

## 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：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591614

研究課題名(和文)胎児の栄養環境と代謝エピジェネティクス制御

研究課題名(英文)Prenatal calcium deficiency induce an altered phenotype in offspring via changes in the epigenetic regulation

研究代表者

高屋 淳二 (TAKAYA, JUNJI)

関西医科大学・医学部・その他

研究者番号：80247923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウム(Ca)の摂取不足がメタボリックシンドロームの一因と考えられている。ラットにおいて、低Ca食にすると11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1が上昇してグルココルチコイドを活性化し、インスリン抵抗性を示すことを明らかにした。また子宮内環境が胎児のエピジェネティクスに影響することが知られている。母獣のCa欠乏は胎児にエピジェネティクス変化を与え、仔が将来メタボリックシンドローム発症の一因になることを報告した。胎児期に設定されたプログラムにミスマッチした母獣に授乳保育されることが、さらにメタボリックシンドローム発症の一因になることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Prenatal under-nutrition can induce an altered phenotype in offspring via changes in the epigenetic regulation of specific genes. Calcium (Ca) plays an important role in the pathogenesis of insulin resistance syndrome. We investigated the methylation of individual CpG in glucocorticoid-related genes in liver tissue of offspring from Ca-deficient mothers. The methylation levels of Hsd11b1 was lower in the Ca-deficient group. In addition, pups were cross-fostered to the same or opposite dams and divided into the following four groups: CC, DD, CD, and DC (first letter: original mother's diet; second letter: nursing mother's diet). All offspring were fed a control diet beginning at weaning and were killed on day 200. In males, mean levels of insulin, glucose, and HOMA-IR were higher in the DD and DC groups than in the CC group. A Ca-deficient diet in a mother during gestation and early nursing alter glucocorticoid metabolism and insulin resistance in a sex-specific manner.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：エピジェネティクス カルシウム マグネシウム インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

(1) 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きた(Barker DJP, BMJ 1995)。近年では、胎児期のみならず乳児期に臨界期が存在し、その時期までにリセットされうる素因が、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(Gluckman et al. Proc Natl Acad Sci USA 2007)。

(2) 申請者は栄養素のなかでもカチオンに着目し、マグネシウム欠乏とインスリン抵抗性を示す代謝疾患について研究報告した(Takaya et al. Metabolism 2004、Takaya et al. Pediatr Res 2007)。また動物実験から申請者らは、母獣が低マグネシウム状態であれば、出生仔で、グルココルチコイド代謝に係る遺伝子11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2のメチル化が上昇していることを報告した(Takaya et al. Epigenetics. 2011)。

2. 研究の目的

(1) 胎児は低栄養への暴露により成人病の素因が形成され、出生後の環境とあいまって疾病が形成されることが疫学調査から広く認められている。その機序解明の手がかりがエピジェネティクスと考えられる。「栄養素におけるカチオンが胎児の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た。栄養環境によるエピジェネティクス制御の分子機構を明らかにし、栄養環境の提案・栄養成分の補充により、新たな疾患予防の確立につなげることを最終目的とした。

(2) 一方、近年カルシウムの摂取不足がメタボリックシンドロームの一因と考えられている。またグルココルチコイド作用の活性化がインスリン抵抗性やメタボリックシンドロームの病態に関与していることも示唆されている。そこで母体のカルシウム欠乏が胎児にエピジェネティクスの変化を与え、グルココルチコイド作用、さらにはインスリン抵抗性にどのような影響をおよぼしているかを明らかにする。また一旦エピジェネティクスによるプログラムされても、いかにリセットして将来の生活習慣病を防ぐてだてを探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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。グルココルチコイド関連遺伝子のDNAプロモーター領域におけるCpGアイランドのメチル化の変化を、パイサルファイト変換した後にパイロシーケンス法で明らかにした。

生後21日に仔ラットから肝臓をとりだし、peroxisome proliferators activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、グルココルチコイド受容体、11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1)、11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ -HSD2)、phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) DNAのCpGリッチ領域におけるメチル化をパイロシーケンス法で測定した。

(2) カルシウム欠乏(低Ca群)ラットとして、Wistar系雌性ラット10個体(12週齢)にカルシウム濃度を0.008%に調整したカルシウム欠乏食14日間飼育したものをを用いた。対照10個体には、AIN93Gに準拠した飼料を与えた。飼料、飲水量はともに自由摂取とした。体重、血圧、脈拍を測定後、肝臓からmRNAを抽出し、グルココルチコイド受容体(GR)、11 $\beta$ -HSD1、11 $\beta$ -HSD2、

PPAR $\alpha$ 、PEPCK のmRNA特異的プライマー対を用いてリアルタイムPCRを行った。内部標準として GAPDH-RNA を測定し、各mRNA量を補正した。

なお、本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（承認番号11-012）

( 3 ) 「妊娠中にたとえ低栄養であっても、正常母獣に育てられることにより、将来のインスリン抵抗性がリセットされる」という作業仮説をたてた。

12週齢の Wistar雌ラットを、正常飼料で飼育した群(C)とカルシウム欠乏飼料で飼育した群(D)の2群に分け、それぞれを正常飼料雄ラットと交配させた。そして出生した仔をDD, DC, CC, CD（はじめの文字が生んだ母獣、2番目の文字が哺乳の母獣）の4群に分け、21生日まで保育させた。離乳期からは正常飼料を与え、生後200日に、体重、血圧、脈拍を測定後、断頭で採血し肝臓を摘出した。肝臓からmRNAを抽出し、11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 (11 $\beta$ -HSD1)のリアルタイムPCRを行った。内部標準として Cyclophilin-RNAで補正した。分離凍結した血清で、後日アディポサイトカインとインスリン抵抗性の指標となるバイオマーカーを測定した。

#### 4. 研究成果

( 1 ) 「母獣の低カルシウム状態が胎児のグルココルチコイド関連遺伝子のエピジェネティクスに影響し、メチル化変化をきたす。」

【結果】生後21日で低カルシウム母獣からの仔における肝臓組織の11 $\beta$ -HSD1のメチル化は低下していた。

【結論】低カルシウム母獣からの仔は、11 $\beta$ -HSD1のメチル化が低下するために活性が上昇してグルココルチコイド作用が亢進し、将来メタボリックシンドロームになると考えられる。

( 2 ) 「カルシウム欠乏母獣ラット仔のエピジェネティクス変化から肝11-Hydroxysteroid Dehydrogenase-1発現亢進によりインスリン抵抗性が獲得される。」

【結果】1)カルシウム欠乏母獣からの仔で雄は有意にHOMA-Rが上昇した。2)カルシウム欠乏母獣からの仔は有意に血清グレリンが低値であった。3)2群の血圧、心拍数、血糖、アディポネクチンに有意差はなかった。4)低カルシウム群で11 $\beta$ -HSD1が上昇し、PEPCKのmRNAは対照に比べて有意に低下した。しかし、GR、PPAR $\alpha$ と11 $\beta$ -HSD2のmRNA発現には両群に差は認めなかった。

【結論】低カルシウム食では11 $\beta$ -HSD1が上昇してグルココルチコイドを活性化し、メタボリックシンドロームの誘因となると考えられた。またインスリンが上昇することにより、糖新生の律速酵素であるPEPCKが低下して、代償性に糖新生を抑制していると思われた。以上より、カルシウム欠乏によるグルココルチコイド代謝の変化は、メタボリックシンドローム発症の重要な一因と考えられる。

( 3 ) 「ミスマッチ里親の授乳保育がインスリン抵抗性を決定する；カルシウム欠乏母獣の仔ラットモデルによる検討」

【結果】正常飼料で飼育した群(C)とカルシウム欠乏飼料で飼育した群(D)の2群に分け、出生した仔をDD, DC, CC, CD（はじめの文字が生んだ母獣、2番目の文字が哺乳の母獣）の4群に分けて検討した結果、1)出生時および生後21日の体重に各群で差は認めなかった。2)生後200日における4群の血圧、心拍数、血糖に有意差はなかったが、雌雄ともDCの体重は有意に重かった。3)低カルシウム母獣からの仔(DDとDC)は雄のみ、血清インスリンが高値で、インスリン抵抗の指数であるHOMA-IRは有意に高かった。4)雄DDは11 $\beta$ -HSD1のmRNA発現は低かった。

【結論】低カルシウム母獣からの雄仔は、インスリン抵抗性を獲得している。また生んだ母獣と異なるカルシウム栄養状態の里親に授乳保育された仔は、出産と授乳が同じカルシウム栄養状態の母獣に養育された仔に比べて、11 $\beta$ -HSD1の発現が亢進した。以上より、母獣のカルシウム欠乏は胎児にエピジェネティクス変化を与え、胎児期に設定されたプログラムにミスマッチした母獣に授乳保育されることは、成獣の段階でメタボリックシンドローム発症の一因になると考えられる。

#### 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 6 件)

Takaya J, Tanabe Y, Kuroyanagi Y, Kaneko K. Asymmetric dimethylarginine is negatively correlated with hyperglycemia in children. *Endocr J.* 2015 Apr 22. 査読有

Takaya J, Yamanouchi S, Kaneko K. A calcium-deficient diet in rat dams during gestation and nursing affects hepatic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 expression in the offspring. *PLoS One.* 2014 Jan 10;9(1):e84125.doi:10.1371/journal.pone.0084125. 査読有

Takaya J, Iharada A, Okihana H, Kaneko K. A calcium-deficient diet in pregnant, nursing rats induces hypomethylation of specific cytosines in the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 promoter in pup liver. *Nutr Res.* 2013 Nov;33(11):961-70. doi: 10.1016/j.nutres.2013.07.015. 査読有

Takaya J, Iharada A, Okihana H, Kaneko K. Down-regulation of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in magnesium-deficient rats. *Magnes Res.* 2012 査読有 Jul-Sep;25(3):131-9. doi: 10.1684

Takaya J, Iharada A, Okihana H, Kaneko K. Upregulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 expression in calcium-deficient rats. *Ann Nutr Metab.* 2011;59:73-78. 査読有

高屋淳二, 山内壮作, 居原田安奈, 金子一成。母獣ラットのカルシウム不足は

仔 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 プロモータ領域のメチル化を低下させる。ホルモンと臨床。2014、60 巻 (12 号) 985-988、査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

Takaya J, Tanabe Y, Kuroyanagi Y, Kaneko K. Asymmetric dimethylarginine is negatively correlated with hyperglycemia in children. The 11<sup>th</sup> Asian Society for Pediatric Research. 2015 年 4 月 16 日 Osaka International Convention Center (Osaka, Japan)

Takaya J, Yamanouchi S, Kaneko K. A calcium-deficient diet in rat dams during gestation and nursing affects hepatic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 expression in the offspring. Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting. 2014 年 5 月 5 日 Vancouver Convention Center (Vancouver, Canada)

高屋淳二, 田邊裕子, 黒柳裕一, 金子一成。糖尿病患児における血糖と Asymmetric dimethylarginine の相関。第 48 回小児内分泌学会、2014 年 9 月 26 日、アクトシティ浜松 (静岡、浜松)。  
高屋淳二, 山内壮作, 田邊裕子, 金子一成。ミスマッチ里親の授乳保育がインスリン抵抗性を決定する;カルシウム欠乏母獣の仔ラットモデルによる検討。第 47 回日本小児内分泌学会学術集会。2013 年 10 月 10 日、浅草ビューホテル (東京、浅草)。

高屋淳二, 居原田安奈, 金子一成。妊娠ラットのカルシウム不足は仔 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 プロモータ領域メチル化を低下させる。第 46 回日本小児内分泌学会学術集会。2012 年 9 月 27 日、大阪国際会議場 (大阪府、大阪市)。

高屋淳二, 金子一成。カルシウム欠乏ラットは肝 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 発現亢進によりインスリン抵抗性が獲得される。第 39 回日本小児栄養消化器肝臓学会。2012 年 7 月 15 日、梅田シティ梅田スカイビル (大阪府、大阪市)。

#### 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・非常勤講師

研究者番号: 80247923