

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32625

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02136

研究課題名（和文）妊娠期低タンパク質栄養が誘導するエピジェネティックプログラムの詳細な機構解明

研究課題名（英文）Detailed study of epigenetic programming induced by low protein diets during pregnancy

研究代表者

加藤 久典 (Kato, Hisanori)

女子栄養大学・栄養学部・教授

研究者番号：40211164

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠期の栄養状態は、胎児の成長後の疾患リスクに強い影響を及ぼす。これはDNAなどに分子が付加されるエピジェネティックな変化で説明されることが多い。妊娠期にタンパク質が少ない餌を摂取した高血圧モデルラットでは、子の血圧上昇がさらに悪化することを明らかにしてきた。本研究では、妊娠期低タンパク質食でどのような遺伝子が影響を受けるかをさらに広範に調べるとともに、その機構や出生後の食事による回復について深い理解を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠期の栄養状態が子の成長後の健康に強いインパクトを及ぼすことがわかり、社会的に大きな問題となっている。本研究では、高血圧のラットが妊娠中にタンパク質が少ない餌を摂取すると、高血圧が悪化することについて、その機構の一端を明らかにした。妊娠中のタンパク質栄養の悪化による悪影響は、生後のタンパク質栄養を変化させることによってある程度改善できることを示し、妊娠期と出生後の栄養状態の相互作用を明確にしたものである。

研究成果の概要（英文）：Nutritional status during gestation has a strong influence on the risk of disease at later stages of life. This is often explained by epigenetic changes, which include the way DNA is modified by the addition of methyl groups. We have shown that hypertensive rat models fed a low-protein diet during gestation further exacerbate the elevated blood pressure in the offspring. In this study, we sought to investigate more extensively which genes are affected by a low-protein diet during gestation and to gain a deeper understanding of its mechanism as well as the possibility of the recovery by diets after weaning.

研究分野：分子栄養学

キーワード：タンパク質栄養 妊娠期 高血圧 エピジェネティクス DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

胎児期の栄養環境の悪化が、生涯にわたる健康に栄養を与える **Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)** 仮説は、ヒトや動物などの様々な研究から検証が行われてきた。特に、わが国では若年女性のやせが多く、これに関連した低出生体重児の割合が先進国の中でも特に高いことが社会的な問題となっており、妊娠期の不十分な栄養供給が将来的な日本人の健康状態の悪化に拍車をかける可能性が考えられている。これらの現象は早期からのエピジェネティックなプログラミングが原因として考えられており、実際に胎児期や授乳期の栄養環境の違いによって DNA メチル化やヒストン修飾が変化する遺伝子が多数報告されている。

研究代表者は、食塩感受性高血圧モデルラット **SHRSP (Stroke prone spontaneously hypertensive rats)** に対して、妊娠中の母ラットに低タンパク質食を給餌することで、子の成長後の高血圧病態がさらに悪化することや、影響が孫にまで伝播することを明らかにしている。特に腎臓などのアンジオテンシン受容体 2 (*At2r*) については、胎児期の低タンパク質暴露によってプロモーター部位近傍の CpG のメチル化率の変化や mRNA 発現量の変動が発生することを明らかにした。さらにこの腎臓 DNA に対してバイサルファイト全ゲノムシーケンシングを行うことでメチローム解析を行い、メチル化状態に顕著な変化を伴う CpG リッチな領域を数十か所同定し、それらの近傍の遺伝子の一つに血圧制御に関わる **Prostaglandin E2 受容体 (*Ptger1*)** があることを見出した。

### 2. 研究の目的

一般的に遺伝子プロモーター領域の **5mC** は遺伝子の発現を抑制し、**5hmC** は遺伝子の発現を正に制御すると考えられてきた。しかし、これまでに行った検討で使用したバイサルファイト法ではシトシンのメチル化とヒドロキシメチル化を区別することはできない。そのため、**5mC** として定量されても実際には **5hmC** であった可能性を否定できないという側面がある。実際に、代表者らが見出した *At2r* 遺伝子はメチル化の増加によって遺伝子発現が正に制御されており、バイサルファイト法によって **5hmC** を **5mC** と判定して定量した可能性が非常に高いと考えられる。

これに対して、*Ptger1* のメチル化状態の変化は、遺伝子内部 (**Gene body**) の CpG 領域に生じていた。**Gene body** における DNA メチル化は、遺伝子発現を正に制御することが近年報告されている。研究代表者は、出生後の SHRSP の腎臓の *Ptger1* において、出生直後に比べて 28 日目までにメチル化の割合が下がること、さらに胎児期低タンパク質暴露群では、この下がり方が遅くなっていることを明らかにしている。このことから両群間で脱メチル化の状態が変わっている可能性が考えられた。この場合においても、**5hmC** を測定することが重要となってくる。

**5mC** と **5hmC** は異なる性質を持つが、栄養学的な研究においてはそこまで明確に検討した例はほとんど存在しない。したがって、「タンパク質栄養はエピゲノムにおいてどのように長期的に作用するのか」という課題の解明のために、本研究ではこれまでに見出した上記のエピジェネティックな変化をより詳細に解析することを目的とした。

さらに、このようなメチル化の変化がどのように生じるか、またどのようにしたら解消されるかを目的とし、経時的なメチローム解析および離乳後のプロモーターメチル化解析の実験も行った。

### 3. 研究の方法

#### (1)

グローバル DNA ヒドロキシメチル化率を測定するために、HPLC を用いたグラジエント解析による定量の条件検討を行った。測定条件の決定後、ラットの肝臓や腎臓、HepG2 細胞から抽出したゲノム DNA のほかに、既に取得済みの以下の腎臓 DNA を使用して測定を行った：**SHRSP** を交配させ、母親に妊娠期間中低タンパク質食 (9%カゼイン食；LP) もしくは対照食 (20%カゼイン食；CN) を摂取させて、出生後 5 日 (D5)、10 日 (D10)、および 28 日目 (D28) の仔ラットの腎臓からゲノム DNA を抽出した (実験 1)。腎臓より抽出した DNA に対し、バイサルファイト反応を行い、HiSeq によるゲノムワイドメチル化 (メチローム) の解析を行った。

#### (2)

既に取得済みの以下の腎臓 DNA に対して、DNA メチル化アレイを行った：**SHRSP** を交配させ、母親に妊娠期間中低タンパク質食 (9%カゼイン食；LP) もしくは対照食 (20%カゼイン食；CN) を摂取させて、離乳直後から仔ラットに 2 週間低タンパク質食 (9%カゼイン食；LP)、対照食 (20%カゼイン食；CN)、高タンパク質食 (40%カゼイン食；HP) を給餌し、試験後に回収した腎臓からゲノム DNA を抽出した (実験 2)。抽出したゲノム DNA に対して、DNA 免疫沈降法を行い、回収したサンプルを ArrayStar 社に委託して DNA メチル化アレイに供し、MeDIP-Chip 法によるプロモーター領域のメチル化解析を行った。

#### (3)

一塩基単位での DNA ヒドロキシメチル化状態を測定するために、Borre と Branco (2021) が報告した酸化的バイサルファイト法の再現を行った。まず、104bp の dsDNA テンプレート、dCTP の代わりに 5-Hydroxymethyl-dCTP を混合した dNTP mix、およびタカラバイオ社の TaKaRa EpiTaq™ HS(for bisulfite-treated DNA)を用いて、C 部位がヒドロキシメチル化されたスパイクインコントロールを合成した。これを混合して精製したサンプルに対して、過ルテニウム酸カリウムを用いた酸化処理を行い、通常のバイサルファイト法に供した。得られたサンプルに対して、スパイクインコントロール用のプライマーで PCR 増幅を行い、増幅産物に対して制限酵素 TaqI 処理を行い、得られた反応産物の配列長を電気泳動にて確認し、反応の成否を判断した。

#### 4. 研究成果

##### (1)

まず HPLC の測定条件の検討を行い、最終的に、移動相には酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.1) とメタノールを使用し、カラムは YMC 社 Hydrosphere C18 を使い、超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) である島津社 NexceraX2 を用いたものを採用した。これによって、4 種のヌクレオシドに加え、5-メチル化シトシン (5mC) と 5-ヒドロキシメチル化シトシン (5hmC) を分離定量することが可能であることを確認した。

次に、ラット組織もしくは培養細胞から抽出したゲノム DNA に対する測定条件の検討を行い、Zymo 社 DNA Degradase plus を用いてヌクレオシドに分解したもので DNA 中の 5mC と 5hmC を分離定量できることを確認した。これにより、DNA 中のグローバル DNA ヒドロキシメチル化率の分析手法を確立した。この手法を用いてラットの肝臓や腎臓、および HepG2 といった細胞において、5hmC/5mC 比を測定したところ、その値が非常に低いことを明らかにし、

表 1 HPLC 解析によって算出した SHRSP の腎臓 DNA のシトシンのグローバルな修飾状態

	D5CN	D5LP	D10CN	D10LP	D28CN	D28LP
メチル化率 (%)	2.34	2.33	2.25	2.25	2.33	2.32
(SE)	(4.0E-03)	(1.3E-02)	(1.3E-02)	(1.1E-02)	(8.2E-02)	(5.2E-03)
ヒドロキシメチル化率 (%)	0.32	0.31	0.39	0.42	0.30	0.33
(SE)	(1.2E-02)	(1.6E-02)	(3.2E-02)	(5.9E-02)	(8.1E-03)	(1.4E-02)
5hmC/5mC 比 (%)	11.9	11.8	14.8	15.7	11.5	12.4
(SE)	(0.39)	(0.57)	(0.97)	(1.88)	(0.26)	(0.46)

さらに、取得済みの SHRSP の腎臓 DNA に対しても同様の解析を行った (表 1)。解析の結果、メチル化率、ヒドロキシメチル化率および 5hmC/5mC 比のいずれにおいても、日齢と母親の食餌との間に交互作用は認められなかった。一方で、メチル化率、ヒドロキシメチル化率および 5hmC/5mC 比の 3 つのすべてにおいて日齢因子の影響において有意差が認められた (p<0.01) (表 2)。

表 2 各群における日齢と母親の食餌の影響およびその交互作用

このことから、妊娠期の母親の食餌に関わらず、仔ラットの腎臓において、D5 から D10 にかけて一時的にグローバルに脱メチル化

	交互作用	母親の食餌	日齢
メチル化率	0.751	0.401	<0.01
ヒドロキシメチル化率	0.838	0.469	<0.01
5hmC/5mC 比	0.846	0.445	<0.01

が進み、D28 までには D5 と同程度のグローバルなメチル化状態に戻っていることが明らかになった。

部位特異的なメチル化についても、メチローム解析によって検討を行った。D28 において 37,673,991 の CpG サイトを解析し、そのうち 17,136 カ所のメチル化が変化していた (p<0.1)。一方で、同じ組織から RNA を抽出し、Affimetrix GeneChip Rat Genome 230 2.0 を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果 581 遺伝子において変化が認められた (FDR<0.2)。メチロームとトランスクリプトームの結果で共通して抽出された腎機能に関連する遺伝子には、Gnas、Kank3、Proser2 と、当グループの先行研究で 11 週齢のサンプルにおいて見出した Ptger1 (プロスタグランジン E2 受容体) があつた。

(2)

表3 MeDIP-Chipの結果

MeDIP-Chip 法によるプロモーター領域のメチル化解析の結果、胎児期低タンパク質暴露によってメチル化が変化していたプロモーター領域が 2,395 見出された (表 3)。このうち、離乳後の低タンパク質食によってメチル化の変化が緩和(回復)された領域が 28、高タンパク質食で回復した部位が 13、そのうち両方でオーバーラップしていた個所が 7 カ所あった。

胎児期低タンパク質食によりメチル化が変化していた部位: 2,395	低タンパク質食で緩和(回復)された部位: 21	<i>Adora2b</i> , <i>Trpc5</i> など
	高タンパク質食で緩和された部位: 6	<i>Ar</i> など
	両方で緩和された部位: 7	<i>Atp1b1</i> , <i>Xrcc2</i> など
	緩和されなかった部位: 2,361	

(3)

(1)の手法では一塩基単位で 5mC と 5hmC の区別ができないため、まず既に報告がされている手法を比較検討し、再現可能なものとして Booth ら (2012) が考案し、Borre と Branco (2021) が改良した「酸化的バイサルファイト法」を選択した。

操作で使用するスパイクインコントロールは塩基配列の中央付近に 5hmC が組み込まれているため、通常のバイサルファイト法と酸化的バイサルファイト法のそれぞれの処理後のスパイクインコントロールに対して PCR 増幅を行うと、5hmC を含む部位の配列が異なる増幅産物が得られる (図 1)。この増幅産物の配列について、通常のバイサルファイト法を施した場合の配列は制限酵素 TaqI の標的配列 (TCG) が維持されるのに対して、酸化的バイサルファイト法を施した場合は標的配列が TTA に変換されている。したがって、TaqI 処理を施した増幅産物の分子量を確認することで、酸化的バイサルファイト法の成否判定を行うことができる。

スパイクインコントロールのみの反応液に対して、酸化的バイサルファイト処理から分子量の確認までを行い、酸化的バイサルファイト法の再現を確認した。次に SHRSP の腎臓由来の DNA にスパイクインコントロールを加えたサンプルに対して酸化的バイサルファイト処理を行った。その結果、TaqI 処理後の増幅産物の分子量確認において、酸化的バイサルファイト反応の進行が不完全であることが分かった。このため、実際に解析に使用するためにさらなる条件の検討を行う必要があることが判明した。

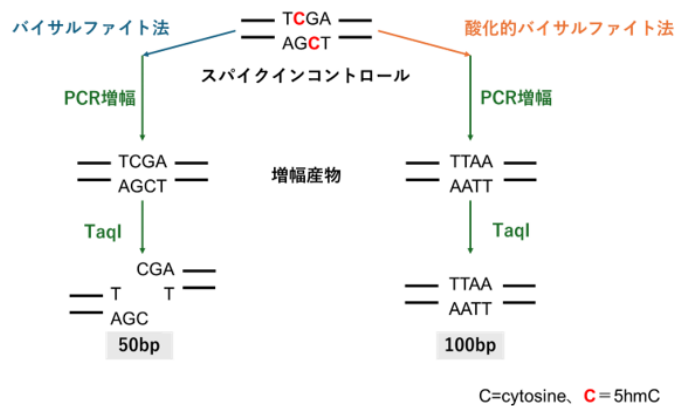


図1 酸化的バイサルファイト法の成否判定の原理

(総括)

ラットの肝臓や腎臓において、メチル化シトシンに比べてヒドロキシメチル化シトシンの割合は 10%程度と低いことがわかった。このため、ヒドロキシメチル化が遺伝子発現に及ぼす影響は限定的である可能性もあるが、*At2r* や *Ptger1* における効果は実際に検証してみる必要が残されている。本研究において改良を加えた方法での解析をさらに進める必要がある。

一方、妊娠中低タンパク質暴露の子の腎臓について、28 日齢に関してメチローム解析を行った。以前 11 週齢においても同様の解析を行ったが、当時はラットゲノムの報告配列が不完全であり、抽出された遺伝子領域や遺伝子数は少なかった。今回は前回より多くの遺伝子を見出したほか、トランスクリプトームとの照合も出来たことは大変貴重な情報を得られたと考える。*Ptger1* に関しては、前回も今回も同様の知見であり、信頼性の高い結果であるといえる。また、以前の成果で、妊娠中低タンパク質暴露による *Ptger1* のメチル化や遺伝子発現に対して、離乳後に低タンパク質食を摂取することで効果が弱まるということが明らかになっている。本研究での MeDIP-Chip 法においても、低タンパク質食が最も回復効果が大きく、次に高タンパク質食となっていた。本成果は、胎児期の栄養によるネガティブなエピジェネティックな変化を書き換える戦略において、重要な知見を提供するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyoshi M, Saito K, Jia H, Kato H	4. 巻 11
2. 論文標題 Maternal Protein Restriction and Post-Weaning High-Fat Feeding Alter Plasma Amino Acid Profiles and Hepatic Gene Expression in Mice Offspring	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 753 ~ 753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods11050753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando, C., Ma, S., Miyoshi, M., Furukawa, K., Li, X., Jia, H. and Kato, H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Postnatal nutrition environment reprograms renal DNA methylation patterns in offspring of maternal protein-restricted stroke-prone spontaneously hypertensive rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Nutrition	6. 最初と最後の頁 1134955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnut.2023.1134955/full	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jia, H., Miyoshi, M., Li, X., Furukawa, K., Otani, L., Shirahige, K., Miura, F., Ito, T. and Kato, H.	4. 巻 15
2. 論文標題 The Epigenetic Legacy of Maternal Protein Restriction: Renal Ptger1 DNA Methylation Changes in Hypertensive Rat Offspring	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15183957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大島 桜子、李 柯、賈 慧娟、加藤 久典
2. 発表標題 妊娠期および授乳期の機能性食品摂取が子マウスの腸管炎症に及ぼす影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 貴美、福井 里佳子、Warman Dwina Juliana、白木 伸明、賈 慧娟、加藤 久典
2. 発表標題 妊娠期の短期間のメチオニン欠乏食およびスレオニン欠乏食給餌が子マウスに与える影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 久典
2. 発表標題 プレジジョン栄養学の展望
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023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