

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11642

研究課題名（和文）DNAメチル化に着眼した母体高血糖によるエピゲノム記憶の解析と先制医療への応用

研究課題名（英文）Analysis of epigenetic memory induced by maternal hyperglycemia focusing on DNA methylation and its application to preemptive medicine

研究代表者

佐藤 直市（Sato, Naoichi）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70419547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により出生前後のマウス肝臓ではDNAメチル化が劇的に変化することが明らかとなった。また出生前後の肝臓の代謝機能の成熟にDNAメチル化の変化が重要であることが明らかとなり、その制御因子として複数の代謝に関連する転写因子が同定された。母体高血糖は出生仔の肝臓でのDNAメチル化、ヌクレオソームアセンブリなどクロマチン構造に関わるGOtermに属する遺伝子群の有意な発現変化を生じ、母体高血糖が出生前後の肝臓のDNAメチル化形成に影響する可能性が示唆された。本研究により出生児の将来的な生活習慣病発症のリスクの評価や治療標的としてDNAメチル化とその制御因子が有用な因子となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により出生児の将来的な生活習慣病発症のリスクの評価や治療標的としてDNAメチル化とその制御因子が有用な因子となりうることを示唆された。また出生前後の肝臓の代謝臓器としての機能成熟における遺伝子発現とDNAメチル化の変化、およびその制御因子についての基盤となるデータを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that DNA methylation changes dramatically in the mouse liver in prenatal period. The study also revealed that changes in DNA methylation are essential for the functional maturation of the liver as a metabolic organ in this period and identified several metabolism-related transcription factors as regulators of DNA methylation. Maternal hyperglycemia caused significant expression changes in a group of genes belonging to GOterms involved in chromatin structure, such as DNA methylation and nucleosome assembly, in the liver of the pups, suggesting that maternal hyperglycemia may affect the establishment of DNA methylation in the postnatal periods. This study suggests that DNA methylation and its regulators may be useful factors for assessing the risk of future development of lifestyle-related diseases in newborns and as therapeutic targets.

研究分野：糖尿病学

キーワード：DNAメチル化 エピゲノム記憶 糖脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病・肥満などの多くの代謝関連疾患の発症と進展には遺伝的因子と環境因子の複雑な相互作用が重要である。様々な疫学調査や動物実験を用いた解析から過去の一定時期に曝された環境により生じた代謝機能の変化が、長期にわたり持続し、代謝関連疾患の易罹患性やその合併症の発症リスクに影響することが報告され、“メタボリックメモリー”として着目されている。また母体の胎内環境や乳児期から新生児期の栄養状態は、出生児における成人後の生活習慣病や心血管疾患の易罹患性に継代的に影響を与えるという概念 (Developmental Origins of Health and Disease ; DOHaD) が提唱されている。これらの概念の分子機序として代謝関連遺伝子の DNA メチル化が重要とされているが、その分子基盤は明らかにされていない。

2. 研究の目的

出生前後の母胎環境は、出生児の将来的な生活習慣病発症リスク影響を及ぼす。本研究ではその分子機序として母胎環境が DNA メチル化に及ぼす影響を想定し、出生前後の肝臓の代謝臓器としての機能成熟に着目し、遺伝子発現・DNA メチル化の変化や関連について時期特異的に解析する。母胎環境の一つとして母体高血糖が出生児の肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響についても解析する。また遺伝子発現、DNA メチル化を制御する因子を同定し、鍵となる転写因子を同定することで出生前後の肝臓の機能成熟および DNA メチル化の関与についての基盤となるデータを構築する。

3. 研究の方法

(1) 出生前後のマウス出生仔の肝臓における時期特異的な DNA メチル化および遺伝子発現変化の網羅的解析

8 週齢の C57BL/6 マウスを交配し、膣栓を確認できた日を胎生 0.5 日 (E0.5) とし、胎生 18.5 日 (E18.5)、出生後 2 日 (P2)、16 日 (P16)、28 日 (P28) の 4 時点で産仔より肝臓を採取した。採取した肝臓より All Prep MInikit (Qiagen) を用いて RNA を採取し、SurePrint G3 Mouse Microarray8x60k v2.0 を用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。また採取した DNA を用いて Post-bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) 法を用いた全ゲノムバイサルファイトシークエンスによるメチローム解析を行った。

(2) DNA メチル化と遺伝子発現の変化との関連について統合的解析

マイクロアレイについては各時点において $n=2$ ずつサンプルを採取し、時点毎の比較にて 1.5 倍以上もしくは 0.67 倍以下の発現変化を認められた遺伝子群を differentially expressed genes (DEGs) と定義し、DAVID 2021 を用いたエンリッチメント解析を行った。PBAT 解析については各時点において $n=3$ ずつサンプルを採取し、時点間の比較においてメチル化レベルの差が 20% 以上かつ統計学的に有意 ($p<0.01$) となった CpG 領域を Differentially methylated region (DMR) と定義し、解析を行った。

(3) DNA メチル化の変化を制御する遺伝子についての解析

DNA メチル化と協調して発現が変化した遺伝子の制御因子について GenesetDB により解析した。

(4) 母体高血糖がマウス出生仔の肝臓における遺伝子発現の変化に及ぼす影響の解析

8 週齢の C57BL/6 雌マウスにストレプトゾトシンを 200 mg/kg の用量にて腹腔内投与し、投与後 1 週後に血糖値が 400 mg/dl 以上となった母体と同週齢の雄マウスを交配した。産仔より胎生 18.5 日 (E18.5)、出生後 2 日 (P2)、16 日 (P16)、28 日 (P28) の 4 時点で肝臓を採取し、マイクロアレイにより遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 出生前後のマウス肝臓における遺伝子発現変化の解析

E18.5、P2、P16、P28 の4時点で採取したマウスの肝臓を用いたマイクロアレイによる遺伝子発現解析(図1a)ではP2よりP16の期間においては他の期間と比較し、顕著な発現変化が認められた。また発現が変化した遺伝子群のGO解析では脂質代謝、異物代謝、脂肪酸β酸化、ステロイド代謝、コレステロール代謝に関連した遺伝子群が上位の遺伝子群として抽出された(図1b)。一方で発現が減少した遺伝子群のGO解析では細胞周期やアポトーシスに関連した遺伝子群が上位の遺伝子群として抽出された(データ非表示)。

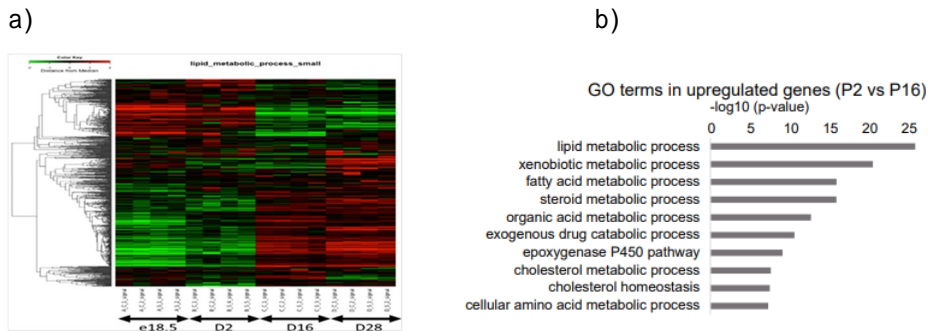


図1 出生前後のマウス肝臓における遺伝子発現変化 a) 各時点における肝臓を用いた経時的なマイクロアレイ解析(n=2). b) 出生後2日目から16日目にかけて発現が変化した遺伝子についてのGO解析

(2) 出生前後のマウス肝臓におけるDNAメチル化の網羅的解析

E18.5、P2、P16、P28 の4時点において産仔マウスの肝臓を用いたPBAT法によるメチローム解析ではE18.5よりP28にかけて34716箇所(differentially methylated regions, DMRs)を認め、8251箇所においてDNAメチル化の減少が認められた。P2よりP16の乳仔期におけるDMRsは33702箇所と最も多く、DNAメチル化の変化は顕著であった(図2a)。脂肪酸酸化に参与する遺伝子であるAcox2遺伝子のプロモーター領域では経時的なDNAメチル化の減少を認め、赤血球分化に必須の転写因子であるKlf1遺伝子については経時的なDNAメチル化の増加が認められた(図2b)。

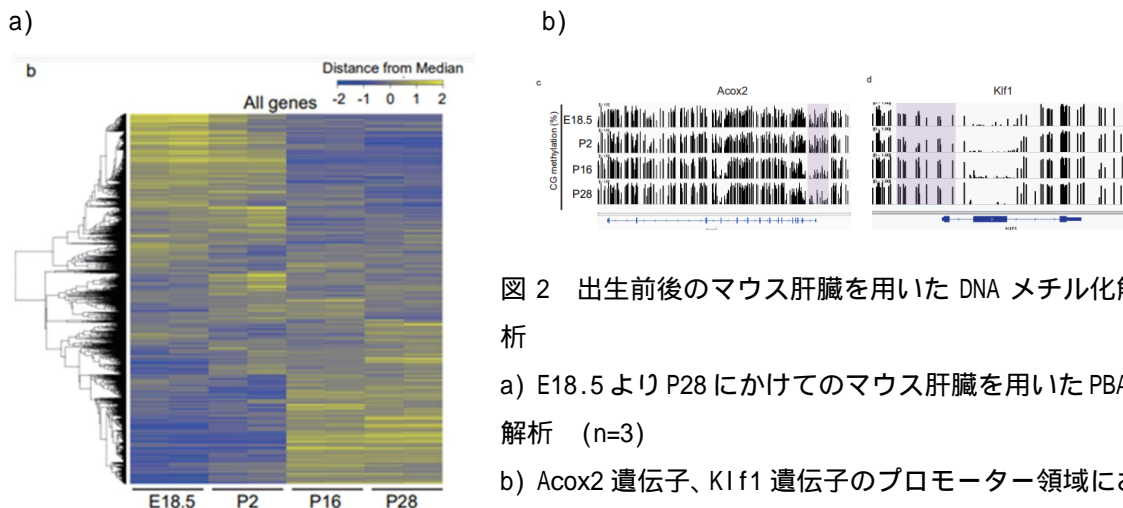


図2 出生前後のマウス肝臓を用いたDNAメチル化解析
a) E18.5よりP28にかけてのマウス肝臓を用いたPBAT解析 (n=3)
b) Acox2遺伝子、Klf1遺伝子のプロモーター領域におけるDNAメチル化の変化

(3) 出生前後のマウス肝臓における遺伝子発現と DNA メチル化の統合解析

DNA 脱メチル化と協調し遺伝子発現が上昇した遺伝子群について検討を行った。P2 から P16 にかけては発現が上昇した遺伝子 (4,795 遺伝子) の内、984 遺伝子 (20.5%) でプロモーター領域の DNA 脱メチル化を認めた (図 3a)。また E18.5 より P2、P16 より P28 にかけては発現が変化した 3915、2475 遺伝子については、DNA 脱メチル化した遺伝子がそれぞれ 6 遺伝子

(0.015%)、66 遺伝子 (0.027%) (データ非表示) となり、P2 から P16 にかけての遺伝子発現の変化に DNA メチル化が強く関与していることが明らかになった。また P2 から P16 にかけて DNA 脱メチル化、発現が上昇した遺伝子については GO 解析にて脂質代謝、脂肪酸代謝、コレステロール代謝、グリコーゲン代謝に関与する代謝関連遺伝子群が上位の遺伝子群として抽出された (図 3b)。GeneSetDB による解析により DNA メチル化の変化と関連する制御因子として HNF4、HNF1、NR2F1、PPAR、CEBP などの複数の転写因子を同定した (図 3c)。

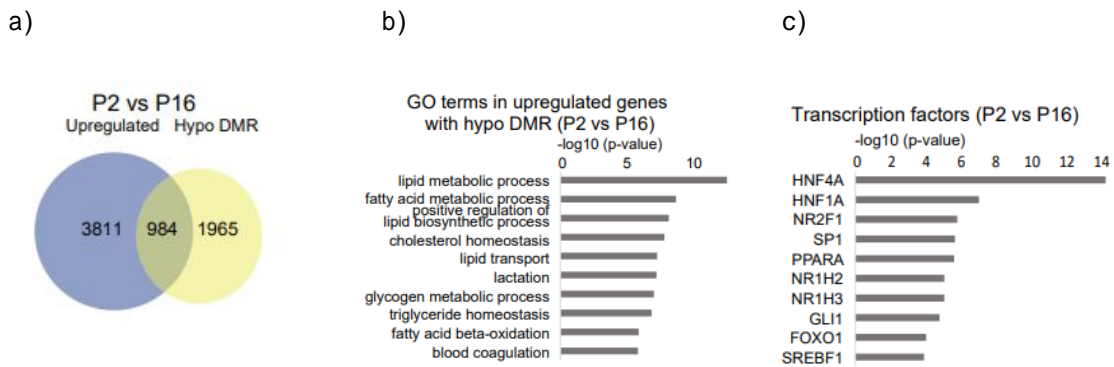


図 3 P2 から P16 において遺伝子発現が上昇と協調して DNA 脱メチル化した遺伝子群についての解析

a) 遺伝子発現が上昇した 4795 遺伝子の内、984 遺伝子で DNA 脱メチル化を認めた。b) 984 遺伝子についての GO 解析 c) 984 遺伝子の制御因子についての解析

(4) 母体高血糖がマウス出生仔の肝臓における遺伝子発現の変化に及ぼす影響の解析

ストレプトゾトシンにより高血糖を誘導した母体からの産仔の肝臓ではコントロールの産仔と比し、シトシンの DNA メチル化、ヌクレオソームアセンブリなどクロマチン構造に関わる GOterm に属する遺伝子群の有意な変化が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 矢野誠一
2. 発表標題 Defining the stage-dependent transcriptome and methylome in the mice liver during perinatal metabolic maturation
3. 学会等名 American Diabetes Association 83rd Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤 直市、森永 秀孝、小川 佳宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 糖尿病・肥満をはじめとする代謝関連疾患とエピゲノム	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------