

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16537

研究課題名(和文) 妊婦低栄養とエピジェネティクス変化との関連性に関する研究

研究課題名(英文) The investigation of relationship between maternal undernutrition and epigenetic changes

研究代表者

舟橋 伸昭 (Funahashi, Nobuaki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：30727491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低出生体重は成長後の様々な生活習慣病のハイリスクであるとするDOHaD説が確立しつつあるが、分子機序は不明である。そこで、臍帯血、胎盤の標的遺伝子のDNAメチル化率をパイロシーケンシング法で測定し、胎盤重量、児の出生体重との関連を検討した。その結果、胎盤重量と臍帯血NDUFB6, NR3C1, PPARGC1, 胎盤NDUFB6, LIT1, MEG3, PPARGC1のDNAメチル化率には有意な相関を認めた。また、出生体重と胎盤H19, NDUFB6, MEG3, RXRAのDNAメチル化率に有意な相関を認めた。従って、出生体重、胎盤重量といくつかの遺伝子のDNAメチル化には関連性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The DOHaD hypothesis is being established that low birth weight is high risk of metabolic syndromes after growth. The underlying molecular mechanisms are unclear. In this study, we measured DNA methylation levels of candidate target genes using bisulfite-pyrosequencing in human umbilical cord blood and placenta. We assessed that the relationships among birth weight, placental weight, and DNA methylation of candidate genes. We found significant correlation between placental weight and NDUFB6, NR3C1, or PPARGC1A DNA methylation levels of umbilical cord blood. We observed significant correlation between placental weight and NDUFB6, LIT1, MEG3, or PPARGC1 DNA methylation levels of placenta. We found significant correlation between birth weight and H19, NDUFB6, MEG3, or RXRA DNA methylation levels of placenta. Thus, we revealed that the relationships among birth weight, placental weight, and DNA methylation of several candidate genes.

研究分野：代謝学, 分子生物学

キーワード：生活習慣病 DOHaD エピジェネティクス 糖尿病 DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

現在の日本では、低出生体重児（出生体重2500g以下）の頻度が増加傾向にある。平成27年の人口動態調査によると、低出生体重児の割合は9.5%（男8.4%、女10.6%）であり、依然として高い割合を推移している。これはOECD加盟国の中で最も頻度が高い状態である。また、出生体重の低下によるリスクとして、生活習慣病の罹患率との関係がある。これまでの疫学研究による報告として、低出生体重との関連が明確な疾患は2型糖尿病をはじめ、心血管疾患、高血圧、脂質代謝異常、脳梗塞、神経発達異常などが挙げられる。出生体重が低下する原因は早産や多胎などを含めていくつかあるが、日本では若い女性の「やせ」が顕著であり、低出生体重の重要な原因として、妊娠時の母体低栄養状態が考えられる。

第2次世界大戦中、「Dutch famine（オランダ冬の飢餓事件）」と呼ばれる食糧難が起き、この時に胎内で低栄養にさらされた児は、成長した後にさまざまな生活習慣病の発症リスクが上昇した。同様の現象をもとに、Barkerらにより、生活習慣病の素因は「胎生期ならびに乳幼児期の環境と遺伝子の相互作用により形成され、出生後の生活習慣の負荷が加わって発症する」という説が提唱された。この概念は現在、「Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説」と呼ばれており、数多くの疫学研究により支持されている。DOHaD 説によると、低出生体重児の増加しているわが国では、今後の生活習慣病の増加など、次世代の健康に影響が生じる可能性が大いに懸念され、国民健康上喫緊の課題である。

DOHaD 説の解釈としては、臓器形成期に低栄養状態に曝露されると、低栄養に適応した臓器形成（「adaptive response」）が行われるため、臓器の異常が起き、さらに成長してから過栄養の状況に対応できないため生活習慣病が生じる、という考え方が有力である。分子メカニズムとしては、DNAメチル化やヒストン修飾（アセチル化、メチル化、ユビキチン化など）、マイクロRNAなど、ゲノム配列の変化をとまわずに長期間にわたって遺伝子発現調節変化が維持される、いわゆる「エピゲノム調節」の変化が寄与していると想定されているが、動物実験でも同様のモデル系でエピゲノム変化を示した報告は限られており、ヒトではほとんど報告がない。

このような背景のもと、我々は、妊娠母体の栄養状態を客観的に把握し、同時に母児の臓器への分子的影響を検討する前向きコホート「バースコホート」を構築してきた。本研究課題では、我々は構築した「バースコホート」の検体を用いて、児の出生体重、胎盤重量と母児の組織（臍帯血、胎盤）のDNAメチル化状態との関連を検証した。

### 2. 研究の目的

DOHaD 説に基づく生活習慣病の病態解明とその予防法の開発のための基盤的なデータの収集を目的とする。

### 3. 研究の方法

91検体の臍帯血と126検体の胎盤からゲノムDNAを抽出し、バイサルファイト処理を行った。DNAメチル化率は、PyroMarkQ24を用いてパイロシーケンス法にて定量した。標的遺伝子としては、代謝系遺伝子として *LEP*, *NDUFB6*, *PPARA*, *NR3C1*, *PPARGC1A*, *HSD11B2*, *ADIPOQ*, *RXRA* の8つの遺伝子、インプリンティング遺伝子として *MEST*, *LIT1*, *SNRPN*, *H19*, *MEG3* の5つの遺伝子、また global な DNAメチル化を反映する繰り返し配列の LINE1 の、合計14個を選択した。各組織におけるDNAメチル化率を測定後、胎盤重量と出生体重との比較・検討を行った。統計的解析は、Pearsonの相関係数  $r$  を求めて検定を行い、 $p < 0.05$  を有意と判定した。

### 4. 研究成果

(1) 出生体重、胎盤重量と臍帯血、胎盤における標的遺伝子のDNAメチル化率との関連性の検討

これまでに、出生体重と胎盤重量との間には高い正の相関関係があることが報告されている。そこで、まず、我々の「バースコホート」の検体においても同様の結果が得られるかを検討した。その結果、出生体重と胎盤重量とのPearsonの相関係数は  $r = 0.514$ （有意差  $p = 3.11 \times 10^{-11}$ ）であり、有意な相関関係があることが示された。従って、我々が構築した「バースコホート」の検体においても、過去の報告と一致することが示された（図1）。

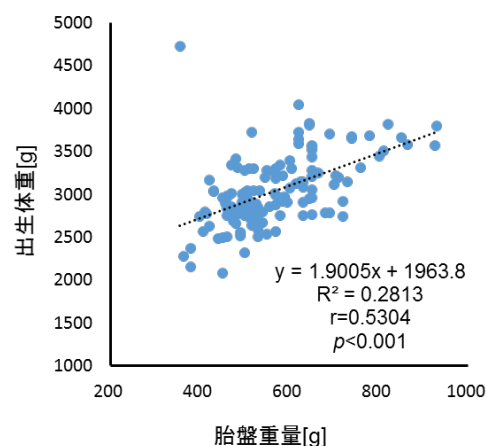


図1 出生体重と胎盤重量との関係

次に91検体の臍帯血と126検体の胎盤のゲノムDNAを用いて、代謝系遺伝子、インプリンティング遺伝子、LINE1の合計14種類の遺伝子のDNAメチル化率を測定し、出生体重、

胎盤重量と比較・検討した。その結果、出生体重と胎盤の標的遺伝子の DNA メチル化率で有意な相関関係が認められたものは、*H19*, *NDUFB6*, *MEG3*, *RXRA* で、それぞれ Pearson の相関係数  $r=-0.223$  (有意差  $p=0.019$ ) ,  $r=-0.217$  ( $p=0.019$ ) ,  $r=0.232$  ( $p=0.012$ ) ,  $r=0.435$  ( $p=9.35 \times 10^{-7}$ ) であった (図 2)。一方で、出生体重と臍帯血の標的遺伝子の DNA メチル化率で相関関係が認められたものはなかった。

胎盤重量と臍帯血における標的遺伝子の DNA メチル化率で有意な相関関係が認められたものは、*NDUFB6*, *NR3C1*, *PPARGC1* で、それぞれ Pearson の相関係数  $r=0.418$  (有意差  $p=3.38 \times 10^{-5}$ ) ,  $r=-0.226$  ( $p=0.03$ ) ,  $r=-0.281$  ( $p=0.0139$ ) であった。また、胎盤における標的遺伝子の DNA メチル化率で有意な相関関係が認められたものは、*NDUFB6*, *LIT1*, *MEG3*, *PPARGC1* で、それぞれ Pearson の相関係数  $r=-0.251$  (有意差  $p=0.0059$ ) ,  $r=-0.242$  ( $p=0.0083$ ) ,  $r=0.229$  ( $p=0.012$ ) ,  $r=-0.203$  ( $p=0.027$ ) であった (図 3)。

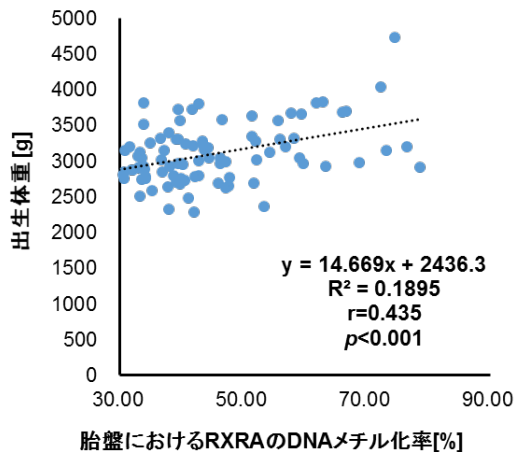


図 2 出生体重と胎盤における *RXRA* の DNA メチル化率との関連

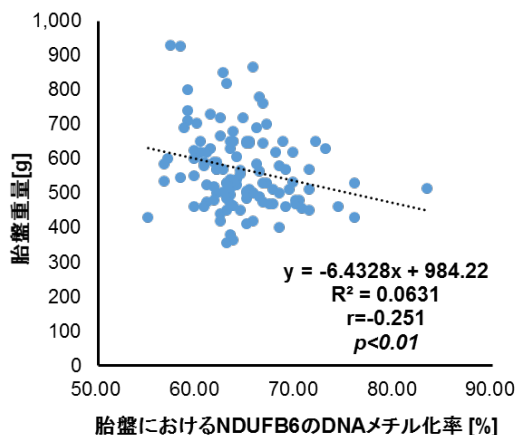


図 3 胎盤重量と胎盤における *NDUFB6* の DNA メチル化率との関連

このように、我々は、出生体重、胎盤重量と有意な相関関係を持つ遺伝子の DNA メチル化状態をいくつか見出すことができた。今後は、妊婦の栄養状態と標的遺伝子の DNA メチル化状態を比較し、どのような栄養成分が DNA メチル化状態を含めたエピゲノム状態に影響を及ぼすのかを検討する。

## 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 5 件)

Kuramoto J, Arai E, Tian Y, Funahashi N, Hiramoto M, Nammo T, Nozaki Y, Takahashi Y, Ito N, Shibuya A, Ojima H, Sukeda A, Seki Y, Kasama K, Yasuda K, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation analysis during non-alcoholic steatohepatitis-related multistage hepatocarcinogenesis: comparison with hepatitis virus-related carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 査読有, Vol.38, 2017, 261-270. doi: 10.1093/carcin/bgx005.

Okada Y, Naruse H, Tanaka T, Funahashi N, Regan ER, Yamakawa K, Hino N, Ishimoto K, Doi T, Aird WC. Expression of the Robo4 receptor in endothelial cells is regulated by two AP-1 protein complexes. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, Vol.467, 2015, 987-991. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.029

Nishimura W, Ishibashi N, Eto K, Funahashi N, Udagawa H, Miki H, Oe S, Noda Y, Yasuda K. Demethylation of the MafB promoter in a compromised  $\beta$ -cell model. *J Mol Endocrinol*, 査読有, Vol. 55, 2015, 31-40. doi: 10.1530/JME-15-0042.

Hirota Y, Nakagawa K, Sawada N, Okuda N, Suhara Y, Uchino Y, Kimoto T, Funahashi N, Kamao M, Tsugawa N, Okano T. Functional characterization of the vitamin K2 biosynthetic enzyme UBIAD1. *PLoS One*, 査読有, Vol, 10, 2015. e0125737

Funahashi N, Hirota Y, Nakagawa K, Sawada N, Watanabe M, Suhara Y, Okano T. YY1 positively regulates human UBIAD1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有 Vol,460, 2015, 238-244. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.018.

[学会発表](計 14 件)

宇田川陽秀, 南茂隆生, 舟橋伸昭, 平本正樹, 西村渉, 松本健治, 関洋介, 笠間和典, 安田和基,  
高度肥満患者および肥満マウス由来内臓脂肪・皮下脂肪発現遺伝子の比較解析,  
第 37 回日本肥満学会, 2016 年 10 月 7 日 ~ 10 月 8 日, 東京ファッションタウン

舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 上番増喬, 西村渉, 平本正樹, 松本健治, 関洋介, 笠間和典, 安田和基,  
日本人高度肥満症由来 NASH 肝のトランスクリプトーム解析,  
第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会, 2016 年 7 月 16 日, 石川県立音楽堂邦楽ホール・交流ホール

舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 中西美紗緒, 矢野哲, 箕浦茂樹, 福岡秀興, 安田和基,  
妊婦栄養状態と DNA メチル化状態との関連性の検討,  
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 19 日 ~ 5 月 21 日, 国立京都国際会館

南茂隆生, 宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 川口美穂, 上番増喬, 平本正樹, 西村渉, 安田和基,  
ゲノム網羅的解析結果を用いた膵島代償機序の検討,  
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 19 日 ~ 5 月 21 日, 国立京都国際会館

宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 西村渉, 平本正樹, 川口美穂, 南茂隆生, 安田和基,  
脂肪細胞培養上清によるグルココルチコイド受容体を介した膵β細胞機能変化,  
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 19 日 ~ 5 月 21 日, 国立京都国際会館

安田和基, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 舟橋伸昭, 平本正樹, 西村渉, 松本健治, 関洋介, 笠間和典,  
高度肥満患者由来内臓脂肪・皮下脂肪の遺伝子発現の比較解析,  
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 19 日 ~ 5 月 21 日, 国立京都国際会館

舟橋伸昭,  
妊婦栄養とエピジェネティクス変化との関連性の検討,  
第 12 回 Diabetes Research Forum in Tokyo, 2015 年 10 月 20 日, パレスホテル東京

宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 平本正樹, 川口美穂, 西村渉, 南茂隆生, 安田和基,  
脂肪細胞培養上清による膵β細胞機能変化,  
第 36 回日本肥満学会, 2015 年 10 月 2 日 ~ 10 月 3 日, 名古屋国際会議場

安田和基, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 平本正

樹, 西村渉, 上番増喬, 舟橋伸昭, 金井弥栄, 松本健治, 斎藤嘉朗, 関洋介, 笠間和典,  
高度肥満患者由来の脂肪組織の多層的オミックス解析,  
第 36 回日本肥満学会, 2015 年 10 月 2 日 ~ 10 月 3 日, 名古屋国際会議場

舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 西村渉, 川口美穂, 矢野哲, 中西美紗緒, 箕浦茂樹, 福岡秀興, 安田和基,  
妊婦低栄養と DNA メチル化状態との関連性の検討へ向けて,  
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 21 日 ~ 5 月 24 日, 海峡メッセ

安田和基, 南茂隆生, 平本正樹, 西村渉, 宇田川陽秀, 上番増喬, 舟橋伸昭, 金井弥栄, 松本健治, 斎藤嘉朗, 関洋介, 笠間和典,  
高度肥満患者由来の脂肪組織の多層的オミックス解析,  
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 21 日 ~ 5 月 24 日, 海峡メッセ

宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 平本正樹, 川口美穂, 西村渉, 南茂隆生, 安田和基,  
脂肪細胞由来ステロイドホルモンによる GR を介した膵β細胞機能変化,  
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 21 日 ~ 5 月 24 日, 海峡メッセ

南茂隆生, 宇田川陽秀, 川口美穂, 舟橋伸昭, 上番増喬, 平本正樹, 西村渉, 安田和基,  
膵島のゲノム網羅的解析による膵島代償機序/糖尿病発症機序関連因子の同定,  
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 21 日 ~ 5 月 24 日, 海峡メッセ

安田和基, 南茂隆生, 平本正樹, 西村渉, 宇田川陽秀, 上番増喬, 舟橋伸昭, 金井弥栄, 松本健治, 斎藤嘉朗, 関洋介, 笠間和典,  
日本人肥満者由来 NASH 肝の多層的オミックス解析パネルの構築,  
第 2 回肝臓と糖尿病・代謝研究会, 2015 年 5 月 23 日, シーモールパレス

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

舟橋 伸昭 (FUNAHASHI, Nobuaki)  
国立国際医療研究センター研究所・代謝疾患研究部・研究員  
研究者番号: 30727491