

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18147

研究課題名(和文)母体栄養状態による胎児期エピゲノム変化を介した前立腺肥大症発生病機構の解明

研究課題名(英文)Maternal diet during gestation affect prostatic tissue component in SHR/Izm offspring

研究代表者

柴森 康介 (Shibamori, Kosuke)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30780845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：目的：胎生期母体栄養状態が仔の前立腺に与える影響について検討した。
方法：自然発生高血圧ラットを妊娠初期より通常食(S)群、蛋白質制限食(R)群、高脂肪食(HF)群の3群に振り分け、出生後は通常食で管理した。前立腺腹葉(VP)に対して蛍光免疫染色を行い上皮間質細胞面積を計測、遺伝子解析を行った。
結果：上皮細胞面積はR群で有意に増加し間質細胞面積はHF群で有意に増加した。Realtime PCRでは、転写因子に加えてR群はアポトーシス抑制因子Xiap、HF群では上皮間葉転換に関わる遺伝子群の発現増加を認めた。TGF経路のDNAメチル化解析では各群低メチル化状態であったが有意差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、胎生期の栄養状態が48週齢の前立腺組成変化に関わる可能性が示唆され、その原因としては前立腺における細胞増生、炎症、リモデリングなどが関わる可能性が示唆された。胎生期の母体低栄養は前立腺上皮増加に、胎生期の母体肥満は前立腺間質増加をきたし、その背景には低栄養ではアポトーシス抑制因子が、母体肥満ではEMTの関与が示唆された。本研究の意義として、BPH発症のエピゲノム機構が明らかとなれば、現行の α 1アドレナリン受容体やテストステロンに着目した治療と全く一線を画す治療戦略、リスク予測が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Purpose: We evaluated how maternal diet affect the prostate of their pups.
Methods: SHR/Izm female rats were randomly classified into 3groups, low-protein diet (LPD), standard diet (SD) and high-fat diet (HFD) group. They were fed only the specific diet during pregnancy. After delivery, all mothers and pups were fed the standard food. At 48 weeks of age, their prostate were removed. We evaluated the prostate by fluorescence immunostaining and genetic analysis.
Result: Epithelial area increased in LPD group, and stromal area increased in HFD group compared with the other groups. Real time PCR showed high expression of transcription factor, apoptosis inhibitor in LPD group and high expression of toll-like receptor, transcription factor, TGF beta and EMT associated gene in HFD group. Pyrosequencing DNA methylation analysis of TGF pathway showed that TGF β 1, TGF β R1, and Smad3 were hypomethylated in each group, however, there was no significant differences.

研究分野：前立腺肥大症

キーワード：前立腺肥大症 胎生期栄養状態 エピゲノム変化 低蛋白食 高脂肪食 DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症(BPH)は高齢男性において有病率の高い疾患であり、高齢化社会が進む今後も増加が予測されるが、前立腺が組織学的に肥大する明確な機序は未だに不明である。近年、胎生期の栄養状態の変化が、エピゲノム変化を介して仔の成人病に繋がるとする報告が多いものの、前立腺肥大症との関連を示す報告は少ない。そこで我々は胎生期のエピジェネティックな変化がBPHを引き起こすという仮説を立てた。

2. 研究の目的

動物実験において母体の妊娠期の栄養状態を制御することが、仔の前立腺にその後どのような影響を及ぼすかを検証することで、根本的なBPHの発症機序の解明とその予防法、治療法の開発へ繋げていくことを目的とした。

3. 研究の方法

<実験1>母体栄養状態の違いが与える前立腺腫大への影響の検証

計画:

SHRの妊娠雌ラットを用いてそれぞれ妊娠前期から制限食群、通常食群、高脂肪食群の合計3群(各群8匹、合計24匹)として飼育し、出産後は出生したそれぞれの親ラット、仔ラットを一律通常食で飼育する。仔雄ラットを出生後3週齢、8週齢、16週齢、24週齢、48週齢でそれぞれ全身麻酔下に屠殺し(各群最低5匹)、前立腺及び膀胱、尿道、性腺脂肪を摘除する。摘除した臓器をホルマリン固定したのちに薄切し、HE染色、免疫染色を行い、前立腺における上皮間質の組織学的腫大の程度を比較検討する。画像のデジタル化、細胞数のカウントはKEYENCE社のBZ-Xを用いて行い、組織面積の定量化はフリー画像解析ソフトであるImage Jを用いる。

<実験2>BPH発症に関与する候補遺伝子の検索とメチル化状態の検討

計画:

実験1で抽出した前立腺の遺伝子発現マイクロアレイ解析を行い、BPH発症に関わる遺伝子の検索を行う。Real-time RT-PCR法を用いて、今回同定された遺伝子や過去BPH発症に関わる候補遺伝子、その他の遺伝子について、mRNAの発現量を各群で検討する。上記遺伝子に関して、候補遺伝子上流のCpGメチル化をパイロセクエンシング法にて比較検討する。

<実験3>

実験2で明らかとなった遺伝子の転写開始部位近傍CpGアイランドにおけるメチル化を、パイロセクエンシング法を用いたDNAメチル化解析にて解析した。

4. 研究成果

<実験1>

胎生期制限食群は、3週齢までは他群と比較し有意に低体重であった($p=0.01$)。その後制限食群の体重は増加し、48週齢では群間差を認めなかった($p=0.84$)。48週齢における前立腺腹葉の蛍光免疫染色では、通常食群と比較して、胎生期高脂肪食群は間質面積が、胎生期制限食群は腺管上皮面積が有意に増大する結果となった(one-way ANOVA法, $p=0.03$, 0.03)。

<実験2>

結果:

48週齢の各群ラットから前立腺腹葉のRNAを抽出し、遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った。GO解析では胎生期低蛋白食群、高脂肪食群ともにdevelopment, differentiationに関する遺伝子群の発現が増加した。Real-time RT-PCR法においては、低蛋白食・高脂肪食群ともに転写因子(NF- κ B, Smad3)の発現が亢進した。低蛋白食群ではアポトーシス抑制因子XIAPやBMPRIの発現が、高脂肪食群ではTGF β pathwayやTLR pathway、上皮間葉転換(EMT)マーカーであるvimentinなどのmRNA発現亢進を認めた。このことから、胎生期低蛋白食はアポトーシス抑制因子の高発現を介して前立腺上皮を増大させ、胎生期高脂肪食はEMTを介して間質の増大をきたすと考えられた。

<実験3>

次に、TGF β 経路のメチル化解析をパイロセクエンシング法にて施行した。TGF β 1, TGFR1, SMAD3

はほぼメチル化しておらず、また群間差は認めなかった。

研究総括・意義

BPHの危険因子としては加齢や肥満などが報告されており、前立腺組織内の慢性炎症が背景に存在することが解明されつつある。これはBPHの発生・進展という一連の病態の中では、50歳以降の中高齢男性におけるBPH進展のプロモーターとして関わる機構であるが、BPH発症のイニシエーターとして働く機構や分子、すなわちなぜBPHが発生するのは全く解明されていない。胎生期における母体の栄養状態が胎児遺伝子のエピゲノム機構を介して将来の肥満リスクを増大させることが知られており、さらに肥満自体がBPHのリスクであることから、本機構は肥満のみならず前立腺環境にも影響を及ぼしBPH発症に関連している可能性を考え着想に至った。本研究において、胎生期の栄養状態が48週齢の前立腺組成変化に関わる可能性が示唆され、その原因としては前立腺における細胞増生、炎症、リモデリングなどが関わる可能性が示唆された。胎生期の母体低栄養は前立腺上皮増加に、胎生期の母体肥満は前立腺間質増加をきたし、その背景には低栄養ではアポトーシス抑制因子が、母体肥満ではEMTの関与が示唆された。

胎生期の栄養状態の変化はエピゲノム変化を介する遺伝子発現の差として前立腺肥大症へ影響すると仮説をたてたが、現時点では有意なエピゲノム変化は同定できていない。現在、網羅的メチル化DNA解析を施行中であり、マイクロアレイやPCRの結果と比較することでエピゲノム変化の影響についても今後検討予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kosuke Shibamori |
| 2. 発表標題 Maternal diet during gestation affect prostatic tissue component in SHR/lzm offspring |
| 3. 学会等名 EAU 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 柴森 康介 |
| 2. 発表標題 胎生期母体栄養状態は仔の前立腺組成に影響する |
| 3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 柴森 康介 |
| 2. 発表標題 胎生期母体栄養状態は仔の前立腺組成に影響する |
| 3. 学会等名 第29回日本排尿機能学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|