

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350134

研究課題名(和文) 線虫を用いた生活習慣病胎児期起源説の分子遺伝学的研究

研究課題名(英文) Analysis of Molecular Mechanism of Fetal Origin of Adult Diseases using *C. elegans*.

研究代表者

松本 晋也 (Matsumoto, Shinya)

京都女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：30263156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内で十分に成長することができなかった胎児は栄養を貯めやすい体質を獲得し、その結果成人後生活習慣病に罹りやすくなるという成人病胎児期起源説が注目を集めている。申請者はこれまでに線虫(*C.elegans*)に飢餓を施すと後代線虫の脂肪蓄積量が増えることを見出している。それに基づき、本課題では線虫を使って成人病胎児期起源説の分子機構をエピジェネティクスの観点から解析した。その結果、飢餓を経験した親線虫と経験していない親線虫の後代ではヒストンH3タンパク質の特定のリジン残基のメチル化パターンが異なっている可能性があることがわかった。このことは成人病胎児期起源説の仕組みを調べるための突破口になりえる。

研究成果の概要(英文)：Low-birth weight resulted from intrauterine growth retardation is thought to be a risk factor of adult diseases such as diabetes, obesity and cardiovascular dysfunction according to the Fetal Origin of Adult Diseases Theory. However, how the intrauterine growth retardation leads the infant susceptible to adulthood disease is not well understood. We have shown that when *C.elegans*, a widely used experimental model of multi-cellular organism, was deprived of food, their progeny accumulated more fat than their counterpart, indicating *C.elegans* can be a good model for analyzing Fetal Origin of Adult Diseases Theory. We have shown that genes involved in methylation of certain lysine residues in H3 histone are differentially expressed in worms derived from starvation-experienced worms compared to those of worms derived from fed-worms. Our result indicates that epigenetic modification in histone may be responsible for Fetal Origin of Adult Diseases Theory.

研究分野：Molecular Nutrition

キーワード：C.elegans starvation FOAD DOHaD

## 1. 研究開始当初の背景

近年の肥満の増加は、食べ過ぎと運動不足が原因であるとするのが現在の考え方である。このように、出生後の生活習慣・環境に原因を求めるのに対して、今の世代は太りやすい体質として生まれており、それが原因(あるいは一因)となって肥満が増えているという仮説が提唱されている。この仮説は、出生前に原因を求めるものであり、生活習慣病胎児期起源説と呼ばれている。FOAD 説による生活習慣病発症の機序は以下のように考えられている。

母体の栄養不足により、胎児が子宮内で十分に成長できなくなる。これを子宮内成長遅延 IUGR:(Intra-Uterine Growth Retardation)と呼ぶ。

IUGR は胎児が生まれ出る世界には食べものが足りないというシグナルになる。

出生後の食べもの不足に備えるため、胎児は太りやすい体質に変化する。

生まれ出た世界には食べものが溢れているので、太りやすい体質に過食と運動不足が加わり、生活習慣病に罹患するリスクが高くなる。

FOAD 説はまだ仮説の域を脱していないが、これを支持する知見のひとつに「オランダ冬の飢餓事件」がある。ナチスドイツにより引き起こされたこの飢餓を胎児として経験した世代では、成人後脂質異常症、循環器系疾患が高い割合で見出された。また、IUGR の指標である低出生体重は、成人後虚血性心疾患、腎糸球体ネフロン減少、膵臓β細胞の減少との関連性が報告されている(それぞれ高血圧、糖尿病リスクを高める)。さらに、母獣への栄養を制限すると、仔獣の内臓脂肪が増加する。

日本では他国と比べて、低出生体重児が突出して多い(全出生児の9.6%)。低出生体重はIUGR の指標なので、FOAD 説の観点からすれば日本では生活習慣病リスクの高い子供が増えているといえる。したがって、FOAD 説の真偽を含め、その実態、影響、メカニズムを明らかにすることは重要である。しかし、FOAD 説を解析するには妊娠中の動物を絶食させる必要があるため、ヒトや動物を用いて調べることは倫理的、実験操作的な困難が伴う。

線虫(*Caenorhabditis elegans*)は、多細胞生物を研究するモデル生物として1970年代から計画的に開発が進められており、変異体バンクの充実、全ゲノム配列・全細胞系譜・全シナプス結合の解明、遺伝子導入法の確立など

実験動物としての基盤整備は群を抜いている。その基盤を利用して寿命、記憶、筋肉生理学、アポトーシス、RNA 干渉(RNAi)、miRNA といった生命現象を分子レベルで解明するのに大きく貢献した。申請者は、線虫を使えば FOAD 説の検証ができるのではないかと考え、飢餓を経験した親線虫から生じた子線虫の寿命、運動能力、脂肪蓄積量、生殖能力がどのような影響を受けるかを検討した(挑戦的萌芽研究 H24-25 年度)。その結果、脂質結合性蛍光試薬 NileRed を使った画像解析から、子線虫の脂肪蓄積量が増えることを見出した。飢餓を経験したのはあくまで親線虫であり、子線虫は飢餓を全く経験していないことから、この結果は、親世代の低栄養が引き金となって子世代が太りやすい体質に変化したことを示すものであり、FOAD 説と合致する(なお、寿命、運動能力、生殖能力には差が認められなかった)。この結果から以下2点を明らかにした。

- i)線虫でも FOAD 説が成り立つこと
- ii)FOAD 説のメカニズムを研究するモデル生物として線虫が使えること

日本は、諸外国に比べ低出生体重児が突出して多く、かつ一貫して増えている。これは、妊婦のやせ志向とともに、「小さく産んで大きく育てる」という出産・育児トレンドが影響しているものと思われる。FOAD 説が正しいならば、日本の現状は将来の医療、社会福祉、国民生活に大きな問題を生じさせる可能性がある。したがって、FOAD 説を研究することは重要であり、線虫を用いた本課題が FOAD 説の理解に新しい切り口を提供できると期待される。

## 2. 研究の目的

上記成果のもと、本課題では FOAD 説の真偽、実態、メカニズムを線虫を用いてさらに深く解析することを目的に遂行する。そのために、子世代の脂肪量に焦点を絞り、次の2点①②を明らかにすることを目的に研究を進めた。  
**①子世代の脂肪蓄積量が増えるという結果をさまざまな手法で確認する**  
**②次世代の体質変化の原因がエピジェネティクス変異なのかを検討する**

## 3. 研究の方法

**①子線虫の脂肪量が増えるというデータを多面的に確認する**

親線虫が飢餓を経験すると子線虫の脂肪

量が増えるという研究結果は、NileRed を使った蛍光画像解析実験から得られた。再現性は確認しているものの、画像解析では目的の物質とは全く無関係の蛍光・発色が生じることがある。よって、この結果を画像解析以外の手法で徹底的、多面的に追試・検証し、確固たるものにする必要がある。そのため、下記 i)~ii)をおこなった。

i) 機器分析により脂肪蓄積量が増えていることを直接確認する

子線虫から脂肪を抽出し、TLC(薄層クロマトグラフィー)と GCMS(ガスクロマトグラフィー質量分析計)を使って定量分析する。これにより、子線虫の脂肪量が増えることを直接確認する。また、機器分析に加え、生化学的定量法も駆使して脂肪量を定量する。

ii) 脂肪代謝関連遺伝子の発現変動を解析する  
脂肪量が増えたなら、脂肪代謝関連遺伝子の発現量に変化が生じている可能性がある。例えば、脂肪酸合成酵素などの合成系遺伝子群の発現が亢進したり、 $\beta$ 酸化関連酵素など分解系遺伝子の発現が抑制されることが予想される。そこで、これら脂肪代謝関連遺伝子の発現を RT-PCR にて解析し、脂肪量が増えることを遺伝子発現のレベルから補強する。具体的には、脂肪酸合成酵素、アシルトランスフェラーゼ、マロニル CoA 合成酵素(以上合成系)遺伝子、 $\beta$ 酸化関連酵素(分解系)遺伝子、および脂質代謝を制御する転写因子 SREBP, PPAR 遺伝子を対象とした。

**②子線虫にエピジェネティクス変化が生じているのか解析する**

飢餓を経験していない子線虫の脂肪量が増えたのは、親線虫の飢餓体験が子線虫にエピジェネティクス変異をもたらしたからではないかと考えられる。前述のように、エピジェネティクス変異には、DNA のメチル化とヒストンタンパク質の修飾が知られている。そこで、子線虫において、エピジェネティクス変異が実際に生じているかを検討するため、以下をおこなった。

i) 子線虫のヒストン修飾パターンの解析

ヒストンがメチル化、アセチル化などの修飾を受けることでクロマチン構造が変化し、それによって遺伝子の発現パターンが恒久的に変化するというのがもう一つのエピジェネティクス変異である。し

たがって、脂肪量が増えた子線虫ではヒストンが修飾を受けている可能性があると考えている。修飾を受けたヒストンは抗ヒストン抗体を用いた Western 解析で検出することができる。これを利用して、子線虫のヒストンが修飾を受けているかを解析し、ヒストン修飾が子線虫の脂肪量増加の原因であるかを検討した。

4. 研究成果

**①飢餓を経験した線虫の後代における脂肪蓄積量の増加**

飢餓を経験した線虫から生じた後代線虫から脂肪画分を抽出し、生化学的な手法で定量したところ、飢餓を経験していない線虫の後代にくらべ有意に増加していることを見出した。一方、GCMS での解析では技術的な到達度に問題があったことから、明確な結果は得られなかった。

**②脂肪代謝関連遺伝子群の発現変動に解析**

脂肪合成遺伝子群(脂肪酸合成遺伝子、足ルトランスフェラーゼ、マロニル CoA 合成遺伝子)、資質代謝制御転写因子遺伝子群(SREBP)は大きな発現変動は認められなかったが、脂肪分解遺伝子群( $\beta$ 酸化関連遺伝子)の発現は減少していた。このパターンは、脂肪蓄積と矛盾しない。

**③後代線虫でのエピジェネティクス変異**

後代線虫から抽出したヒストンのウエスタン解析から、ヒストン H3 の特定のリジン残基のメチル化の程度に違いがあることが示唆された。

以上の結果から、線虫でも FOAD 説に類似の整体応答が認められる可能性があること、そしてその応答はヒストンのメチル化を介したエピジェネティクス変異に起因する可能性があることがわかった。

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 1 件)

Divided consumption of late-night-dinner improves glucose excursions in young healthy women: A randomized cross-over clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 136, 78-84(2018) Kajiyama S, Imai S, Hashimoto Y, Yamane C, Miyawaki T, Matsumoto S, Ozasa N, Tanaka M, Kajiyama S, Fukui M. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

C.elegans を用いた生活習慣病胎児期起源説のエピジェネティック解析

日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋)  
磯部 芙久子, 坂上 美登理, 西田 彩乃, 岡田 嵯和子, 下地 頭所理美, 齋藤 春佳, 清水 愛, 森下 真有, 山本 佳苗, 宮前 さつき, 松本 晋也

繰り返し絶食を経験した C. elegans のおける脂肪蓄積量の増加

日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋)  
松本 晋也, 澤永 朱里, 山本 さゆり, 佐藤 奈生, 長尾 美咲, 山本 佳苗, 山本 玲奈, 岡部 祐実

Repeated starvation leads to fat accumulation in C.elegans.

The 21th International C.elegans Meeting, UCLA (Los Angeles, USA) 2017

Shinya Matsumoto, Rena Yamamoto, Kanae Yamamoto, Misaki Nagao, Nao Sato, Yukari Yamamoto, Akari Sawanaga

線虫を用いた繰り返し絶食が生体に及ぼす影響の検討

日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都)

松本 晋也, 山本 玲奈, 山本 佳苗, 長尾 美咲, 佐藤 奈央, 山本 さゆり, 澤永 朱里

Analysis of intergenerational effects of starvation.

The 20th International C.elegans Meeting, UCLA (Los Angeles, USA) 2015

Shinya Matsumoto, Haruka Saito, Midori Ogai, Mayu Morishita, Megumi Sei, Sawako Okada, Ayano Nishida, Akari Sawanaga, Midori Sakagami, Kosuke Kato, Yasuki Matsumura

〔図書〕(計 3 件)

新食品栄養科学シリーズ食品衛生学 (化学同人): 川添禎浩 (編): 松本 晋也, 他執筆者 7 名

執筆担当: 第 4 章第 4 節食品媒介感染症寄生虫症 pp.52-61 (平成 29 年 9 月 15 日)

食べ物と健康シリーズ食品の科学 (南江堂) 独立行政法人国立健康・栄養研究所 (監) 太田英明, 北畠直文, 白土英樹 (編)  
松本 晋也, 他執筆者 21 名

執筆担当: 第 2 章 D 炭水化物 (糖質, 食物繊維) pp.43-56 (平成 27 年 3 月 10 日)

新食品栄養科学シリーズ基礎栄養学 (化学同人) 灘本知憲, 仲佐輝子 (編) 松本

晋也, 他執筆者 8 名

執筆担当: 第 10 章食物の摂取, 第 11 章消化・吸収と栄養素の体内動 pp.155-192 (平成 27 年 3 月 10 日)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 晋也 (MATSUMOTO, Shinya)

京都女子大学・家政学部・食物栄養学科・准教授

研究者番号: 30263156

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

齋藤 春佳 (SAITO, Haruka)

小粥 みどり (OGAI, Midori)