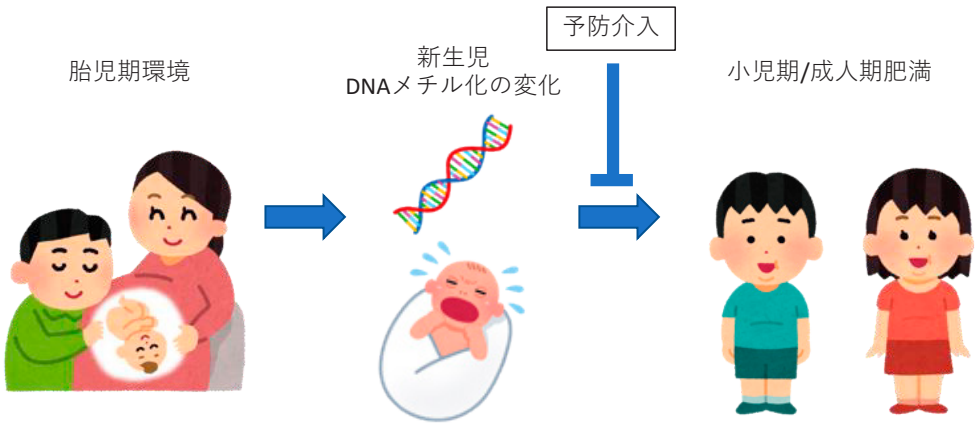
10　出生コホートを基盤とした肥満への統合的アプローチ	櫻井　健一

【目的】胎児期の子宮内環境や出生後早期の環境因子が成人期のメタボリックシンドロームや 2 型糖尿病を含む noncommunicable diseases（NCDs：非感染性疾患）の発症に関与しており、「Developmental Origins of Health and Disease（DOHaD）説」として提唱されている。このようにライフコースの早期に曝露された環境因子が長期間を経て成人期の疾患に影響を及ぼすメカニズムとしては、DNA メチル化を含むエピジェネティックな変化が想定されている。そこで、本研究では胎児期環境因子が胎児組織の DNA メチル化に与える影響を明らかにするとともに、肥満との関連を明らかにすることを目的とする。

【方法】1. 出生コホート研究「Chiba study of Mother and Child Health（C-MACH）」の参加者を対象とした。出産時に採取した臍帯の DNA メチル化と妊娠中の母体体重増加量（GWG）との相関を検討した。2. 前記検討により相関を認めたプローブを含む領域の DNA メチル化を脱メチル化するため、pPlatTET-gRNA2 プラスミドに標的領域に設定したガイド RNA 配列を組み込み、培養細胞において当該領域を脱メチル化し、遺伝子発現の変化を検討した。3. H19 遺伝子領域において DNA メチル化を改変したマウスの脂肪組織における遺伝子発現の変化を RNAseq により検討した。

【結果】1. 臍帯 DNA を用いて DNA メチル化アレイを行なった。メチル化を表すβ値と GWG との相関を検討したところ女児において六つのプローブで有意な相関を認めた。そのうち二つは同一遺伝子（gene1）上に位置していた。母体の栄養状態が胎児組織の DNA メチル化に影響を与えることが示唆された。2. gene1 上にガイド RNA を設定し、pPlatTET-gRNA2 に挿入したプラスミドを作製した。HEK293 細胞に導入したところ、DNA メチル化の低下と gene1 の発現増加を認めた。この結果、gene1 の当該領域のメチル化が遺伝子発現調節に関与していることが示唆された。今後は脂質代謝関連遺伝子への影響を検討する必要がある。3. 我々は妊娠中の母体栄養状態と *H19* 遺伝子の DNA メチル化に関連があることを報告している。そこで、*H19* 遺伝子 DNA メチル化改変マウスの脂肪組織における RNA 発現を野生型マウスと比較したところ、発現に有意な差を示す遺伝子を認めた。これらの中には脂質代謝に関連する遺伝子が含まれており、*H19* 遺伝子の DNA メチル化が脂肪細胞における機能に重要であることが示唆された。以上の結果から、胎児期環境因子が DNA メチル化の変化を介して脂肪細胞の機能に影響を与える可能性が示された。

出生時の DNA メチル化を標的とした肥満予防



10. 出生コホートを基盤とした肥満への統合的アプローチ

櫻井　健一

千葉大学 予防医学センター

Key words：出生コホート，DNA メチル化，肥満

緒　言

胎児期の子宮内環境や出生後早期の環境因子が成人期のメタボリックシンドロームや 2 型糖尿病を含む noncommunicable diseases（NCDs：非感染性疾患）の発症に関与しており、「Developmental Origins of Health and Disease（DOHaD）説」として提唱されている［1］。このようにライフコースの早期に曝露された環境因子が長期間を経て成人期の疾患に影響を及ぼすメカニズムとしては、エピジェネティックな変化が想定されており、エピジェネティックな変化の一つとして DNA のメチル化があげられる。例として、妊娠中の母マウスへのタンパク制限食が仔マウスの肝臓において脂質代謝に関連する遺伝子の DNA メチル化を変化させること、脂肪肝を誘導することが報告されている。DNA メチル化は遺伝子発現を変化させることにより上述のように疾患感受性を変化させると考えられている。さらに、父親の生活習慣等がエピジェネティックな変化を介して児の健康状態に影響を与える可能性も示されている［2］。

脂肪細胞は余剰エネルギーを脂肪の形で貯蔵する細胞と考えられていたが、実際には様々な液性因子（アディポカイン）を分泌し、全身の恒常性維持に寄与していることが明らかとなってきた。脂肪細胞は重要なインスリン標的細胞であり、そのインスリン感受性やアディポカイン分泌能などが糖尿病やメタボリックシンドロームの病態形成に関与していると考えられる。DOHaD 説に基づく糖尿病あるいはメタボリックシンドロームの発症機序を解明する上で胎児期に受けた環境影響がどのように脂肪細胞の性質を変化させるのかを明らかにすることは重要である。また、このようなアプローチは胎児期から予防医学・先制医療の基礎となると考えられる。

DOHaD 説に基づいた胎児期および出生早期の環境による健康への影響を明らかにするために我々は、2014 年より出生コホート調査「胎児期に始まる子どもの健康と発達に関する調査（C-MACH）」を行なっている［3］。C-MACH は妊娠早期の母親をリクルートし、妊娠中から環境や栄養状態のデータを得るとともに生体試料として出生時の臍帯や臍帯血を提供していただいている。我々は胎児期の成長と関連する *H19* 遺伝子の DNA メチル化と妊娠中の母体栄養環境あるいは児の出生時体格との関連を検討し、妊娠中のエネルギー摂取および児の出生時頭囲と臍帯における *H19* 遺伝子の DNA メチル化に相関があることを見出した［4］。このことから、*H19* 遺伝子の DNA メチル化が胎児成長に影響を与えることが示唆された。一方、*H19* 遺伝子は肥満との関連が報告されている［5］。このように臍帯における肥満関連遺伝子の DNA メチル化が、児の肥満と関連する母体因子（栄養摂取状況、頭囲）と相関することから母体因子が DNA メチル化の変化を介して児の肥満に寄与している可能性が考えられる。さらに、臍帯は主に間葉系細胞よりなっており、これは脂肪細胞へも容易に分化しうる。我々は、C-MACH において臍帯から間葉系細胞を採取し、脂肪細胞へ分化することを確認している。このことから、臍帯での変化は同様に非侵襲的に採取可能な臍帯血球細胞と比べても肥満あるいは脂肪細胞機能の研究に有用であると考えた。本研究の目標は、ヒトにおいて胎児期の環境要因が臍帯の DNA メチル化に与える影響を明らかにすること、認められた DNA メチル化の変化が脂肪細胞機能に与える影響を明らかにすることである。

上記目標を達するために、本研究では出生コホートを用いた検討および実験モデルを用いた検討の 2 部より構成する。すなわち、出生コホートにおいては妊娠中の母体および父親因子あるいは出生時体格と臍帯 DNA メチル化との関連を検討する。実験モデルとしては、培養脂肪前駆細胞の候補遺伝子における DNA メチル化を変化させて細胞機能の変化を観察すること、DNA メチル化改変モデルマウスの脂肪組織における遺伝子発現および脂肪細胞機能の変化を検

討する。

本研究により、父母の環境要因→DNA メチル化→細胞機能変化→体重変化という流れが明らかになれば、妊娠前あるいは妊娠中の父母に対して児の肥満を予防するための生活環境に関する情報提供あるいは教育が可能となる。また、出生時の臍帯 DNA メチル化を調べることにより肥満リスクの高い児を抽出することができ、先制医療の発展に寄与するものと思われる。

方　法

1. 臍帯 DNA メチル化解析

対象

千葉大学予防医学センターが行なっている出生コホート研究「Chiba study of Mother and Child Health (C-MACH)」の参加者を対象とした。本研究では同参加者のうち、O 医療機関においてリクルートした参加者を対象とした。妊娠前および妊娠中の生活状況及び身長・体重については自己記入式質問票及び医療機関調査票より抽出した。妊娠中体重増加量（GWG）は出産前の体重及び妊娠前の体重より算出した。臍帯は出産時に採取・洗浄後、DNA 抽出まで - 80℃の冷凍庫で保存した。

本研究は千葉大学大学院医学研究院生命倫理審査委員会の承認のもと、参加者からは文書による同意を得て行なった。

臍帯 DNA メチル化解析

臍帯 DNA は既報［4］のように凍結保存した臍帯を凍結状態のまま粉砕したのち、市販の DNA 抽出キットを用いて抽出した。抽出した臍帯 DNA をバイサルファイト処理した後、DNA メチル化アレイに供した。DNA メチル化アレイは Illumina 社の Infinium MethylationEPIC BeadChip を用いた。DNA メチル化の評価には各プローブのβ値を用いた。各プローブのβ値から標準偏差を算出し、0.1 以上のものを抽出した。さらに、既報の肥満関連遺伝子に位置するプローブを選択した。選択されたプローブについて、βと GWG の相関係数を算出した。

2. 細胞における DNA メチル化改変

1 において有意な相関を認めたプローブを含む領域を対象とし、DNA メチル化改変用のベクターを作製した。DNA メチル化を変化させる方法としては、CRISPR/Cas9 のシステムを応用する方法［6］を用いた。当該領域に対してガイド RNA を設計し、同配列を pPlatTET-gRNA2（Addgene）に組み込んだプラスミドを作製した。作製したプラスミドを細胞に導入した後、GFP 陽性細胞を分取し DNA および RNA を抽出した。DNA はバイサルファイト処理、PCR 増幅後サブクローニングしシークエンスを行なった。RNA は定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析に用いた。

3. DNA メチル化改変マウスの脂肪組織における遺伝子発現

DNA メチル化改変マウスの脂肪組織については、群馬大学畑田教授より供与を受けた。脂肪組織より RNA を抽出し、網羅的 RNA 発現解析（RNAseq）を行なった。野生型および DNA メチル化改変マウスの 2 群間で発現の異なる遺伝子を検討した。

結果および考察

1. 臍帯 DNA メチル化と GWG との関連

C-MACH 参加者のうち O 医療機関でリクルートされた参加者を対象とした。O 医療機関参加者 105 名のうち、出産時に臍帯が採取され DNA 抽出が可能であった 75 名の臍帯 DNA を用いて DNA メチル化アレイを行なった。全プローブのうちメチル化の程度を示すβ値の標準偏差が 0.1 以上であり、かつ肥満と関連する遺伝子に存在するプローブを抽出した。これらについて妊娠中の体重増加量との相関を調べたところ、女児において 6 つのプローブ（CpG1-6）で有意な相関を認めた。このうち 2 つは同一遺伝子（gene1）に存在した。一方、男児においては有意な相関を示すプローブは認められなかった。図 1 には女児における gene1 に存在する CpG1 のβ値と GWG の相関を示す。この結果から妊娠中の母親の体重増加あるいは栄養状態が臍帯において肥満関連遺伝子の DNA メチル化に与える影響には性差があることが示唆された。

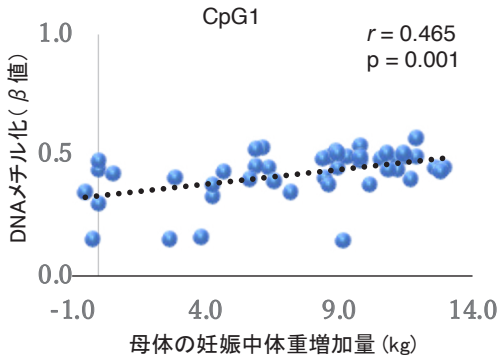


図1. 妊娠中体重増加量と臍帯DNAメチル化

臍帯からDNAを抽出した後、DNAメチル化アレイを用いて各プローブのメチル化を評価した。肥満に関連する遺伝子領域を抽出し、妊娠中体重増加量とDNAメチル化レベルとの相関係数を算出した。図には有意となったプローブの散布図を示す。相関係数はSpearmanの順位相関係数を用いた。

2. 細胞における DNA メチル化改変モデルの作製

上記検討において抽出された CpG プローブのうち、2 つは同一遺伝子（gene1）に存在した。そこで、gene1 のプローブが存在する領域に対しガイド RNA（gRNA1、2）を設計し、pPlatTET-gRNA2 に挿入したプラスミドを作製した（pPlat-gRNA1, pPlat-gRNA2）。HEK293 細胞に対して上記および対照ベクターを導入し、FACS で GFP 陽性細胞をソーティングした。DNA メチル化および gene1 の遺伝子発現を検討したところ、図 2 に示すような結果が得られた。今回用いた脱メチル化ベクターによる脱メチル化の効率は既報に比べ低かった。ガイド RNA について検討が必要と思われた。しかしながら、gene1 の発現は有意に増加しており、脱メチルによる効果という点では評価できる可能性がある。DNA メチル化の影響は近傍の遺伝子発現のみならず、離れた場所にある遺伝子に対しても影響を与えることが報告されているので、gene1 以外の脂質代謝に関わる遺伝子の発現についても検討する必要がある。

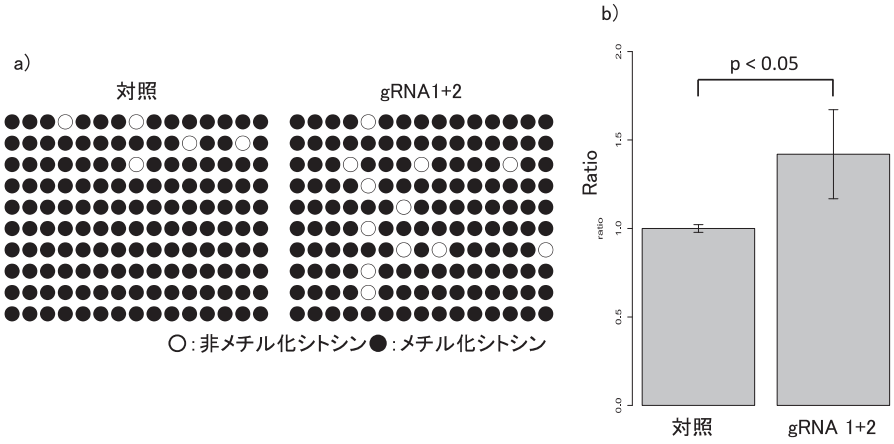


図2. 脱メチル化処理によるDNAメチル化と遺伝子発現

2つの脱メチル化ベクターをHEK293細胞に導入し、DNAメチル化とmRNA発現を検討した。

a) 対照ベクターとgRNA1および2を含むベクターを導入した細胞よりDNAを抽出し、DNAメチル化を評価した。DNAメチル化はバイサルファイト処理後にPCR増幅、サブクローニングしシークエンスを行なった。

b) 対照ベクターとgRNA1および2を含むベクターを導入した細胞よりRNAを抽出し、cDNA合成ののち定量的PCRにて評価した。Student T検定にて両群を比較した。

3. H19 DNA メチル化改変マウスにおける mRNA 発現

我々は既報において、妊娠中の母体栄養摂取状況が臍帯において *H19* 遺伝子を含む領域の DNA メチル化に影響を与えることを報告している［4］。その検討では同領域の DNA メチル化と新生児の頭囲との間に関連を認めた。新生児の頭囲は神経発達と関連することが知られているが、成長後の肥満とも関連することも報告されている。そこで、*H19* 遺伝子の DNA メチル化を改変したマウスの脂肪組織を用いた検討を行うこととした。*H19* 遺伝子 DNA メチル化改変マウス［7］の脂肪組織は群馬大学畑田教授より供与を受け、RNAseq により野生型と遺伝子発現の差を検討した。図 3 に示すように多くの遺伝子に有意な発現の差を認めた。これらの中には脂質代謝に関わる遺伝子も複数含まれており、*H19* の DNA メチル化が様々な遺伝子の発現に大きな影響を与えること、脂肪細胞の機能に影響を与えることが示唆された。DOHaD 説では胎児期環境と出生後環境のミスマッチが疾患発症に寄与するとされており、今後本マウスに対して高脂肪負荷等による肥満あるいは糖脂質代謝の変化を調べることにより、より詳細な検討が可能となると考えられる。

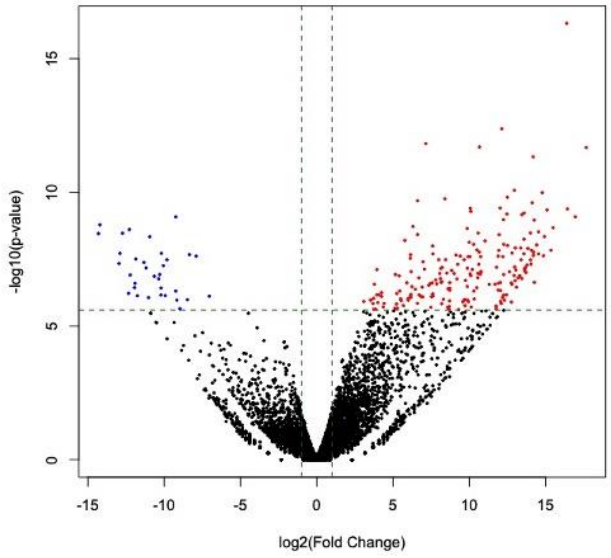


図3. 野生型及び*H19*遺伝子DNAメチル化改変マウスにおける遺伝子発現
Volcano plotを示す。DNAメチル化改変マウスにおいて有意に発現上昇を認めたものを赤、発現低下を認めたものを青で示す。横軸は対数変換した fold change、縦軸は対数変換したp値を示す。

共同研究者・謝辞

本研究は、千葉大学予防医学センター環境健康学分野の高谷里依子氏、千葉大学大学院医学研究院小児科学研究室の高谷具純氏との共同研究として実施された。また、DNA メチル化改変マウスの脂肪組織サンプルをご提供いただいた群馬大学生体調節研究所ゲノム科学リソース分野の畑田出穂教授、堀居拓郎准教授に深謝いたします。

文　献

1） Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. Science. 2004 305(5691):1733-6. Epub 2004/09/18.　PMID: 15375258 DOI: 10.1126/science.1095292.

2) Champroux A, Cocquet J, Henry-Berger J, Drevet JR, Kocer A. A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance. Front Cell Dev Biol. 2018 6:50. Epub 2018/06/06. PMID: 29868581 DOI: 10.3389/fcell.2018.00050.

3) Sakurai K, Miyaso H, Eguchi A, Matsuno Y, Yamamoto M, Todaka E, et al. Chiba study of Mother and Children's Health (C-MACH): cohort study with omics analyses. BMJ Open. 2016 6(1):e010531. Epub 2016/01/31. PMID: 26826157 DOI: 10.1136/bmjopen-2015-010531.

4) Miyaso H, Sakurai K, Takase S, Eguchi A, Watanabe M, Fukuoka H, et al. The methylation levels of the H19 differentially methylated region in human umbilical cords reflect newborn parameters and changes by maternal environmental factors during early pregnancy. Environ Res. 2017 157:1-8. Epub 2017/05/14. PMID: 28500962 DOI: 10.1016/j.envres.2017.05.006.

5) Schmidt E, Dhaouadi I, Gaziano I, Oliverio M, Klemm P, Awazawa M, et al. LincRNA H19 protects from dietary obesity by constraining expression of monoallelic genes in brown fat. Nat Commun. 2018 9(1):3622. Epub 2018/09/08. PMID: 30190464 DOI: 10.1038/s41467-018-05933-8.

6) Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, et al. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. Nat Biotechnol. 2016 34(10):1060-5. Epub 2016/08/30. PMID: 27571369 DOI: 10.1038/nbt.3658.

7) Horii T, Morita S, Hino S, Kimura M, Hino Y, Kogo H, et al. Successful generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome. Genome Biol. 2020 21(1):77. Epub 2020/04/03. PMID: 32234052 DOI: 10.1186/s13059-020-01991-8.