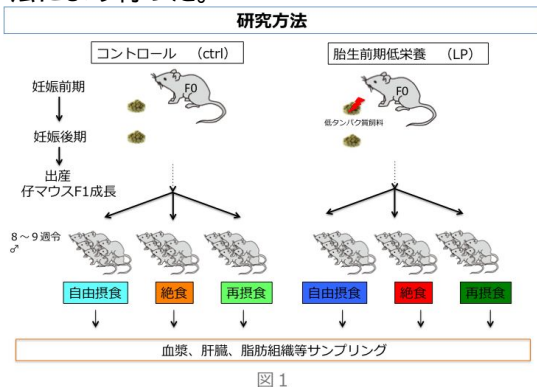
本研究は胎生期環境変化が成人の生活習慣病のリスクとなるメカニズムを明らかにするために、特に以下の点に着目して解析を行った。(1)胎生期の中でも胎生前期の低栄養が成体に与える影響を明らかにする。(2)胎生前期低栄養によって引き起こされ

るDNAメチル化状態の変化がいつからおこるのかを明らかにする。(3)胎生前期の低栄養の影響が若い成体の代謝に及ぼす影響を明らかにする。定常状態では捉えるのが難しいと予想したため、代謝ストレスである絶食負荷をかける。ストレスに対する応答パターンを比較することにより、若い時期における胎生前期環境変化による影響を明らかにする。

3. 研究の方法

妊娠マウス(F0)を2群に分け、コントロール群には普通食を与え、低栄養群には妊娠前期10日間に限定して低タンパク質食を与えた。F1成体マウス(雄)を8-9週齢の時点で各群8-10匹として自由摂食、24時間絶食、24時間絶食後24時間再摂食群の3群に分け、計6群を比較する解析を行った。(図1)血漿のグルコース、遊離脂肪酸、コレステロール、中性脂肪値を測定すると共に、精巣周囲白色脂肪組織及び肝臓を採取し、RNAを調整し、DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現差を網羅的に解析した。コントロール群と低栄養群の遺伝子発現の差はSAM (Significance Analysis Microarrays)法で解析した。FDR < 10, p < 0.05, Fold change > 1.5 の条件で発現差のある遺伝子を絞り込んだ。パスウェイ解析には、DAVID Bioinformatics Resources 6.7, WEB-based GENE Set Analysis Toolkit (updated on 1/30/2013.), Reactome pathway database V62を用いた。DNAマイクロアレイ実験の結果見いだされた遺伝子発現差については、semi-quantitative real-time RT-PCRにより検証した。

レプチンプロモーターのDNAメチル化状態の解析は、8-9週齢の成体白色脂肪組織以外に、E3.5, E6.75, E10.5 (ts17), E13.5のF1全胚、及び、E16.5の羊膜とMEFを採取し、ゲノムDNAを調整し、bisulfite sequencing法により行った。

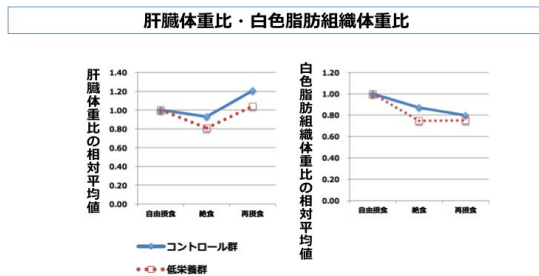


4. 研究成果

(1) 体重と組織体重比

コントロール、低栄養の自由摂食、絶食、再摂食の計6群において、処置前の体重に差はなかった。肝臓体重比、白色脂肪組織体重比は自由摂食、絶食、再摂食を通じてコント

コントロール群-低栄養群の間に統計学的に有意な差はなかったが、コントロール群において再摂食の際、肝臓体重比の増加が大きい傾向が認められた。(図2)

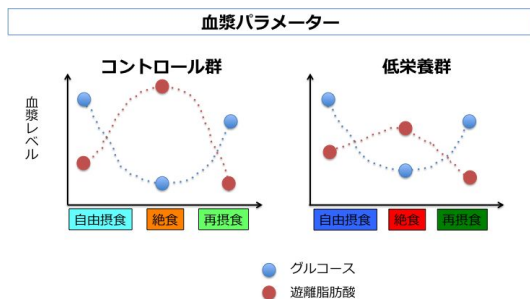


自由摂食時の値を1とした肝臓体重比、白色脂肪組織体重比の相対平均値

図2

(2) 血漿パラメーター

血漿中のグルコース、遊離脂肪酸、コレステロール、中性脂肪のレベルを比較したところ、絶食時の遊離脂肪酸やコレステロールレベルにコントロール群と低栄養群との間で有意な差が見られた。(図3)



血漿グルコースと血漿遊離脂肪酸レベルの模式図。絶食によりコントロール群も低栄養群も低血糖となり、血漿遊離脂肪酸が上昇した。しかし、低栄養群では24時間絶食における遊離脂肪酸の上昇は有意に低かった。

図3

(3) 遺伝子発現差

肝臓、白色脂肪組織ともに、自由摂食時には、コントロール群と低栄養群との間で明らかな発現差のある遺伝子は検出されなかった。しかし、絶食時には、肝臓では約200、白色脂肪組織では約30の遺伝子の発現に差があることがわかった。再摂食時には肝臓では、約60の遺伝子に発現差が認められたが、白色脂肪組織では明らかな発現差のある遺伝子は検出されなかった。

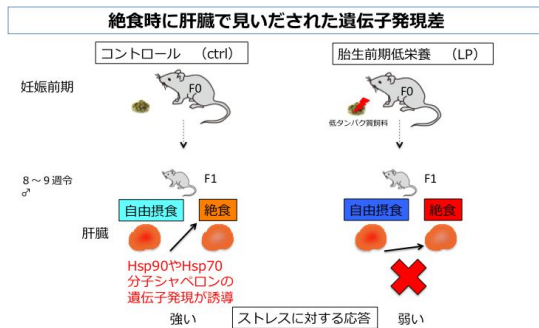


図4

絶食時の肝臓においてコントロール群と

低栄養群との間で発現差のある遺伝子群のうちコントロール群より低栄養群の発現が高い遺伝子は約150、低い遺伝子は約50検出され、それらは自由摂食時、絶食時、再摂食時の発現変動のパターンから概ね3つの主要なクラスターに分類された。そのうち低栄養群がコントロール群に比べて絶食時の発現が低い遺伝子から形成されるクラスターには、Hsp90, Hsp70などの分子シャペロンやその関連遺伝子が含まれる割合が多く、肝臓が受ける絶食によるストレスに対して応答する経路の遺伝子群の発現誘導が、低栄養群では障害されていることがわかった。(図4)

(4) DNAメチル化レベルが胎生期低栄養により変化するタイミング

白色脂肪組織において低栄養によって発現レベルが有意に変化した遺伝子群は *Cc15* などのケモカイン遺伝子であり、絶食時のアポトーシスや脂肪代謝に関連した遺伝子の発現には差がみられなかった。

一方、先行研究により、白色脂肪組織で発現するレプチンの遺伝子プロモーターのDNAメチル化レベルは個人間の中で多様性があることが知られていた。そこで、*Lep* プロモーター領域のDNAメチル化レベルを胎子の発生段階を追って解析した。その結果、コントロール群、低栄養群共にE3.5ではDNAメチル化修飾が消失しているが、E10.5にかけて新生DNAメチル化が進行し、両者とも約72%にメチル化レベルが上昇した。しかし、E13.5にコントロール群と低栄養群との間に差が生じ、コントロール群(71%)に比べ低栄養群(64%)のメチル化が低下した。この傾向はE16.5のMEF、羊膜、成体の白色脂肪組織でも維持された。すなわち胎生期環境はレプチンの遺伝子発現レベルには影響を及ぼさないが、新生DNAメチル化過程以降にDNAメチル化レベルの変化を生み痕跡的にそれが残ることがわかった。

(5) 総括と考察

生活習慣病の予防は国民的課題であるが、全国民を十把一絡げにして疾患リスクを捉え共通の予防策を掲げるのではなく、一人一人個別にリスクを評価し、しかも発症前の早期に適切な方法で予防対策を実行する重要

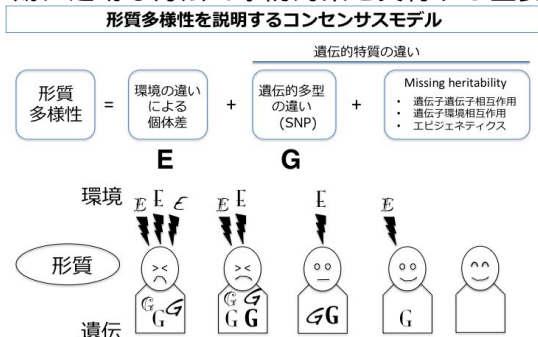


図5

性が認識されるようになってきた。

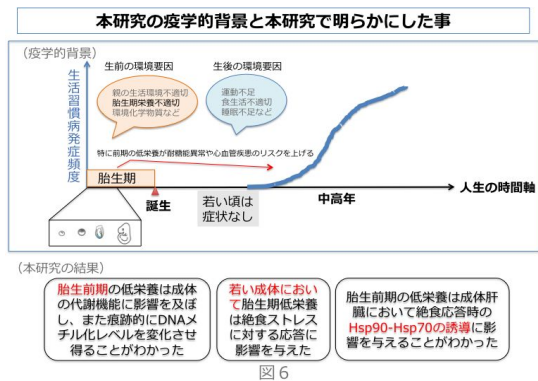
個人間における疾患のなりやすさの違いは、環境による違いと遺伝的な違いの足し算で説明されることが一般的であり、図5で示すような線形モデルが用いられている。しかし生活習慣病については、このモデルに基づき成人後の生活習慣及び GWAS-SNP の情報を用いて疾患リスクの個別化評価を試みても現時点では十分ではない。その原因はまだ同定されていない SNP の効果が存在するのみでなく、疾患形質に対して遺伝子の作用は、他の複数の遺伝子や様々な環境に影響されるが、これらの相互作用の関係がまだ十分に理解されていないことにあると考えられている。また、DOHaD 説によるとエピジェネティックな変化を介して胎生期環境が疾患リスクに影響を及ぼす可能性がある。

本研究ではまず、胎生期環境によるクロマチン修飾の永続的变化を同定するために、個人個人の間で DNA メチル化レベルに違いのあるゲノム領域 (Variably methylated region) の1つとして報告されていたレプチンプロモーターに着目してそのメチル化レベルが、胎生期環境によって変化するかどうかを解析した。その結果、確かにレプチンプロモーターの DNA メチル化レベルは、胎生前期低栄養によって永続的に低下した。低栄養の条件は胎生前期の10日間に限定したが、その胎生前期の期間中は、コントロール群と変わらず新生 DNA メチル化 (*de novo* methylation) が進行した。コントロールと低栄養との間でメチル化レベルの違いが検出されたのは E13.5 以降であり、その違いは、E16.5 においてもまた、成体の白色脂肪組織においても維持された。受精後リプログラミングによる脱メチル化後の新生 DNA メチル化過程は、胎生初期の環境変化によって影響を受けないという結果は、以前報告した結果と一致した¹。しかし、レプチンの遺伝子発現や血漿のレプチンレベルは、胎生前期低栄養によって影響を受けず、コントロール群と低栄養群の間に統計学的な有意差は生じなかった。従って、レプチンプロモーターに関しては、胎生前期低栄養の環境により痕跡的に DNA メチル化レベルが変化するが形質に影響を与えるものではないことがわかった。

次に、胎生前期の低栄養が若い時期の定常状態の代謝に影響を与えるかどうかという点であるが、本研究で調べた限りにおいては、自由摂食状態では、胎生期低栄養による差は特に検出できなかった。

ところが、絶食状態では、血漿遊離脂肪酸レベルに差が生じた上に、肝臓と白色脂肪組織においても遺伝子発現に差が生じた。低栄養群の白色脂肪組織体重比はコントロール群のそれよりも絶食により大きく低下し、脂肪分解と遊離脂肪酸の放出が進んでいることが示唆され、低栄養群において絶食時に遊離脂肪酸の消費が亢進している可能性があると考えられた。また、興味深いことに、コ

ントロール群では、絶食により肝臓の分子シャペロンとその関連遺伝子群の発現が誘導されるのに対し、低栄養群では誘導されていなかった。Hsp90-Hsp70 分子シャペロンはタンパク質のフォールディングを制御する主要分子であり、遺伝的変異や環境変化の攪乱があっても個体が一定の形質を保つ、すなわち形質頑健性 (phenotypic robustness) を支える分子である。さらに Hsp90 のクライアント (標的) はシグナル伝達、エピジェネティクス制御など細胞中枢機能に関わる多種の分子であることを考えると、絶食ストレスに対して Hsp90 の誘導量が不足する事によって、結果的にシグナル伝達やエピジェネティック修飾に差が生じてくる可能性がある。24 時間継続した絶食によって蓄積するタンパク質ミスフォールディングに対して分子シャペロンが増加することにより形質頑健性が支えられているとするならば、低栄養群では Hsp90-Hsp70 が増加していないことから形質頑健性を支える仕組みに障害が生じていると考えた。生涯において一般に頻回のストレスを個体は経験するはずなので、その度に分子シャペロンが不足すると回数を重ねる毎にエピジェネティック修飾が徐々に変化していくことが考えられ、その点では「加齢によってエピジェネティック変化が増大する」という従来の DOHaD 研究の解釈とは矛盾しない機構であると考えられた。しかし、なぜ低栄養群の Hsp90-Hsp70 誘導が障害されるのかという点は明らかではなく今後の課題となった。さらに、分子シャペロンの誘導キネティクスについても詳細に調べる必要があると思われた。



以上をまとめると、胎生前期の低栄養は、疾患形質が現れる以前の若い時期においても代謝応答に影響を与えることがわかった。(図6) すなわち自由摂食のような定常状態では一見影響がないように見えるが、絶食という代謝ストレスに対する応答の際に差が現れる。低栄養群の絶食時の血漿遊離脂肪酸値はコントロール群に比べて低く、末梢でのケトン体消費ひいては脂肪組織からの脂肪酸放出が低栄養群で亢進していることが示唆された。絶食時には肝臓の分子シャペロン遺伝子発現の誘導がおこるが、低栄養群では誘導が起こらなかった。つまり、人によって

ストレスにตอบสนองした分子シャペロンの増加量は異なる可能性があり、その違いが胎生期の環境によっても生み出されるのではないかと考えられた。言い換えるならば、形質頑健性を保つ仕組みにも個体差があり、その個体差が胎生期環境によって生じる可能性がある。

新たに提唱：「形質頑健性の個体差」が形質多様性に影響する

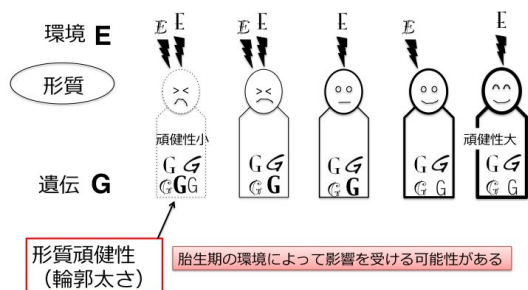


図7

このように本研究の重要な成果は、これまで考えられていなかった、“形質頑健性の個体差が胎生期の環境によって影響を受ける”可能性をはじめて示すことができた点である。形質多様性のモデルについても「形質頑健性の個体差」を考慮することにより、改善される可能性があると考えられた。(図7)

参考文献¹

Noriko Sato, *et al.* Genome-Wide DNA Methylation Analysis Reveals Phytoestrogen Modification of Promoter Methylation Patterns during Embryonic Stem Cell Differentiation. , PLoS One, 6 (4) : e19278, 2011

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)

[学会発表](計2件)

1. 佐藤憲子. 胎生初期栄養変化が引き起こすマウス成体臓器遺伝子発現パターンの早期変動. 第3回日本 DOHaD 研究会, 2014年7月東京
2. 佐藤憲子. 胎生初期の栄養変化による影響がマウス胎仔エピゲノムに現れるタイミング. 第2回日本 DOHaD 研究会, 2013年7月東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/epi/index.html>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

須藤 カツ子 (SUDO Katsuko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：50126091