

妊娠期および授乳期におけるマウス母獣の ビタミンC摂取による仔のエピゲノム解析

橋 本 貢 士

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科メタボ先制医療講座 寄附講座准教授

緒 言

肥満症や2型糖尿病などの生活習慣病は遺伝因子と環境因子の複雑な相互作用により発症する代表的な多因子疾患である。疫学データや動物モデルを用いた研究により、胎児期や新生児期の栄養環境が成人期の代謝関連疾患への罹患性に影響を与えるというDevelopmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 仮説が提唱されている。DOHaD仮説の分子機構として、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を調節するエピジェネティクスの関与が考えられる。すなわち胎児期から新生児期の栄養環境により、代謝関連遺伝子のDNAメチル化、ヒストン修飾などが個々に調節され、その後その状態が何らかの仕組みで細胞内に記憶されることで(エピゲノム記憶)、遺伝子発現量に個体差が生じた結果、成人期の肥満症や2型糖尿病などへの罹患性に影響を与えると想定される。我々は最近、マウス乳仔期における、母乳を介

した核内受容体である peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) の活性化が仔の肝臓の脂肪酸 β 酸化関連遺伝子のDNA脱メチル化を導き、その遺伝子発現が増加することを示した¹⁾。しかし同研究において、一部の脂肪酸 β 酸化関連遺伝子 (Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacylCoA dehydrogenase (Ehhadh) 遺伝子など) では、野生型マウスと比較して程度は低いもののPPAR α ノックアウトマウスにおいても新生仔期に遺伝子プロモーターのDNA脱メチル化が生じることがわかった(図1:バイサルファイトシークエンス法による遺伝子プロモーターのDNAメチル化解析)。これにより一部の糖脂質代謝関連遺伝子ではPPAR α を介さないDNA脱メチル化経路が存在することが示唆された。一般的にDNA脱メチル化は5メチルシトシン(5mC)を5ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)に変換する酵素Tet (ten eleven translocation) を介して行われるが、

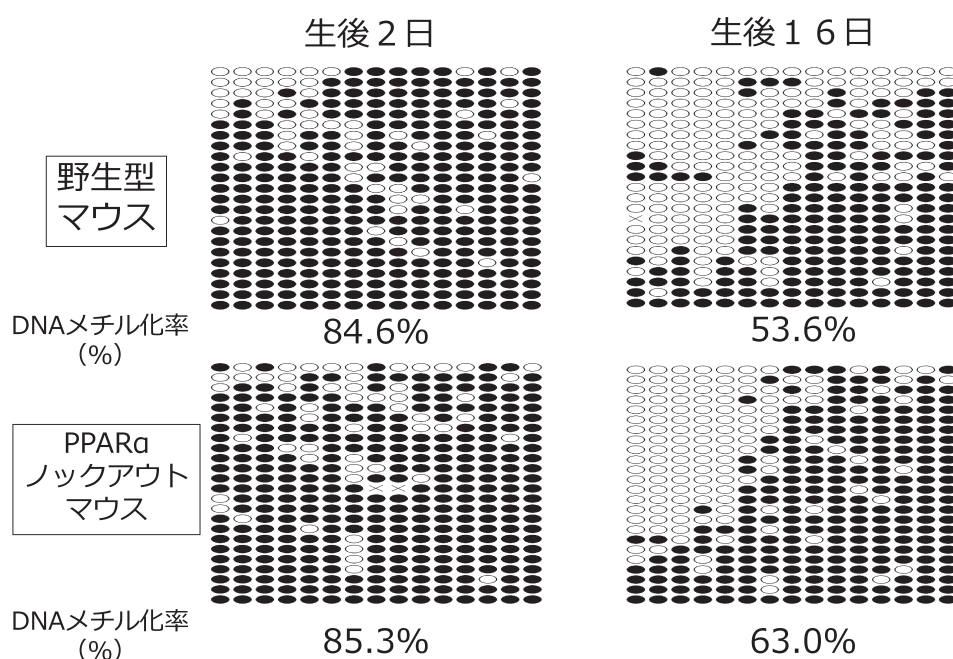


図1 乳仔期のマウス肝臓における Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (Ehhadh) 遺伝子のDNAメチル化変化

最近、ビタミンCがTetを活性化し、DNA脱メチル化を促進することで遺伝子発現を亢進させることが明らかとなった²⁾。ヒトやサルなどの霊長類と異なり、マウスは充分量のビタミンCを肝臓で産生することができる。このため我々はビタミンCによるTetの活性化が肝臓におけるもう一つのDNA脱メチル化機構ではないかと考えた。我々はこの仮説を実証するために、妊娠期から授乳期にかけてビタミンCをマウス母獣に投与し、仔の肝臓における糖脂質代謝関連遺伝子のDNA脱メチル化および遺伝子発現の変化を解析するという着想に至った。

実験方法

本年度はパイロット実験として下記の実験を行った。C57/B6系の妊娠マウス（仔：胎生3日齢：e3）を購入し、通常の水（water）を与える群（通常群）とビタミンC（アスコルビン酸、Ascorbic Acid (AA)）を与える群（AA群）に分け、妊娠期から授乳期（産仔の生後16日齢（d16））まで摂餌した。AA群ではAA 1.5 g/Lと100 μMのethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を水に加えて調整した³⁾。d16において、各群の産仔（雄）から血液、および肝臓組織を摘出し、脂質測定および定量的逆転写PCR法を用いて、各種遺伝子発現を検討した。

結果

1. d16の血清脂質測定

生後16日齢（d16）では通常群とAA群において、血清トリグリセリド（TG）および、遊離脂肪酸（Free Fatty-Acid; FFA）レベルの有意な差異を認めなかった（図2）。

2. d16における肝臓での糖脂質代謝関連遺伝子発現解析

糖新生関連遺伝子である*Pck1*、*G6 pc*および脂質代謝関連遺伝子*Gpam*、*Ehhadh*、*Acox1*、*Cpt1a*、*Fgf21*、*Cebpa*には両群で、遺伝子発現の有意な差異を認めなかった（図3）。

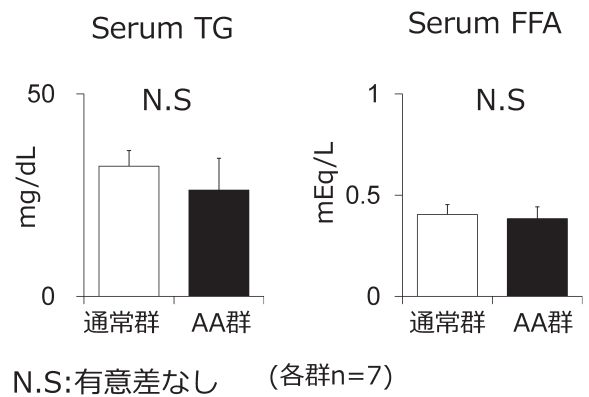


図2 血清脂質解析 生後16日 (d16)

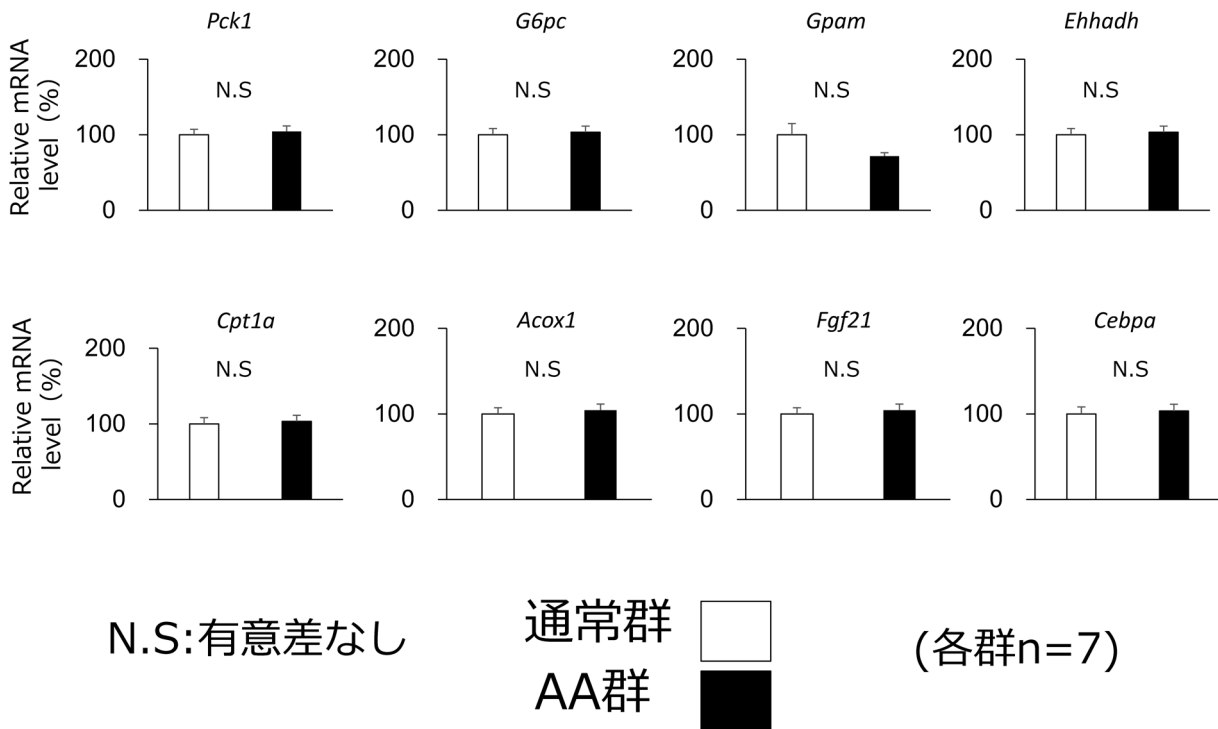


図3 肝臓における糖脂質代謝関連遺伝子発現解析 生後16日 (d16)

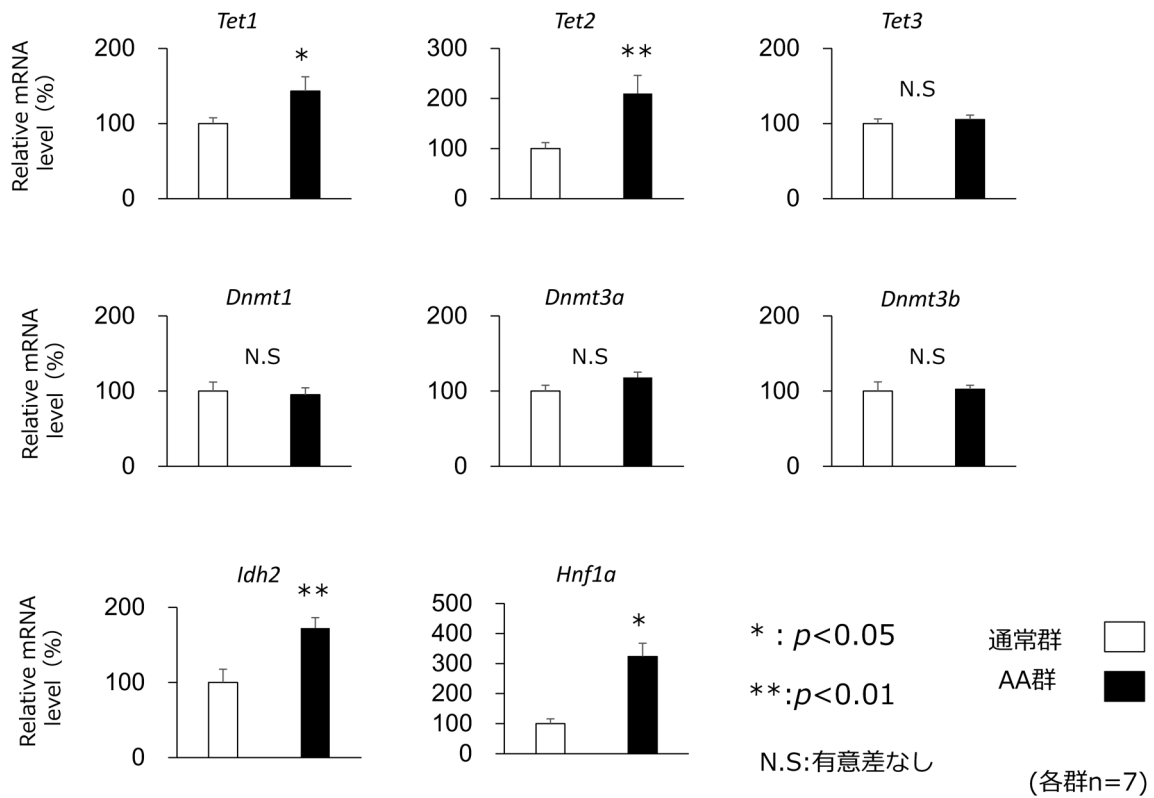


図4 肝臓におけるDNAメチル化関連遺伝子発現解析 生後16日 (d16)

3. d16における肝臓でのDNAメチル化酵素遺伝子発現解析

DNAメチル化酵素である*Dnmt1*、*Dnmt3a*および*Dnmt3b*の遺伝子発現は、両群で有意な差異を認めなかった (図4)。

4. d16における肝臓でのTen-Eleven Translocation (TET) 遺伝子発現解析

DNA脱メチル化関連酵素である*Tet1*、*Tet2*および*Tet3*の遺伝子発現を解析したところ、AA群において通常群と比較して、*Tet1*および*Tet2*の遺伝子発現が有意に増加していた。一方で、*Tet3*の遺伝子発現については両群で有意な差異を認めなかった (図4)。

5. d16における肝臓でのisocitrate dehydrogenase (IDH) 遺伝子発現解析

IDHはKrebs回路においてisocitrate (イソクエン酸) を α ケトグルタル酸 (α KG) に転換し α KGはTETを活性化するが、AA群において通常群と比較して、*Idh2*の遺伝子発現が有意に増加していた。一方、*Idh1*の遺伝子発現については両群で有意な差異を認めなかった (図4)。

6. d16における肝臓でのHepatocyte nuclear factor-4a (HNF4A: NR2A1) 遺伝子発現解析

HNF4Aは代謝調節や内胚葉の発生に関与する核内受容体であり、胎生期から乳仔期にかけてDNA脱メチル化を受けることが知られているが、AA群において通常群と比較して、d16における肝臓での*Hnf4a*の遺伝子発現が有意に増加していた (図4)。

考 察

今回のパイロット実験において、AA群において通常群と比較して、d16における肝臓での*Tet1*および*Tet2*の遺伝子発現が有意に増加しており、AA群におけるDNA脱メチル化の亢進が示唆された。実際、この時期にDNA脱メチル化を受けることが知られている*Hnf4a*の遺伝子発現が有意に増加していた。この*Tet1*および*Tet2*の遺伝子発現の増加のメカニズムとして、TETの活性化に重要なIDH2遺伝子発現の増加が考えられた (図5)。今後行う本実験では、d16において仔の肝臓よりゲノムDNAを抽出し、Dot Blot法と抗5hmC抗体を用いて、5hmCの半定量解析を行う。これにより母獣へのビタミンC (AA) 投与によって仔マウス肝臓におけるTETの酵素活性が促進されるか否かを判定する。さ

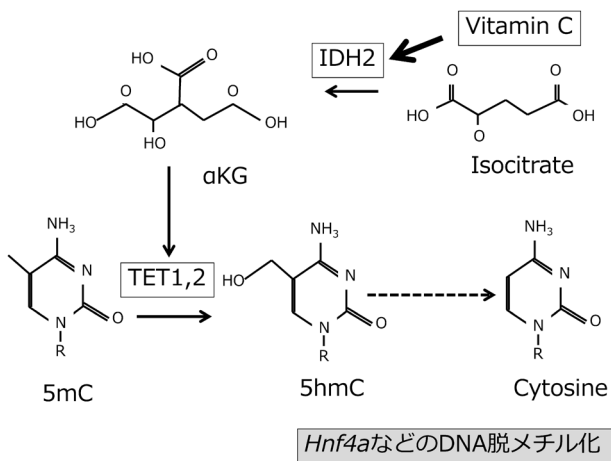


図5 今回の研究結果から考えられるビタミンCによるDNA脱メチル化活性化の分子機構

らに仔の肝臓より抽出したゲノムDNAを用いて Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) 法⁴⁾により、次世代シーケンサーを用いてDNAメチル化を網羅的に解析する。またモチーフ解析も併せて行い、AA群で最もDNA脱メチル化変化を呈した遺伝子経路を同定する。その後、その経路を代表する遺伝子について、DNAメチル化状態をバイサルファイトシーク

エンス法を用いて検討する。

要 約

妊娠期から授乳期のマウス母獣にビタミンCを投与すると、産仔の肝臓におけるDNA脱メチル化酵素であるTET1およびTET2およびTETを活性化するIDH2の遺伝子発現が亢進し、DNA脱メチル化の亢進が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。また本研究にご協力頂きました、本学大学院医歯学総合研究科・分子内分泌代謝学分野教授 小川佳宏先生、特任助教 袁勳梅先生および大学院生の皆さん（辻本和峰君、川堀健一君、榛澤望君）に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) T. Ehara T, et al.: *Diabetes*, **64**, 775–784, 2015.
- 2) K. Blaschke, et al.: *Nature*, **500**, 222–226, 2013.
- 3) Y. Sato, et al.: *J. Invest. Dermatol.*, **132**, 2112–2115, 2012.
- 4) P. Boyle, et al.: *Genome Biology*, **13**: R92, 2012.