

博士論文（要約）

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

三好 萌

目次

略語一覧	3
第一章 序論	4
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	10
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	10
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	10
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	10
第六章 総合討論	10
引用文献	11
謝辞	17

略語一覧

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

第一章 序論

1-1. 非感染性疾患について

1-1-1. 非感染性疾患の現状

非感染性疾患（NCDs: Noncommunicable diseases）は、心血管疾患、がん、糖尿病や慢性呼吸器疾患といった不摂生な食事や運動不足、喫煙、過度の飲酒などの生活習慣に起因して発症する疾患の総称である。世界保健機関（WHO: World Health Organization）は、世界的な死因の 70% 以上（年間約 4100 万人）、日本においても死因の 82%（年間約 108 万人）を占める NCDs をグローバル規模で重要な解決すべき公衆衛生問題であると位置づけている。現在、NCDs に含まれるそれぞれの疾患に対する治療法や予防法は存在しているが、高い死亡率が示す通り明らかに不十分であると考えられる。

1-1-2. 非感染性疾患の危険因子

近年、この NCDs の重要な危険因子として、疾患発症者本人の生活習慣だけでなく、母親、特に妊娠期や授乳期の母親の栄養状態が決定的な役割を担う可能性が指摘されており、DOHaD（Developmental Origins of Health and Disease）と呼ばれる概念へと発展している^[1,2]。DOHaD は、「受精時、胎芽期、胎児期の子宮内及び乳幼児期の望ましくない環境がエピゲノム変化を起こし、それが疾病素因となり、出生後の環境との相互作用によって疾病が発症する。生活習慣病等の多因子疾患はこの 2 段階を経て発症する。」という学説がもととなっており、これに関連した莫大な疫学研究や動物実験のエビデンスが集積されてきている（序論 1-2.参照）。それらによると、胎児期や乳児期の栄養環境（栄養学的なプログラミング）は、高血圧、心血管疾患、糖尿病、肥満、アレルギー疾患、腎臓病、神経認知障害、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）やメタボリックシンドロームといった様々な NCDs の重要な危険因子であることが報告されている^[3,4,5,6,7,8,9,10]。

1-1-3. DOHaD に関連した非感染性疾患の治療・予防戦略の有用性

詳細は後述するが、DOHaD に関連した NCDs の発症機構として注目されている後天的な遺伝子発現修飾系は可逆的であり（序論 1-3.参照）、少なくとも動物実験では、特定の栄養的な干渉によって NCDs 疾患リスクを防げる可能が示唆されている^[4,11,12]。つまり、この DOHaD に関連した研究の進展は、NCDs の治療に対する新たな戦略を提示するだけでなく、NCDs の疾患表現型が顕在化する前の胎児期、若年期や成人期といった幅広いライフステージにおける潜在的な NCDs 罹患リスクへ干渉するといった NCDs の予防戦略に対して極めて有効な情報を提供しうることが期待される。

1-2. DOHaD と高血圧に関連した研究

上述した NCDs のうち、本論文では胎児期低タンパク質食暴露モデルを用いて高血圧、特に食塩摂取により惹起される食塩感受性高血圧の発症機序の解明を試みた。ここでは DOHaD と高血圧に関連した研究について疫学研究と動物実験に分けて述べる。

1-2-1. DOHaD と高血圧に関連した疫学研究

1990 年代に Barker らが、低出生体重児は成長後に虚血性心疾患発症リスクが高いことを見出した^[13,14]ことが、現在の DOHaD へと発展する契機となった。それ以降、妊娠期の栄養不良と栄養過多、どちらにおいても子の高血圧発症リスクが高まることが報告されている。飢餓時のコホート研究は、妊娠期の低栄養状態により成長後の子供は高血圧罹患リスクが高くなることを示唆している^[15,16]。また、妊娠期の特定の栄養成分不足が子供の高血圧の危険因子となる可能性も報告されており、例えばビタミン D 欠乏は血圧上昇のリスクを高めることが明らかとなっている^[17,18]。一方、妊娠期のタンパク質の過剰摂取（低炭水化物下における高タンパク質摂取を含む）も子供の血圧上昇を引き起こす可能性が示唆されている^[19,20,21]。

1-2-2. DOHaD と高血圧に関連した動物実験

前述した疫学研究は、栄養条件の介入や長期的な追跡、特定の臓器の解剖等が容易ではなく、現時点では高血圧発症の分子機構の解明には向いていない。この点、栄養条件の介入が容易であり、様々なヒトの疾患モデルが存在し明確な表現型を持つ動物モデルは、高血圧発症の分子機構の解明に適しており、ヒトの高血圧に対する予防・治療戦略を構築していくうえで有用である。

妊娠期の栄養不足の動物モデルとしては、カロリー制限や低タンパク質食モデルが、栄養プログラミングのメカニズムを研究するために広く使用されている。げっ歯類を用いた研究では、妊娠期の母獣に 30~70%のカロリー制限または 6~9%のタンパク質制限を行うと、成体の子孫に高血圧が見られることが一貫して報告されている^[22,23,24,25,26,27,28,29]。この際、妊娠期の母獣へのカロリー制限またはタンパク質制限の度合いが高いほど、子孫は早期に高血圧を発症する傾向が高まる可能性が示唆されている^[5]。一方、過剰栄養に関する研究では、妊娠期の高フルクトースの単独摂取が子孫の高血圧を誘発すること^[30]、さらにフルクトース、脂肪、および塩の過剰摂取は成体の子孫の血圧上昇に相乗効果を及ぼすことが示唆されている^[31,32]。また、妊娠期に高タンパク質/低炭水化物食に暴露された子孫は血圧の上昇と糸球体硬化症リスクが高いという特徴があることも明らかとなっている^[33]。

妊娠期の微量栄養素の欠乏も子孫の高血圧発症リスクと関連していることを裏付ける証拠も報告されている。例えば、妊娠期の母獣の低塩分^[34]、カルシウム欠乏^[35]、鉄欠乏^[36,37]、亜鉛欠乏^[38]やビタミン D 欠乏^[39]は、成体の子孫で血圧上昇につながることを示された。詳細は後述するが、胎児期の栄養環境による疾患形成の分子機構として、遺伝子発現のエピジェネティックな制御、特に DNA メチル化状態の変化が関与していると考えられており、メチオニン、葉酸、ビタミン B2、B6、B12、コリンなどの補因子（メチルドナー食）はメチル基のドナーとなる栄養素として重要な役割を果たすと注目されている。しかし、妊娠期のメチルドナー食は子

孫の健康を推進するという研究がある^[40]一方で、子孫の高血圧を発症するという報告もあり^[41]、これらの矛盾する結果を解決するためにさらなる研究が期待される。

1-3. DOHaD の分子機構

1-3-1. 後天的な遺伝子修飾

DOHaD の分子機構としては、DNA 塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子修飾であるエピジェネティックを媒介とした遺伝子発現制御が注目されている。発達初期の栄養環境により、子孫のエピジェネティック修飾に変化がおき（エピジェネティックマーカー）、それが記憶され続けることで後に遺伝子変化などが惹起され、疾患発症へと繋がっていくと考えられている^[42]。主なエピジェネティック修飾としては、DNA メチル化、ヒストン修飾やノンコーディング RNA があり、特に DNA メチル化は強固な記憶としてゲノムに残ることから DOHaD に関連した研究の分子機構探索において最も注目されている^[43]。本論文においても、DOHaD の分子機構として DNA メチル化変化の関与を仮定して検討を行った。エピジェネティック修飾は、DNA 配列やヒストンの結合への化学残基の結合と放出に依存するため、可逆的であり、疾患発症前に潜在的に治療可能である。

1-3-2. 哺乳類における DNA メチル化機構

DNA メチル化とは、ゲノム DNA 配列中のシトシンのピリミジン環の 5 位炭素原子にメチル基が付与することで、主にシトシン-グアニン配列（以下、CpG）でみられる。この DNA メチル化機構を触媒する酵素として DNA メチルトランスフェラーゼファミリーが知られている^[44, 45]。DNA メチル化の維持は、DNMT1（DNA methyltransferase 1）酵素の触媒により、S-アデノシルメチオンをメチル基ドナーとして新しい鎖を特異的にメチル化することで行われる^[46]。標的部位の片側の鎖のみがメチル化（ヘミメチル化）された DNA と特異的に結合する UHRF1 により、ヒストン H3 の 23 番目のリジン残基がユビキチン化され、このユビキチン化ヒストン H3 との相互作用を介して DNMT1 は DNA メチル化部位へ集積される^[46]。新たに DNA メチル化を形成する際は、DNMT3A（DNA methyltransferase 3A）と DNMT3B（DNA methyltransferase 3B）が中心的な役割を担っている^[46]。これに対して、DNA の脱メチル化に関しては、水酸化酵素である TET（Tet Methylcytosine Dioxygenase）が 5-メチルシトシンを水酸化し、その後 DNA グリコシラーゼの TDG（Thymine DNA Glycosylase）により塩基が除去、修復されることで脱メチル化が起こると言われている^[47, 48]。この機構とは別に、シトシン脱アミノ化酵素による 5-メチルシトシンからチミンへの変換と、その後の TDG などの相互作用を介した修復機構が関与する脱メチル化機構が存在すると考えられている^[48]。

1-3-3. DNA メチル化と遺伝子発現制御

一般的に、DNA メチル化、特に遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化は転写活性を抑制することが知られている。これは、メチル化された DNA に特異的に結合する MBD ドメインを

持つタンパク質がメチル化 DNA に結合し、転写因子をブロックするためであると考えられている^[49]。さらにこれらのタンパク質はコアとなって、ヒストン脱アセチル化酵素を含むタンパク質複合体をメチル化 DNA 上に形成し、転写抑制因子として働く機構もあることが報告されている^[49]。

ゲノム全体の網羅的な解析（メチローム解析）では、ゲノム全体ではプロモーター領域より遺伝子間や遺伝子内領域の方がメチル化を受けており、遺伝子内の DNA メチル化と転写活性は正の相関関係がみられることが報告されている^[50, 51, 52]。遺伝子内領域における DNA メチル化の生理的な意義に関しては未だに不明な点が多いが、遺伝子内の *Dnmt3b* 依存性 DNA メチル化は遺伝子内への誤った RNA ポリメラーゼ II の結合や異常な転写開始が起こらないように保護し、遺伝子転写開始の忠実度に関与する働きがある可能性が示唆されている^[53]。

1-4. 当研究室における先行研究と修士論文での成果

1-4-1. 先行研究と本論文における動物モデル

先行研究と本論文では、高血圧や脳卒中を自然発症し、ヒトの本態性高血圧と脳卒中の疾患モデル動物として広く活用されている、SHRSP ラット（stroke-prone spontaneously hypertensive rat）を用いた。SHRSP ラットは、高血圧を発症する SHR（spontaneously hypertensive rat）系ラットのうち毎世代脳卒中で死亡した親からの仔を選抜・交配して作出され、維持されてきた系統である。SHRSP ラットが高血圧や脳卒中発症する原因遺伝子に関しては、未だに不明な点が多いが、エポキシエイコサトリエン酸を代謝する酵素をコードしている *Ephx2*（

Epoxide Hydrolase 2）、グルタチオン S-トランスフェラーゼをコードしている *Gstm1*（Glutathione S-Transferase M1）やナトリウム/リン酸共輸送体をコードしている *Slc34a1*（Solute Carrier Family 34 Member 1）などが候補遺伝子と言われている^[54]。

1-4-2. 当研究室における先行研究

胎児期に低タンパク質食暴露された SHRSP 仔ラットは、成長後の食塩負荷により血圧が顕著に上昇（食塩感受性高血圧を発症）することや寿命が短命になることを見出した^[55]。また、この食塩感受性高血圧発症リスクの増加や寿命の短命化は孫世代にも引き継がれることも明らかにした。その分子機構として、腎臓において血圧調節に関与するレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系に着目した研究を行い、胎児期に低タンパク質食暴露された SHRSP 仔ラットは、腎臓中のアルドステロン合成酵素 *CYP11B2* のタンパク質レベルが顕著に増加していることを見出した^[56]。

1-4-3. 修士論文での成果^[57]

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発症に腎臓中 DNA メチル化状態の変化とそれに伴う遺伝子発現変化が関与していると仮定し、メチローム解析やトランスクリプトーム解析といった複数のオミクス解析を活用することで分子機構の探索を行った。

まず、胎児期低タンパク質食暴露に起因して食塩感受性高血圧を発症した成獣仔ラットの腎臓を用いて、この疾患モデルにおいて初めてメチローム解析を試みた。その結果、胎児期低タンパク質食暴露の影響により、23 遺伝子近傍の DNA メチル化状態が変化しており、興味深いことにこの中にはナトリウム保持に関与するプロスタグランジン E2 (PGE2) レセプターをコードしている *Ptger1* (Prostaglandin E2 Receptor EP1 Subtype) 遺伝子内の高メチル化が含まれていることを見出した。その後、バイサルファイトシーケンス法によりこの *Ptger 1* 領域の DNA メチル化状態を評価し、成長後の食塩負荷の有無にかかわらず胎児期低タンパク質食暴露の影響により *Ptger1* 遺伝子内が高メチル化状態であることを明らかにした。さらに、*Ptger1* mRNA 発現量は、成長後の食塩負荷の有無にかかわらず胎児期低タンパク質食暴露の影響により有意に増加しており、*Ptger1* 遺伝子内の DNA メチル化状態と遺伝子発現は正の相関を示すことが示唆された。

次に、トランスクリプトーム解析で得た情報をもとに、胎児期低タンパク質食暴露と成長後の食塩負荷により、*Ptger1* の下流遺伝子でありナトリウムチャンネルをコードしている *Enaca* (Sodium Channel Epithelial 1 Subunit Alpha) mRNA 発現量が有意に低下していること、この変化は食塩負荷されていない場合は見られないことを明らかにした。

さらに、当研究室で蓄積してきた胎児期低タンパク質食暴露された胎児 (妊娠 21 日目)、授乳期の仔ラット (出生後 15 日目)、成獣期の仔ラット (12 週齢) のトランスクリプトーム解析データを用い、胎児期栄養と経時的要因により変動する遺伝子を探索したところ、*Ptger1* 遺伝子の上流遺伝子であり PGE2 合成酵素をコードしている *Ptges3* (Prostaglandin E Synthase 3) が含まれており、特に胎児期低タンパク質食暴露された授乳期の仔ラットの *Ptges3* mRNA 発現量が、対照群と比較して減少傾向であることを見出した。

1-5. 本研究の目的

前述したとおり、これまでの SHRSP ラットを用いた先行研究や修士論文では、胎児期低タンパク質食暴露が食塩感受性高血圧発症リスクを高めることを見出し、その分子機構について主に成獣仔ラットの腎臓を用いて解析してきた。この解析では、成長後に食塩負荷という特徴的な栄養環境にも暴露されているが、胎児期低タンパク質食暴露に起因した DNA メチル化機構を探索するためには、食塩負荷前のサンプルを解析する必要性が考えられた。また、これまで成獣仔ラットを用いた研究を中心的に行ってきたが、潜在的な食塩感受性高血圧の罹患リスクへ干渉し再プログラミングするといった予防戦略を構築していくためには、授乳期や若年期の実験的データが不足しているという課題が残った。

そこで本研究では、胎児期低タンパク質食を暴露した SHRSP ラットを用いて、食塩感受性高血圧の発症前にすでに腎臓内 DNA メチル化変化による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かと仮定し、この発展的仮説を検討することを目的とした。

まず、胎児期低タンパク質食暴露された授乳期の仔ラットの腎臓を用いて、メチローム解析とトランスクリプトーム解析のデータを統合することで、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に至る潜在的な遺伝子候補の探索を行った（第二章）。続いて、前章で絞り込んだ特定の遺伝子候補が、胎児期低タンパク質食暴露された授乳期や若年期の仔ラットの腎臓で経時的にはどのような影響を受けているのか検討した（第三章）。さらに次章では、第二章で絞り込んだ特定の遺伝子候補が、胎児期低タンパク質食暴露された仔ラットが若年期に異なるタンパク質の栄養介入を受けることでどのような影響を受けているのかを検証した（第四章）。最終章では、これまでの章と異なり、先行研究で用いた成獣仔ラットの分子機構探索の際に残った技術的課題等に対して、デジタル PCR による遺伝子発現測定系を構築やレポーターアッセイによる特定の DNA メチル化状態と転写活性の関係を検討することにより解決を試みた（第五章）。

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

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

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

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

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

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

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

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第六章 総合討論

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

引用文献 (第一章 序論 該当箇所のみ抜粋)

1. Hsu, C. N.; Tain, Y. L., The Good, the Bad, and the Ugly of Pregnancy Nutrients and Developmental Programming of Adult Disease. *Nutrients* **2019**, *11* (4).
2. Hanson, M., The birth and future health of DOHaD. *J Dev Orig Health Dis* **2015**, *6* (5), 434-7.
3. Paauw, N. D.; van Rijn, B. B.; Lely, A. T.; Joles, J. A., Pregnancy as a critical window for blood pressure regulation in mother and child: programming and reprogramming. *Acta Physiol (Oxf)* **2017**, *219* (1), 241-259.
4. Mathias, P. C.; Elmhiri, G.; de Oliveira, J. C.; Delayre-Orthez, C.; Barella, L. F.; Tófolo, L. P.; Fabricio, G. S.; Chango, A.; Abdennebi-Najar, L., Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. *Eur J Nutr* **2014**, *53* (3), 711-22.
5. Hsu, C. N.; Tain, Y. L., The Double-Edged Sword Effects of Maternal Nutrition in the Developmental Programming of Hypertension. *Nutrients* **2018**, *10* (12).
6. Nüsken, E.; Dötsch, J.; Weber, L. T.; Nüsken, K. D., Developmental Programming of Renal Function and Re-Programming Approaches. *Front Pediatr* **2018**, *6*, 36.
7. Langley-Evans, S. C., Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. *J Anat* **2009**, *215* (1), 36-51.
8. Bagby, S. P., Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming. *J Nutr* **2007**, *137* (4), 1066-72.
9. Hoffman, D. J.; Reynolds, R. M.; Hardy, D. B., Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutr Rev* **2017**, *75* (12), 951-970.
10. Remacle, C.; Bieswal, F.; Bol, V.; Reusens, B., Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *Am J Clin Nutr* **2011**, *94* (6 Suppl), 1846S-1852S.
11. Noyan-Ashraf, M. H.; Wu, L.; Wang, R.; Juurlink, B. H., Dietary approaches to

positively influence fetal determinants of adult health. *FASEB J* **2006**, *20* (2), 371-3.

12. Care, A. S.; Sung, M. M.; Panahi, S.; Gragasin, F. S.; Dyck, J. R.; Davidge, S. T.; Bourque, S. L., Perinatal Resveratrol Supplementation to Spontaneously Hypertensive Rat Dams Mitigates the Development of Hypertension in Adult Offspring. *Hypertension* **2016**, *67* (5), 1038-44.

13. Osmond, C.; Barker, D. J.; Winter, P. D.; Fall, C. H.; Simmonds, S. J., Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* **1993**, *307* (6918), 1519-24.

14. Barker, D. J.; Fall, C. H., Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child* **1993**, *68* (6), 797-9.

15. Hult, M.; Tornhammar, P.; Ueda, P.; Chima, C.; Bonamy, A. K.; Ozumba, B.; Norman, M., Hypertension, diabetes and overweight: looming legacies of the Biafran famine. *PLoS One* **2010**, *5* (10), e13582.

16. Stein, A. D.; Zybert, P. A.; van der Pal-de Bruin, K.; Lumey, L. H., Exposure to famine during gestation, size at birth, and blood pressure at age 59 y: evidence from the Dutch Famine. *Eur J Epidemiol* **2006**, *21* (10), 759-65.

17. Hrudevy, E. J.; Reynolds, R. M.; Oostvogels, A. J.; Brouwer, I. A.; Vrijkotte, T. G., The Association between Maternal 25-Hydroxyvitamin D Concentration during Gestation and Early Childhood Cardio-metabolic Outcomes: Is There Interaction with Pre-Pregnancy BMI? *PLoS One* **2015**, *10* (8), e0133313.

18. Williams, D. M.; Fraser, A.; Fraser, W. D.; Hyppönen, E.; Davey Smith, G.; Deanfield, J.; Hingorani, A.; Sattar, N.; Lawlor, D. A., Associations of maternal 25-hydroxyvitamin D in pregnancy with offspring cardiovascular risk factors in childhood and adolescence: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Heart* **2013**, *99* (24), 1849-56.

19. Campbell, D. M.; Hall, M. H.; Barker, D. J.; Cross, J.; Shiell, A. W.; Godfrey, K. M., Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol* **1996**, *103* (3), 273-80.

20. Shiell, A. W.; Campbell-Brown, M.; Haselden, S.; Robinson, S.; Godfrey, K. M.;

Barker, D. J., High-meat, low-carbohydrate diet in pregnancy: relation to adult blood pressure in the offspring. *Hypertension* **2001**, *38* (6), 1282-8.

21. Hrolfsdottir, L.; Halldorsson, T. I.; Rytter, D.; Bech, B. H.; Birgisdottir, B. E.; Gunnarsdottir, I.; Granström, C.; Henriksen, T. B.; Olsen, S. F.; Maslova, E., Maternal Macronutrient Intake and Offspring Blood Pressure 20 Years Later. *J Am Heart Assoc* **2017**, *6* (4).

22. Franco, M. o. C.; Ponzio, B. F.; Gomes, G. N.; Gil, F. Z.; Tostes, R.; Carvalho, M. H.; Fortes, Z. B., Micronutrient prenatal supplementation prevents the development of hypertension and vascular endothelial damage induced by intrauterine malnutrition. *Life Sci* **2009**, *85* (7-8), 327-33.

23. Ozaki, T.; Nishina, H.; Hanson, M. A.; Poston, L., Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* **2001**, *530* (Pt 1), 141-52.

24. Tain, Y. L.; Hsieh, C. S.; Lin, I. C.; Chen, C. C.; Sheen, J. M.; Huang, L. T., Effects of maternal L-citrulline supplementation on renal function and blood pressure in offspring exposed to maternal caloric restriction: the impact of nitric oxide pathway. *Nitric Oxide* **2010**, *23* (1), 34-41.

25. Sathishkumar, K.; Elkins, R.; Yallampalli, U.; Yallampalli, C., Protein restriction during pregnancy induces hypertension and impairs endothelium-dependent vascular function in adult female offspring. *J Vasc Res* **2009**, *46* (3), 229-39.

26. Woods, L. L.; Ingelfinger, J. R.; Nyengaard, J. R.; Rasch, R., Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* **2001**, *49* (4), 460-7.

27. Cambonie, G.; Comte, B.; Zydorczyk, C.; Ntimbane, T.; Germain, N.; Lê, N. L.; Pladys, P.; Gauthier, C.; Lahaie, I.; Abran, D.; Lavoie, J. C.; Nuyt, A. M., Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2007**, *292* (3), R1236-45.

28. Bai, S. Y.; Briggs, D. I.; Vickers, M. H., Increased systolic blood pressure in rat offspring

following a maternal low-protein diet is normalized by maternal dietary choline supplementation. *J Dev Orig Health Dis* **2012**, *3* (5), 342-9.

29. McMillen, I. C.; Robinson, J. S., Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* **2005**, *85* (2), 571-633.
30. Lee, W. C.; Wu, K. L. H.; Leu, S.; Tain, Y. L., Translational insights on developmental origins of metabolic syndrome: Focus on fructose consumption. *Biomed J* **2018**, *41* (2), 96-101.
31. Tain, Y. L.; Lee, W. C.; Leu, S.; Wu, K.; Chan, J., High salt exacerbates programmed hypertension in maternal fructose-fed male offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2015**, *25* (12), 1146-51.
32. Tain, Y. L.; Lee, W. C.; Wu, K. L. H.; Leu, S.; Chan, J. Y. H., Maternal High Fructose Intake Increases the Vulnerability to Post-Weaning High-Fat Diet-Induced Programmed Hypertension in Male Offspring. *Nutrients* **2018**, *10* (1).
33. Thone-Reineke, C.; Kalk, P.; Dorn, M.; Klaus, S.; Simon, K.; Pfab, T.; Godes, M.; Persson, P.; Unger, T.; Hocher, B., High-protein nutrition during pregnancy and lactation programs blood pressure, food efficiency, and body weight of the offspring in a sex-dependent manner. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2006**, *291* (4), R1025-30.
34. Koleganova, N.; Piecha, G.; Ritz, E.; Becker, L. E.; Müller, A.; Weckbach, M.; Nyengaard, J. R.; Schirmacher, P.; Gross-Weissmann, M. L., Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. *Am J Physiol Renal Physiol* **2011**, *301* (2), F344-54.
35. Bergel, E.; Belizán, J. M., A deficient maternal calcium intake during pregnancy increases blood pressure of the offspring in adult rats. *BJOG* **2002**, *109* (5), 540-5.
36. Gambling, L.; Dunford, S.; Wallace, D. I.; Zuur, G.; Solanky, N.; Srail, S. K.; McArdle, H. J., Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat. *J Physiol* **2003**, *552* (Pt 2), 603-10.
37. Lewis, R. M.; Petry, C. J.; Ozanne, S. E.; Hales, C. N., Effects of maternal iron restriction in the rat on blood pressure, glucose tolerance, and serum lipids in the 3-month-old offspring. *Metabolism* **2001**, *50* (5), 562-7.

38. Tomat, A.; Elesgaray, R.; Zago, V.; Fasoli, H.; Fellet, A.; Balaszczuk, A. M.; Schreier, L.; Costa, M. A.; Arranz, C., Exposure to zinc deficiency in fetal and postnatal life determines nitric oxide system activity and arterial blood pressure levels in adult rats. *Br J Nutr* **2010**, *104* (3), 382-9.
39. Tare, M.; Emmett, S. J.; Coleman, H. A.; Skordilis, C.; Eyles, D. W.; Morley, R.; Parkington, H. C., Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats. *J Physiol* **2011**, *589* (Pt 19), 4777-86.
40. O'Neill, R. J.; Vrana, P. B.; Rosenfeld, C. S., Maternal methyl supplemented diets and effects on offspring health. *Front Genet* **2014**, *5*, 289.
41. Tain, Y. L.; Chan, J. Y. H.; Lee, C. T.; Hsu, C. N., Maternal Melatonin Therapy Attenuates Methyl-Donor Diet-Induced Programmed Hypertension in Male Adult Rat Offspring. *Nutrients* **2018**, *10* (10).
42. Skvortsova, K.; Iovino, N.; Bogdanović, O., Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19* (12), 774-790.
43. Ngo, S.; Sheppard, A., The role of DNA methylation: a challenge for the DOHaD paradigm in going beyond the historical debate. *J Dev Orig Health Dis* **2015**, *6* (1), 2-4.
44. Bestor, T. H., The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **2000**, *9* (16), 2395-402.
45. Jurkowska, R. Z.; Jurkowski, T. P.; Jeltsch, A., Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem* **2011**, *12* (2), 206-22.
46. Goll, M. G.; Bestor, T. H., Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **2005**, *74*, 481-514.
47. Wu, X.; Zhang, Y., TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet* **2017**, *18* (9), 517-534.
48. Bochtler, M.; Kolano, A.; Xu, G. L., DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *Bioessays* **2017**, *39* (1), 1-13.

49. Du, Q.; Luu, P. L.; Stirzaker, C.; Clark, S. J., Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics* **2015**, *7*(6), 1051-73.
50. Ball, M. P.; Li, J. B.; Gao, Y.; Lee, J. H.; LeProust, E. M.; Park, I. H.; Xie, B.; Daley, G. Q.; Church, G. M., Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol* **2009**, *27*(4), 361-8.
51. Laurent, L.; Wong, E.; Li, G.; Huynh, T.; Tsigos, A.; Ong, C. T.; Low, H. M.; Kin Sung, K. W.; Rigoutsos, I.; Loring, J.; Wei, C. L., Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* **2010**, *20*(3), 320-31.
52. Rauch, T. A.; Wu, X.; Zhong, X.; Riggs, A. D.; Pfeifer, G. P., A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*(3), 671-8.
53. Neri, F.; Rapelli, S.; Krepelova, A.; Incarnato, D.; Parlato, C.; Basile, G.; Maldotti, M.; Anselmi, F.; Oliviero, S., Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation. *Nature* **2017**, *543*(7643), 72-77.
54. Nabika, T.; Ohara, H.; Kato, N.; Isomura, M., The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies? *Hypertens Res* **2012**, *35*(5), 477-84.
55. Otani, L.; Shirasaka, N.; Yoshizumi, H.; Murakami, T., The effects of maternal mild protein restriction on stroke incidence and blood pressure in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**, *68*(3), 488-94.
56. Otani, L.; Sugimoto, N.; Kaji, M.; Murai, M.; Chang, S. J.; Kato, H.; Murakami, T., Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the enhancement of salt sensitivity caused by prenatal protein restriction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* **2012**, *23*(8), 892-9.
57. Miyoshi, M.; Sato, M.; Saito, K.; Otani, L.; Shirahige, K.; Miura, F.; Ito, T.; Jia, H.; Kato, H., Maternal Protein Restriction Alters the Renal. *Nutrients* **2018**, *10*(10).

謝辞

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学研究科、社会連携講座「健康機能栄養学」で行われました。

本研究の推進にあたり、多くのご指導、ご助言、また恵まれた研究環境を賜りました当研究室特任教授である加藤久典先生に心より感謝申し上げます。修士課程入学以来5年間にわたり、公私ともに様々なことがありましたが、研究を遂行していけるように、いつも寄り添い様々な機会を与えていただきましたこと、心から御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、当研究室の賈慧娟特任准教授、斎藤憲司氏、古川恭平氏には実験手法や論文執筆等に対して丁寧な指導を賜り、多くのことを学ばせていただきましたこと、心から御礼申し上げます。また、当研究室の前身 総括寄付講座「食と生命」に所属されていた大谷りら博士、青山晋也博士、今門泰久氏、佐藤正幸氏には実験サンプルの提供や手法指導、ご助言を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。

本研究におけるデータ取得、解析においては以下の皆様にもより多くのご支援を頂きましたこと、厚く御礼申し上げます。創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業に参画されている九州大学医学研究院 伊藤隆司教授、三浦史仁准教授、柴田由希子氏（メチローム解析におけるデータ取得及び解析支援）。東京大学定量生命科学研究科 白髭克彦教授、藤木克則助教（メチローム解析におけるご助言）。東京大学大学院農学生命科学研究科 潮秀樹教授、小南友里特任助教（メタボローム解析におけるデータ取得及び解析支援）。国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 北條浩彦室長、福岡聖之氏（デジタル PCR とルシフェラーゼアッセイにおけるデータ取得、解析、論文執筆支援）。東京大学大学院農学生命科学研究科 岡田晋治特任准教授、石島智子特任助教（DNA マイクロアレイ解析におけるデータ解析環境の提供）。東京大学大学院農学生命科学研究科 清水誠特任准教授（アミノ酸分析の解析支援）。近畿大学農学部食品栄養学科 村上哲男教授、鈴木直也氏（第五章動物実験）。

さらに、本研究科の国際交流促進プログラムにより留学させていただいた CSIRO Health and Biosecurity Michael Fenech 教授、Maryam Hor 氏のもとの研究経験により、より豊かな視点で研究活動に邁進できましたこと、厚く御礼申し上げます。

健康栄養機能学研究室の皆様、卒業生（総括寄付講座、食と生命）の皆様には日頃から充実した研究生生活を支え、実験への数多くのご助言とご協力を賜りましたこと、心より御礼申し上げます。

最後に、私の大学院進学と博士号取得を応援し、多くの面で支え続けてくれた最愛の家族に深く感謝致します。

令和二年 5 月

三好 萌