

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 29 年度博士課程進学
氏 名 三好 萌
指導教員 加藤 久典

論文題目

胎児期低タンパク質栄養に起因した食塩感受性高血圧亢進機構の解明

第一章 序論

代表的な多因子疾患である生活習慣病は、特定の疾患罹患リスクの高い遺伝子と生活習慣によって発症すると言われているが、この考え方だけでは疾患群が急増していることを十分に説明できない。近年、胎児期の栄養状態と成人後の疾患発症率が関連することを示す証拠が次々と明らかになってきており、それらの報告では、形質の決定に DNA の一次構造だけでなく、DNA の修飾の変化も重要であることが分かってきた。このように、DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな変化は遺伝子発現制御に関わっており、胎児期環境に由来した子の疾患リスク増大の分子機構として注目されている。

当研究室では、妊娠中にタンパク質制限を受けた脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) から生まれた仔ラットは成長後に食塩感受性が亢進し、血圧が顕著に上昇することや寿命が短命化することを明らかにしてきた。その分子機構として、胎児期に低タンパク質食暴露された成獣期 SHRSP ラットの腎臓ではナトリウム保持に関与する *Ptger1* (Prostaglandin E2 Receptor EP1 Subtype) 遺伝子内が高メチル化状態であり、エピジェネティックな制御機構を介して疾患発症リスクが増大している可能性が示唆された (Miyoshi M. *et al.*, 2018.)。しかし、潜在的な食塩感受性高血圧の分子機構や出生後の仔ラットの栄養環境がその機構に及ぼす影響などに関する知見は未だに乏しい。そこで本研究では、ライフステージ初期に胎児期低タンパク質暴露に起因したエピジェネティックマーカーが形成されており、さらにこのエピジェネティックマーカーは成長後の栄養的介入により再プログラミングできる可能性があるとの仮説を検討した。

第二章 胎児期低タンパク質食暴露が若年期仔ラットに与える影響の解析

本章では、胎児期に低タンパク質食暴露された SHRSP 若年期仔ラット (D28) の腎臓を用い、メチローム解析とトランスクリプトーム解析の両オミクス解析データを統合することで食塩感受性高血圧因子となりうる遺伝子候補の探索を行った。その結果、胎児期の低タンパク質食暴露により両オミクス解析データで重複して変動した遺伝子として 6 遺伝子が見出され、興味深いことにその中には胎児期低タンパク質食暴露された成獣仔ラットで変動していた *Ptger1* が高い変動倍率で含まれていたため、血圧調節に重要な *Ptger1* に着目して検討を進めることとした。*Ptger1* の DNA メチル化状態と遺伝子発現量をそれぞれバイサルファイトシーケンスとリアルタイム PCR により測定したところ、胎児期の低タンパク質食暴露により *Ptger1* の DNA メチル化状態は遺伝子内の CpG island の顕著な高メチル化状態とプロモーター領域の低メチル化傾向という特徴があり、*Ptger1* mRNA 発現量は有意に増加していることが明らかとなった。この *Ptger1* の CpG island の DNA メチル化状態と遺伝子発現が正の相関を示すという変動は、先行研究で見出した *Ptger1* の変動と一致しており、胎児期低タンパク質食暴露により形成された食塩感受性高血圧に關与する重要なエピジェネティックマーカーである可能性が再確認された。

第三章 胎児期低タンパク質食暴露が授乳期仔ラットに与える経時的な影響の解析

本章では、食塩感受性高血圧を惹起する潜在的な要因として浮上した *Ptger1* の変動が出生直後にどのような影響を受けているのか、また授乳期から若年期にかけてのライフステージ初期に経時的にはどのような変動をするのかを検討した。その結果、胎児期に低タンパク質食暴露された SHRSP 仔ラットは、出生後 5 日目より *Ptger1* 遺伝子内の CpG island が高メチル化状態であり、出生後 10 日目より *Ptger1* mRNA の高発現が顕在化し、*Ptger1* タンパク質発現量は検討を行った出生後 28 日目までの段階では影響を受けていないという経時的な挙動を示していた。このように授乳期から若年期にかけての胎児期低タンパク質食暴露の影響を俯瞰することで、出生直後より *Ptger1* は DNA メチル化状態の変動が保存されており、その影響を介して *Ptger1* mRNA 発現量が成長に伴い変化するという新たな実験データを見出すことができた。

第四章 出生後の異なるタンパク質摂取量が胎児期低タンパク質食暴露された仔ラットに及ぼす影響の解析

先行研究と本研究の第二章・第三章において、潜在的に保存されている腎臓中 *Ptger1* の変動

が胎児期低タンパク質食暴露に起因した食塩感受性高血圧の鍵となるエピジェネティックマーカーである可能性が示唆されたため、本章では出生後の仔ラットの栄養環境、特にタンパク質摂取量の差によりこの *Ptger1* の変動がどのような影響を受けるのかについて検討を行った。その結果、胎児期に低タンパク質食に暴露され、離乳後に 2 週間通常食を摂取した 6 週齢の仔ラットでは、腎臓中 *Ptger1* 遺伝子内の CpG island の高メチル化が確認され、*Ptger1* mRNA 発現量も増加しており、これまでの研究と同様の *Ptger1* の変動が保存されていることを確認した。さらに、この DNA 高メチル化は、離乳後に低タンパク質食または高タンパク質食を 2 週間摂取することで、有意に低下することを新たに見出した。一方で、胎児期の低タンパク質食暴露による *Ptger1* mRNA 発現量の増加は、離乳後の低タンパク質食および高タンパク質食でも変化せず、離乳後のタンパク質摂取量に起因する影響は見られなかった。したがって、離乳後の低タンパク質食または高タンパク質食摂取により、胎児期低栄養に起因した *Ptger1* の DNA 高メチル化が緩和しており、出生後の栄養環境の介入により潜在的なエピジェネティックマーカーを再プログラミングできる可能性が提示された。

第五章 胎児期低タンパク質食暴露がアンジオテンシン 2 型受容体に与える影響の解析

先行研究では、胎児期低タンパク質食暴露と出生後の食塩負荷により成獣仔ラットの腎臓中のアンジオテンシン 2 型受容体 (AT2R) タンパク質発現量が増加することが食塩感受性高血圧発症に関与する重要な変化として報告されている (Otani L. *et al.*, 2012.) が、この AT2R の変動がエピジェネティックな影響によるものなのかは未だ不明瞭であった。その要因としては、成獣仔ラットの腎臓では AT2R をコードしている *Agtr2* mRNA は微量なため、従来法であるリアルタイム PCR では正確な定量値が得られなかったためである。そこで本章では DNA メチル化状態の変化による発現制御が関与していると予測し、低濃度サンプルの検出に優れているデジタル PCR の活用により、この課題にアプローチした。まず、タンパク質量と DNA メチル化状態を評価した結果、胎児期低タンパク質食暴露と出生後の食塩負荷により成獣仔ラットの腎臓では、AT2R タンパク質発現量が増加傾向であることが先行研究同様に観察され、その影響は胎児期低タンパク質食暴露と出生後に食塩負荷された成獣孫ラットでも観察されることが新たに明らかとなった。また、胎児期低タンパク質食暴露された仔ラットでは、食塩負荷時に腎臓中 *Agtr2* プロモーター領域の TATA box 近傍の CpG 部位が低メチル化状態であり、*Agtr2* のメチル化状態とタンパク質発現量は負の相関があることを見出した。次に、デジタル PCR により

Agtr2 mRNA 発現量を測定するための系を確立し、胎児期低タンパク質食暴露された仔・孫ラットの腎臓では、食塩負荷時に *Agtr2* mRNA 量はタンパク質発現量の変化とは反し、むしろ有意に減少していることを突き止めた。そこで、*Agtr2* プロモーターの DNA メチル化と転写活性の関係を明らかにするためにレポーターアッセイを行った。その結果、DNA がメチル化されるほどプロモーター活性は減少しており、*Agtr2* プロモーター領域のメチル化は転写活性を負に制御する可能性が示唆された。したがって、AT2R の遺伝子発現量とタンパク質発現量のギャップに関してはさらなる検討が必要であるものの、*Agtr2* プロモーター領域の DNA 低メチル化が胎児期低タンパク質暴露と出生後の食塩負荷による高血圧発症に関わる新たなエピジェネティックターゲットとして挙げられる可能性が考えられた。

第六章 総合討論

胎児期低タンパク質食暴露に起因した食塩感受性高血圧の発症機構を解明するために、先行研究では情報が不足していたライフステージ初期の仔ラットに焦点を当てて解析を進めることで、先行研究で見出していた腎臓中 *Ptger1* 遺伝子内の CpG island の高メチル化状態と *Ptger1* mRNA 高発現という正の相関が出生直後から若年期にかけても共通して観察されることを新たに見出し、この *Ptger1* の変動が安定的に保存されていることを裏付けた(第二章および第三章)。また、胎児期に刻印された疾患リスクに繋がるこの *Ptger1* のエピジェネティックな変動は、出生後の食環境により再プログラミングできる可能性を見出した(第四章)。さらに、第五章ではデジタル PCR の栄養学研究における応用の可能性を示したと共に、*Atgr2* が新たなエピジェネティックターゲットとなる可能性を提示した。

本研究は、ヒトへの応用のためにはさらなる研究を要するが、食塩感受性高血圧のエピジェネティックマーカーとして腎臓中 *Ptger1* と *Agtr2* を突き止め、それは出生後の栄養環境により改善されることを提示することでこの疾患に対する新たな予防・治療戦略の足掛かりを見出した。今後、本研究を基礎的知見として胎児期に刻印された疾患素因を子自身でリセットできる栄養環境や栄養成分についてさらに探索を進めることで、疾患リスクを防ぐための個別栄養指導や機能性食品開発等へと応用されていくことが期待される。