

Ⅲ. 研究目的

現在に至るまで多数の疫学研究や動物実験、ヒトを対象とした研究により、さまざまな成人期慢性疾患の発症基盤が、胎児期における子宮内環境と関連することが明らかとなってきている。母体低栄養など子宮内の劣悪な環境が、成人後の代謝や生理機能に影響を及ぼし、成人期慢性疾患の発症につながると考えられ、ヒストン修飾や DNA メチル化に代表される DNA 塩基配列変化を伴わない遺伝子発現変化であるエピジェネティクスがその Fetal programming の中心的役割を担っていると考えられてはいるものの、その詳細な機序は未だ解明されていない。また、ビタミン B 群のひとつである葉酸は、DNA 合成過程においてメチル基のドナーであり多様なエピジェネティック経路に関わっていると推測されるが、その詳細な働きも未だ不明である。そこで、Fetal Programming には葉酸が大きく関与しているのではないかと仮説をたてた。葉酸は DNA 合成過程に欠かせないビタミンであり、従ってその欠乏は DNA 合成の盛んな場所においてより影響が大きいと考えられる。葉酸欠乏による神経管閉鎖症は現在までに多くの研究がなされている有名な事象であり、DNA 合成の最も盛んである脳組織では、神経管閉鎖症以外の影響も及ぼしているのではないかと考え、本研究では胎仔臓器のなかで特に胎仔脳での解析を行うこととした。本研究構想の目的は第一に、“葉酸欠乏モデルマウス”を作成し、母体葉酸欠乏による胎仔胎盤発育への影響を解析することであり、次に母体葉酸欠乏による胎仔脳と胎盤における葉酸のエピジェネティック制御機構を具体的に解明することにある。

Ⅳ. 研究方法

1. マウス

全ての実験動物の取り扱い、東北大学における動物実験に関する指針に沿って行い、東北大学動物実験計画承認を得た上で行った (21 医動-137)。東北大学動物実験施設にて交配し産生されたマウスを用い、オスとメスを交配させた翌日を妊娠 1 日とした。C57BL/6N マウスを、①妊娠全期間通常餌で飼育した C 群、②妊娠前半期を通常餌、妊娠後半期を葉酸を含まない葉酸欠乏餌で飼育した FD(8-17)群、③妊娠全期間葉酸欠乏餌で飼育した FD(0-17)群、④妊娠前半期を通常餌、妊娠後半期をカゼインを 2 分の 1 に減量したタンパク制限餌で飼育した PR(8-17)群の 4 群に分類した (図 1)。餌の成分表を表 1 に示す。マウスは適温にて食餌、水分共に自由摂取可能とし、12 時間サイクルのもとに管理された。妊娠 17 日目にマウス腹部切開により胎仔・胎盤を娩出し、胎盤重量及び胎仔体重を計測した。胎仔の頭部を切開し胎仔脳を摘出した。胎仔脳と胎盤を液体窒素で凍結後、-80℃で保存し、以下の実験に使用した。実験に用いたマウス母体・胎仔数を表 2 に示す。

2. RNA の抽出、cDNA の合成

RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用い、以下の手順で行った。サンプルをハサミで細かく刻み、RLT 溶液 600 μ l を加え、シリンジに取り付けた 21G の注射針中に数十回通して破碎し、QIAshredder スピンカラムにライセートを添加し、2 分間遠心しホモジナイゼーションを行った。さらに同量の 70%エタノールを添加し、速やかに混和し、2ml コレクションチューブの中にセットした RNeasy スピンカラムにアプライし、10,000rpm で 15 秒間遠心操作を行った。ろ液を捨て、350 μ l の RW1 溶液を RNeasy スピンカラムに加え、10,000rpm で 15 秒間遠心操作を行った。10 μ l の DNase I ストック溶液を RDD 溶液に加えて混和し、先ほどの RNeasy スピンカラムに添加し、15 分間室温に置き、DNase 処理を行った。その後、350 μ l の RW1 溶液を RNeasy スピンカラムに加え、10,000 rpm で 15 秒間遠心操作を行った。ろ液を捨て、500 μ l の RPE 溶液を RNeasy スピンカラムに加え、10,000rpm で 15 秒間遠心操作を行った。ろ液を捨て、さらに 500 μ l の RPE 溶液を RNeasy スピンカラムに加え、10,000rpm で 2 分間遠心操作を行った。RNeasy スピンカラムを新しい 1.5ml コレクションチューブにセットし、RNase フリー水

50 μ l をスピンカラム・メンブレンに直接添加し、10,000rpm で 1 分間遠心操作を行い、RNA を抽出した。

抽出した RNA 2 μ g と、50 μ M Oligo dT 1 μ l、10mM の dATP、dGTP、dCTP、dTTP を含んだ dNTP mix 1 μ l と H₂O を加えて全体で 10 μ l とし、65°C で 5 分間加熱し、氷上に 1 分間静置した後、2 μ l の 10×RT buffer、4 μ l の 25mM MgCl₂ 溶液、2 μ l の 0.1M DTT、1 μ l の RNaseOUT、1 μ l の SuperscriptIII RT を加え、50°C で 50 分間、85°C で 5 分間インキュベートし、4°C の氷上に静置したのち、1 μ l の RNase H を加えて混和し、37°C で 20 分間加温し、反応を終了させて cDNA の合成を行った。

3. リアルタイム RT-PCR

Mastercycler ep realplex (epENDORF 社) を用いてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。使用したプライマーの配列を表 3 に示す。

SYBR Premix	10.0 (μ l)
Primer(F+R)	1.6
Template(cDNA)	0.75
H ₂ O	7.75
Total	20.0 (μ l) . . . A

A 液をプレートにセッティングし、

- ①95°C 15 分間
- ②94°C 15 秒間
- ③60°C 30 秒間
- ④72°C 30 秒間
- ⑤95°C 15 秒間
- ⑥60°C 15 秒間

(②~④を 40 サイクル繰り返す)

の後、比較 Ct 法を用いてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

4. ゲノム DNA 抽出

ゲノム DNA の抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen 社)を用いて、以下の手順で行った。

サンプル組織をハサミで細かく刻んだ後、180 μ l Buffer ATL を加え、20 μ l プロテイナーゼ K を加えてピペッティングする。10 μ l RNase A を加えてピペッティングし室温に 10 分間静置した後、4 μ l RNase A を加えてピペッティングし、室温に 5 分間静置して RNA を除去し、55°C で一晩インキュベートする。200 μ l Buffer AL を加えて混和し、70°C で 10 分間加熱した後、200 μ l 100%エタノールを加えて混和する。その溶液を DNeasy Mini spin column にアプライし、8,000rpm で 1 分間遠心する。さらに、500 μ l Buffer AW1 を加え、8,000rpm で 1 分間遠心する。500 μ l の Buffer AW2 をアプライし 13,200rpm で 3 分間遠心操作し、さらに 13,200rpm で 1 分間遠心する。スピンカラムを新しい 1.5ml チューブにセットし、100 μ l の Buffer AE をアプライし 5 分間静置した後、8,000rpm で 1 分間遠心し、さらに 100 μ l Buffer AE をアプライし 3 分間静置した後、8,000rpm で 1 分間遠心操作をして、ゲノム DNA を抽出した。

5. バイサルファイトシークエンス法

DNA では 4 つの塩基のうちシトシンがメチル化されるが、このメチル化シトシンを検出するためにバイサルファイト法を用いた。DNA をバイサルファイト (亜硫酸水素塩) で処理すると、シトシン塩基はウラシルに塩基置換されるが、シトシンがメチル化されているとバイサルファイトによる反応から保護され塩基置換が起きない。バイサルファイト処理後のシークエンス解析で従来の塩基と比較し、ウラシルに変換されなかったシトシン塩基(シークエンス反応ではチミンとして表現される)をメチル化シトシンと同定する方法である。

バイサルファイト・シークエンス解析は、EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen 社)を用いて行った。使用したプライマーの配列を表 3 に示す。以下に詳細な手順を示す。

5-1. バイサルファイト処理

ゲノム DNA 溶液	x (Max 40 μ l)
RNase フリー水	40·x
Bisulfite Mix	85
DNA Protect Buffer	15
Total	140

上記の表に従い 200 μ l PCR チューブに Bisulfite 反応液をセットアップし、混和する。

変性	5 分	99°C
インキュベーション	25 分	60°C
変性	5 分	99°C
インキュベーション	85 分	60°C
変性	5 分	99°C
インキュベーション	175 分	60°C
保持	不定	20°C

上記の表に従いサーマルサイクラーをセットし、インキュベーションを開始する。心操作する。ろ過液を捨てる。Buffer BD 500 μ l をスピнкаラムに添加し室温で 15 分間インキュベートする。カラムを最高速度で 1 分間遠心操作する。ろ過液を捨てる。Buffer BW 500 μ l を添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。ろ過液を捨てる。再度 Buffer BW 500 μ l を添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブにセットし、最高速度で 1 分間遠心操作して残存している液体を除去する。新しい 1.5ml のマイクロ遠心チューブにスピнкаラムをセットし、20 μ l の Buffer EB をメンブレン中央にアプライする。12,000rpm で 1 分間遠心操作を行い、精製した DNA を溶出する。

5-2. PCR amplification

HS ExTaq buffer X10	1.0 (μ l)
dNTPs (2.5mM) X10	1.0
MgCl ₂ (25mM)	0.8
Bisulfite primers(F+R)	0.5
Bisulfite treated DNA	0.5
HS ExTaq ポリメラーゼ	0.1
ddH ₂ O	6.1
Total	10.0

上記の表に従い調整したミックスをプレートにセッティングし、以下の表に従って RT-PCR 解析を行う。

①94°C	3 分間
②94°C	30 秒間
③58°C	30 秒間
④72°C	30 秒間
⑤72°C	1 分間
⑥4°C	保持

(②~④を 45 サイクル)

これらの生成物を 1.5%アガロースゲルに泳動し、発現を確認する。本研究では主としてヒストン修飾の変化に着目してエピジェネティック制御機構を解析し、メス FD(8-17)群の胎仔脳において高発現であった特徴的な遺伝子 *Bmp2*(*Bone morphogenetic protein 2*)について特に DNA メチル化の解析を追加した。

5-3. DNA のゲル切り出し

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社)を用い、以下の手順でゲル切り出しを行った。メスでアガロースゲルから DNA フラグメントを切り出しチューブに入れ、サンプルゲルの約3倍 (750 μ l) の Buffer QG を添加する。50 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、ボルテックスで溶液をよく混和する。ゲルが完全に溶解し、溶液の色が黄色であることを確認する。150 μ l のイソプロパノールを入れて混和する。QIAquick スピんカラムにサンプルをアプライし、10000rpm で1分間遠心操作する。500 μ l の Buffer QG をカラムに添加し10,000rpm で1分間遠心する。700 μ l の Buffer PE を添加し10,000rpm で1分間遠心する。ろ液を捨て、新しいチューブに移し、13,000rpm で2分間遠心操作する。新しい1.5ml のマイクロチューブにカラムを移し、20 μ l の Buffer EB をメンブレン中央にアプライして5分間静置したのち、10,000rpm で1分間遠心操作し、DNA を溶出する。

5-4. TA-cloning

TOPO TA Cloning Kit、PCR 2.1-TOPO Vector (invitrogen 社)を用いた。

TOPO TA Cloning Vector	1 (μ l)
Salt solution	1
BS-DNA	4
Total	6

上記のクローニングミックスを混和後、15分間室温、氷上に5分間静置した後、TOP10を添加し、氷上に30分静置する。その後、42 $^{\circ}$ C1分間のヒートショックを行い、氷上に5分間静置し、37 $^{\circ}$ CにインキュベートしたSOC培地を1,000 μ l加えて、37 $^{\circ}$ C、200rpmで3時間混和する。200 μ lの反応液をX-Gal 40 μ lを含むLBプレートに散布し37 $^{\circ}$ Cで一晩培養する。翌日、白コロニーを選択して採取する。

5-5. Colony amplification

採取した白コロニーを其々10 μ lのH₂Oに溶解し、Plasmid Amp Kit (QIAGEN 社)を用いて以下のミックスを作成する。

Plasmid Amp	8.8 (μ l)
Colony mix	1.0
Primer	0.2
Total	10.0

作成したミックスを以下のコンディションでPCRにかける。

①93 $^{\circ}$ C	2分間
②93 $^{\circ}$ C	20秒間
③68 $^{\circ}$ C	5分30秒間
④68 $^{\circ}$ C	5分間
(②~③を40サイクル)	

5-6. DNA シークエンス

DNA シークエンス解析は、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit を用いて以下のように行った。

SEQ Premix(2.5x)	4.0(μ l)
Plasmid Amp(PCR産物)	1.5
Primer(M13 FWD)	0.5
H ₂ O	4.0
Total	10.0

上記ミックスを以下のコンディションでPCRにかける。

①96 $^{\circ}$ C	1分間
②96 $^{\circ}$ C	10秒間

- ③50℃ 5 秒間
- ④60℃ 4 分間
- ⑤4℃ 保持

(②~④を 30 サイクル)

シーケンス PCR 終了後、Edge Bio PERFORMA DTR Gel Filtration Cartridges を用いて以下の手順で生成する。

カラムの斜面に PCR 産物 20 μ l を添加し、30000rpm で 3.5 分間遠心操作する。カラムを捨て、下のコレクションチューブを 60℃で 1 時間 30 分間乾燥させる。ホルムアミドを 20 μ l ずつ加え、混和する。生成液は、シーケンス用 96 穴プレートに移し、ABI3100 genetic analyzer(50cm capillary)にて DNA シーケンスを施行する。

6. クロマチン免疫沈降法

クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation、ChIP) は、タンパク質に対する抗体を用いて DNA とタンパク質との相互作用 (結合) をみる方法の一つで、特定のタンパク質が結合する DNA 上の部位とその配列を明らかにする方法である。

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (MILLIPORE 社)を用いて行い、胎仔脳サンプルでは H3K4-me3/H3K9-Ace (Upstate 社)を抗体に用い、胎盤サンプルでは H3K4-me3/H3K9-me3(Upstate 社)を抗体に用いて解析を行った。使用したプライマーの配列を表 3 に示す。以下に詳細な手順を示す。

6-1. クロマチンクロスリンク

組織をハサミで細かく切断し、PBS750 μ l 加えてボルテックスで攪拌する。1ml ツベルクリン用テルモシリッジに 23G 針をつけたもので攪拌しさらに液状にし、ボルテックスで攪拌する。250 μ l 4%パラホルムアルデヒドを加え、ボルテックスで攪拌する。37℃のウォーターバスで 10 分間クロスリンクする。

6-2. 細胞除去

クロスリンクを終えたサンプルを、4℃、3,000rpm で 3 分間遠心後、pellet を残し上清を捨てる。PBS 1,000 μ l を加え、ボルテックスで攪拌する。この操作を 2 回繰り返す。上清を捨て、[SDS 3,000 μ l + プロテアーゼインヒビター 120 μ l] 溶液を 500 μ l ずつ加え、氷上に 10 分間静置する。

6-3. 超音波破碎

DNA を 200~1,000 base pairs になるよう、ソニケーターを用いて破碎する。超音波破碎したサンプルを、4℃、13,000rpm で 15 分間遠心する。

6-4. 免疫沈降

サンプル数 \times (抗体数+2) 個のチューブを用意し、上清を其々 100 μ l ずつ新しいエッペンチューブにうつし、pellet は捨てる。抗体をいれるチューブ(サンプル数 \times 抗体数)に、[ChIP dilution buffer 15ml + プロテアーゼインヒビター 300 μ l] 溶液を、900 μ l ずつ加え、10 倍希釈する。10 倍希釈したチューブに、Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose ·50%Slurry を加える。4℃内で 30 分間ローテーションする。1,000G で 1 分間遠心し、上清を新しいエッペンチューブに移す。1~2 μ l の抗体を各々加え、4℃で overnight ローテーションする。上記の過程を経た(サンプル数 \times (抗体数+negative control)) 個のチューブに各々 40 μ l の Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose ·50%Slurry を加え、4℃で 60 分間ローテーシ

ョンする。1 分間 Capsulefuge で遠心し、上清を捨てる。

6-5. 洗浄

Low salt Immune Complex Wash Buffer を 1000 μ l 加え 4 $^{\circ}$ C で 1 回洗浄する。High salt Immune Complex Wash Buffer を 1000 μ l 加え 4 $^{\circ}$ C で 1 回洗浄する。LiCl Immune Complex Wash Buffer を 1,000 μ l 加え 4 $^{\circ}$ C で 1 回洗浄する。TE Buffer を 1,000 μ l 加え 4 $^{\circ}$ C で洗浄を 2 回繰り返す。

6-6. 溶出

[10%SDS 5ml+ NaHCO₃ 0.42g+H₂O 40ml]溶液を 250 μ l 加え、室温で 15 分間ローテーションする。1 分間遠心し、上清 250 μ l を新しいチューブに移す。6-6 のここまでの操作を再度施行し、上清を 500 μ l 回収する。

6-7. クロスリンク分離

溶出液 250 μ l に 5MNaCl 20 μ l を加え、65 $^{\circ}$ C で overnight 加熱する。0.5MEDTA 10 μ l+1M Tris-HCl 20 μ l+Proteinase K 2 μ l を加え、45 $^{\circ}$ C で 60 分間加温する。

6-8. DNA 回収

反応液：TE Saturated Phenol = 1:1 で Phenol を加え、よく混和し 2 分間静置する。室温で 10,000rpm, 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。採取した上層液（約 450 μ l）の 3 倍量の 100%エタノールを加え、混和した後、-80 $^{\circ}$ C で 30 分間冷却する。4 $^{\circ}$ C で 15,000rpm, 30 分間遠心する。上清を捨て、DNA pellet に 75%エタノールを 1,000 μ l 加え混和する。4 $^{\circ}$ C, 15,000rpm, 15 分間遠心する。上清を捨て、60 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱しエタノールを蒸発させる。DNA pellet に 50 μ l H₂O を加えよく混和し、得られた DNA 溶液を用いてリアルタイム PCR 法にて解析を行う。インプット DNA の値で補正する。

7. 統計解析

統計学分析は多群間の比較解析に One-way ANOVA 解析（Kruskal-Wallis test）を用い、さらに有意差を認めた場合に Dunn's multiple comparison test を用いて有意差検定を行った。また 2 群間の比較解析には Mann-Whitney test を用いた。P<0.05 を有意差ありとして検定を行った。統計ソフトは GraphPad Prism4 (GraphPad Software 社)を用いた。

V. 研究結果

1. 表現型

今回の研究では、葉酸欠乏群には奇形の発症が認められた。FD(0-17)群では小頭症・小顎症・眼球欠損・皮膚脆弱を全 35 胎仔のうち 1 胎仔、FD(8-17)群では小頭症・小顎症を全 45 胎仔のうち 1 胎仔認めた(図 2)。C 群には 40 胎仔中これらの奇形発症は認めなかった。C 群・FD(8-17)群・FD(0-17)群・PR(8-17)群の 4 群間において、マウス母体体重に食餌の違いによる差は認めなかった。胎仔体重については、FD(0-17)群、PR(8-17)群では C 群と比較して有意な差を認めなかった。しかし、FD(8-17)群のメスでは C 群と比較して有意な胎仔体重の減少を認めた (p<0.05)。FD(8-17)群のオスでも同様の傾向は認めるものの有意な差ではなかった (図 3-A)。

次に胎盤重量についてであるが、胎仔体重と同様に、FD(0-17)群、PR(8-17)群では C 群と比較して胎盤重量に有意な差を認めず、むしろやや増加傾向であった。しかし、ここでも FD(8-17)群のメスでは特徴的に C 群と比較して有意な胎盤重量の減少を認めた (p<0.05)。FD(8-17)群のオスでも同様の傾向は認めるものの有意な差ではなかった (図 3-B)。胎仔胎盤比をとったところ、メスでは、FD(8-17)群で有意に胎仔胎盤比が大きく (p<0.05)、FD(0-17)群・PR(8-17)群では有意に胎仔胎盤比が小さかった (p<0.05) (図 3-C)。

2. 胎盤における遺伝子発現変化とエピジェネティック変化

胎盤における遺伝子発現変化を比較するため、表 4 に示す発生発達遺伝子群・葉酸関連遺伝子群・インプリンティング遺伝子群についてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。その結果、C 群と FD(8-17)群の間で Igf-axis の遺伝子発現変化を認めた。具体的には FD(8-17)群のオス胎盤で *Igf2* (*Insulin-like growth factor 2*)の有意な増加と、*Igfbp1*(*Insulin-like growth factor binding protein 1*)の有意な減少を認めた。しかし、メス胎盤では *Igf2*,*Igfbp1* の発現量に有意な差は認めなかった。また、FD(8-17)群のメス胎盤では *Igfbp2* (*Insulin-like growth factor binding protein 2*)の有意な増加を認めた (図 4-A)。Igf-axis 以外の発生発達遺伝子群・葉酸関連遺伝子群・インプリンティング遺伝子群には有意な差を認めなかった。

さらに、FD(8-17)群のオス胎盤で有意な増加を認めた *Igf2* のプロモーター領域におけるヒストン修飾変化をクロマチン免疫沈降法により解析したところ、FD(8-17)群のオス胎盤において、活性型修飾である H3K4-me3 が顕著な上昇を認め ($p<0.05$)、また不活性型修飾である H3K9-me3 は顕著な低下を認めた(図 4-B)。

3. 胎仔脳における遺伝子発現変化とエピジェネティック変化

リアルタイム RT-PCR 法により、脳神経系関連遺伝子 96 個、発生発達関連遺伝子 11 個、葉酸関連遺伝子 14 個、インプリンティング遺伝子 8 個、の計 129 遺伝子 (表 4) につき C 群と FD(8-17)群について発現量比較を行った。

オス 3 個体、メス 3 個体で RT-PCR 法を用いてスクリーニングを行ったところ図 5 に示すとおり、メス胎仔脳ではオスに比べて発現変化を示した遺伝子数は多く、またその変化の割合も大きかった。FD(8-17)群で C 群に比べ遺伝子発現量変化を示しその割合が大きかった遺伝子をオス・メスそれぞれより抽出し、さらにその遺伝子群につき個体数を増加し新たに 8 個体ずつでリアルタイム RT-PCR 解析を行い比較検討を行った。オス・メス共通して変動した遺伝子群のうち、*Hdac7a* (*Histone deacetylase 7a*) は FD(8-17)群でオス・メス共通して C 群の約 2 分の 1 の発現低下を認めた($p<0.05$) (図 6-A)。また、*Folr1* (*Folate receptor 1*) についてはオスでは C 群に比べ FD(8-17)群において、メスでは C 群に比べ FD(0-17)群において、有意な発現上昇を認めた。(図 6-B) さらに、オス胎仔脳において *Folr1* のプロモーター領域のヒストン修飾変化の解析を行ったところ、活性型修飾である H3K9-Ace についてはいずれの群も C 群より有意な上昇を認め、H3K4-me3 では FD(8-17)群・FD(0-17)群・PR(8-17)群すべてにおいて上昇を認め、そのうち FD(0-17)群・PR(8-17)群において有意な上昇を認めた($p<0.05$) (図 6-C)。

オスでは変化無く、メスでのみ FD(8-17)群で有意な上昇を認めた遺伝子には *Bmp2* (*Bone morphogenetic protein*) ,*Cckbr* (*Cholecystokinin B receptor*) ,*Mc2r* (*Melanocortin 2 receptor*) など、骨形成・発生・摂食行動・耐糖能異常・肥満・ステロイド代謝など生活習慣病関連遺伝子群であった(図 7-A)。さらに *Bmp2* のプロモーター領域におけるヒストン修飾の解析を行ったところ、活性型修飾である H3K9-Ace,H3K4-me3 のいずれも FD(8-17)群で C 群の約 2 倍の顕著な上昇を認めた(図 7-B)。また、バイサルファイトシーケンス法による *Bmp2* のプロモーター領域の DNA メチル化解析では、FD(8-17)群と C 群に差は認められなかった(図 7-C)。

VI. 考察

本研究において、妊娠後半期に葉酸を欠乏させた群に胎仔体重・胎盤重量の減少が認められたことは、妊娠後半期の胎仔胎盤発育に葉酸が不可欠であることを証明しており、ヒトにおいても妊娠後半期の葉酸欠乏が子宮内胎児発育不全 (IUGR) を惹起する可能性を示唆している。このように妊娠期間中の母体葉酸摂取量を変化させた、特に妊娠後半期のみ葉酸欠乏による IUGR モデルは過去に報告はなく、今後の子宮内胎児発育不全の研究に有用な IUGR マウスモデルとなると考える。

“DOHaD 説”においては最初に与えられていた設定により予測されていた環境と実際に経

験した環境が異なった場合（環境のミスマッチ）に適応障害が生じると考えられている。今回の研究においても、妊娠全期間にわたり葉酸を欠乏させた群では胎仔体重・胎盤重量に減少を認めなかったのに対し、妊娠後半期に葉酸を欠乏させた群で胎仔胎盤発育が障害されたのは、妊娠前半期に与えられた餌により予測された環境と、妊娠後半期に実際に経験した環境に不一致（ミスマッチ）が生じたことによる適応障害が、表現型に現れたものと考えられる。

また、今回の研究においては妊娠後半期葉酸欠乏群の対照として、妊娠後半期タンパク制限群を設定した。この群では、妊娠後半期葉酸欠乏群と同様に胎仔重量の減少傾向を認めたものの、胎盤重量は逆に増大傾向にあり、結果として、胎仔胎盤比は妊娠後半期葉酸欠乏群で有意に大きく、妊娠後半期タンパク制限群では有意に小さいことがわかった。このことより、妊娠後半期葉酸欠乏群と妊娠後半期タンパク制限群の間においては、胎仔発育障害がおこるといふ結果だけみると共通しているが、そこに至るまでの経路が異なっていることが推察される。ヒトでは妊娠中低栄養の場合には、胎盤が大きくなることが知られており、これはより多くの栄養を取り込むための代償的な反応であると考えられている。この胎盤の大きさも将来の血圧と関連を有することが知られている。これも Barker による報告であるが、ヒトでは同じ体重の群で比較すると胎盤重量が大きいほうが血圧が高い傾向にある。出生体重が小さくて胎盤重量が大きいものが最も血圧が高くなる(14)。このことより考察すると、今回の妊娠後半期タンパク制限群マウスでの結果は、ヒトでの栄養制限モデルに似た結果であり、より栄養を取り込もうと胎盤重量が増えたものの栄養素自体が少ないために胎仔体重が制限されたのであり、妊娠後半期葉酸欠乏群マウスでの結果は、その機序とは違い、葉酸欠乏が胎盤発育そのものを阻害した結果、胎仔体重の減少がおこったのではないかと考えられる。

また、今回の研究では葉酸欠乏群には奇形の発症が認められた。妊娠全期間葉酸欠乏群では小頭症・小顎症・眼球欠損・皮膚脆弱を、妊娠後半期葉酸欠乏群では小頭症・小顎症を認めた。それぞれ 1 症例ずつであり、奇形発症頻度を述べるには至らないが、通常餌群では胎仔の奇形は認めなかったことより、葉酸が正常な胎仔の発生発達に必要なことは今回の研究によって再確認されたと考えられる。

妊娠後半期葉酸欠乏群のオス胎盤では *Igf2* の有意な増加と、*Igfbp1* の有意な減少を認めた。しかし、メス胎盤では *Igf2*, *Igfbp1* の発現量に有意な差は認めなかった。*Igf2* 遺伝子のノックアウトマウスでは胎仔体重、胎盤重量の減少を生じることが知られており、*Igf2* 遺伝子は胎児期の主要な成長因子である。胎盤は *Igf* の受容体を保有するだけでなく、*Igf2* や *Igfbp* も産生し、脱落膜は *Igfbp1* を産生することが報告されている(15)。絨毛は自身の *Igf2* 産生を介して旺盛な増殖を維持するが、脱落膜の *Igfbp1* は絨毛の栄養輸送だけでなく *Igf2* を介した絨毛の増殖や子宮への侵入を抑制的に制御していると考えられる(16)。つまり胎盤において *Igf2* が発育方向に働く遺伝子であるのとは逆に、*Igfbp1* は成長抑制方向に働く遺伝子であるとされる。表現型の結果とあわせて考察すると、メスでは葉酸欠乏により胎盤重量の減少がおこり、それによる子宮内胎児発育不全がおこりやすいところ、オス胎盤では *Igf2* の上昇と *Igfbp1* の減少という *Igf*-axis 制御によって胎盤重量の低下を防ぎ、子宮内胎児発育不全がおこることを回避している、またはその程度を軽くしている可能性が考えられた。

さらに、*Igf2* のプロモーター領域におけるヒストン修飾変化を、クロマチン免疫沈降法により解析したところ、妊娠後半期葉酸欠乏群のオス胎盤において、ヒストン活性型修飾の代表である H3K4-me3 が顕著な上昇を認め、また不活性型修飾の代表である H3K9-me3 は顕著な低下を認めた。つまり、オス胎盤における *Igf2* の発現上昇の背景には *Igf2* のプロモーター領域でのヒストン修飾の変化が関連していることが示された。このことより、母体葉酸欠乏により、胎盤においてヒストン修飾変化、つまりエピジェネティック変化が生じていることが示されたと考えられる。

母体葉酸欠乏によって、ヒトでもマウスでも無脳症や二分脊椎などの神経管閉鎖障害が起

こる割合が上昇するという事象や、妊娠後半期葉酸欠乏マウスでは、胎仔の神経前駆細胞が減少しており、脳細胞のアポトーシスが増加しているとの報告(17)などから、葉酸が胎仔の脳神経系の発育に特に重要であることがわかっているため、今回の研究ではさらに母体葉酸欠乏の胎仔脳への影響を調べた。コントロール群と妊娠後半期葉酸欠乏群について遺伝子発現量比較スクリーニングを行ったところ、胎仔脳において発現変化した遺伝子群はその数、程度ともに妊娠後半期葉酸欠乏群のオスよりもメスで大きな変化を示し、表現型の結果とあわせると、母体葉酸欠乏による胎仔への影響には性差があり、メスでより大きな変化がおこる、つまりオスよりもメスのほうが葉酸欠乏のストレス・影響を受けやすいことが示唆された。

ヒストン脱アセチル化酵素は、全身に分布する *Hdac1/2/3/8* (Class I) と、主に脳・心臓に分布するとされる *Hdac4/5/6/7/9/10* (Class II) が現在までに同定されている。それぞれ細胞内情報伝達や細胞周期の制御に関与することが知られており、近年がん治療の標的分子としても注目されている遺伝子群である。ヒストン脱アセチル化酵素のひとつである *Hdac7a* (Class II、主に脳に分布) が妊娠後半期葉酸欠乏群の胎仔脳でオス・メス共通して減少したことからは、胎仔脳においてヒストンアセチル化が促進し、葉酸欠乏というストレス下で代償的に遺伝子がより活性化している可能性が考えられ、妊娠後期における母体葉酸欠乏が特異的に胎仔脳においてヒストンアセチル化に変化を及ぼすことが示された。また *Folr1* がオス・メス共通して葉酸欠乏群での発現上昇を認めたことは胎仔脳において葉酸欠乏を感知し、葉酸受容体のアップレギュレーションがおこっていることが示された。さらに、*Folr1* のプロモーター領域のヒストン修飾変化の解析を行ったところ、活性型修飾である H3K9-Ace, H3K4-me3 のいずれもコントロール群以外の 3 群において顕著な上昇を認めた。つまり、母体葉酸欠乏による *Folr1* の発現上昇の背景には、*Folr1* のプロモーター領域のヒストン修飾変化があることが示唆された。

オスでは変化無く、メスでのみ妊娠後半期葉酸欠乏群で有意な上昇を認めた遺伝子群は、骨形成・発生に関わる *Bmp2*、摂食行動調節・過食症・肥満・耐糖能異常に関わる *Cckbr*、肥満・ステロイド代謝に関わる *Mc2r* など、生活習慣病関連遺伝子群であったことは興味深く、Barker 仮説 (成人病胎児期発症説) を裏付けるべく、妊娠後期母体葉酸欠乏は特にメスにおいて生活習慣病の発症基盤となる遺伝子群に発現変化をおこし、胎児プログラミングされている可能性が示唆された。*Cckbr* は、FD(8-17)群のみでなく、FD(0-17)群・PR(8-17)群においても C 群と比較して有意に上昇を認めており、妊娠中の葉酸欠乏と低タンパクという状況下に共通して、B 型ガストリン受容体の発現に変化を起こす可能性が示唆された。さらに *Bmp2* のプロモーター領域におけるヒストン修飾の解析を行ったところ、活性型修飾である H3K9-Ace, H3K4-me3 のいずれも妊娠後半期葉酸欠乏群で顕著な上昇を認め、また、*Bmp2* のプロモーター領域の DNA メチル化解析では、妊娠後半期葉酸欠乏群とコントロール群に差は認められなかったことより、妊娠後半期葉酸欠乏による *Bmp2* の遺伝子発現上昇に関しては、*Bmp2* のプロモーター領域において、DNA メチル化というより、ヒストン修飾により制御されている可能性が示唆された。*Bmp2* は、マウス胎仔脳におけるニューロン新生を調節しているといわれており (18)、今回葉酸欠乏というストレスを与えたマウス胎仔脳で *Bmp2* の顕著な発現変化がおこったことは興味深い。また、妊娠後半期の胎仔脳において *Hdac* が *Bmp2* の転写制御を行っており、それは神経節の発生と皮質のニューロン新生を調節しているという報告がある (19)。今回の結果はさらに、葉酸が妊娠後半期の *Hdac* と *Bmp2* の発現を制御し、胎仔脳のニューロン新生を調節している可能性を示唆するものであると考える。

現在のところ、葉酸欠乏による胎児発育制限はヒトでは報告されていないが、葉酸代謝経路はヒトとマウスで共通していると考えられるため、神経系発達のみならず、胎児胎盤発育の面からも今回の葉酸欠乏マウスでの結果はヒトにも起こる可能性があると考えられる。また、本研究で明らかとなった葉酸欠乏によるエピジェネティック変化を起こした遺伝子群は、マウスとヒトに共通する遺伝子群であり、ヒトでも同様のエピジェネティック変化を

起こすと考えられる。

以上より、妊娠中の葉酸摂取は胎児器官形成期である前半期に必要であるのみならず、妊娠後半期においても正常な胎児発育に重要であると考えられる。

VII. 結論

妊娠後半期母体葉酸欠乏は子宮内胎児発育不全を惹起し、またそれだけにとどまらずエピジェネティック変化を引き起こし、児に生涯にわたる影響を及ぼす可能性が示された。また、母体葉酸欠乏による胎児への影響には性差があり、メスでより大きな変化がおこる、つまりオスよりもメスのほうが葉酸欠乏のストレス・影響を受けやすいことが示唆された。これらのことは、妊娠中の葉酸摂取の重要性を新たに裏付けるものであり、子宮内胎児発育不全と生活習慣病におけるエピジェネティックな視点からの新しい予防・治療法の開発の一助となるものであると考える。

VIII. 参考文献

1. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976;295:349-353
2. Barker DJP, Osmond C, Winter PD, et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989; 2: 577-580
3. Breier BH, Vickers MH, Ikenasio BA, et al. Fetal programming of appetite and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185: 73-79
4. Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (London)* 1994; 86: 217-222
5. Nishina H, Green LR, McGarrigle HH, et al. Effect of nutritional restriction in early pregnancy on isolated femoral artery function in mid-gestation fetal sheep. *J Physiol* 2003; 553: 637-647
6. Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, et al. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyl-transferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br J Nutr* 2007; 97: 1064-1073
7. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003; 23 : 5293-5300
8. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004; 7: 847-854
9. Lillycrop KA, Phillips ES, Lacson AA, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005; 135: 1382-1386
10. Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 598S-603S
11. Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, et al. Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nat Genet* 1999; 23: 228-232
12. Heid MK, Bills ND, Hinrichs SH, et al. Folate deficiency alone does not produce neural tube defects in mice. *J Nutr* 1992; 122: 888-894
13. Burgoon JM, Selhub J, Nadeau M, et al. Investigation of the establishment of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology* 2002; 65: 219-227
14. Barker D, et al. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990; 301: 259-262
15. Clemmons DR, Thraikill KM, Handwerger S, et al. Three distinct forms of

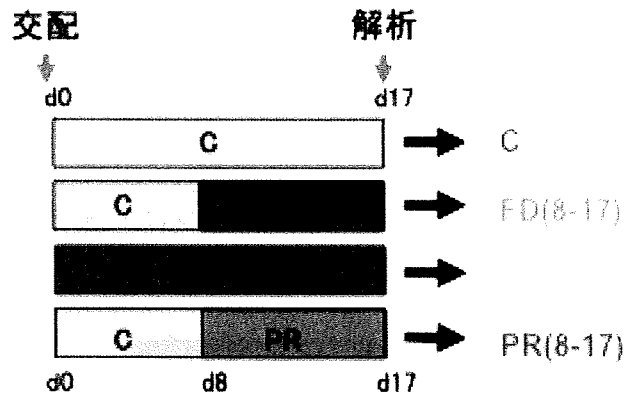
- insulin-like growth factor binding proteins are released by decidual cells in culture. *Endocrinology* 1990; 127: 643-650
16. Irwin JC, Giudice LC. Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast alpha5beta1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8 : 21-31
 17. Craciunescu C, Brown E, Mar M, et al. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr* 2004; 134: 162-166
 18. Kinichi Nakashima, Takumi Takizawa, Wataru Ochiai, et al. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrogenesis. *Neurobiology PNAS*, 2001; 98: 5868-5873
 19. Shaked M, Weissmuller K, Svoboda H, et al. Histone Deacetylases Control Neurogenesis in Embryonic Brain by Inhibition of BMP2/4 Signaling. *PLoS One*. 2008; 16,e2668
 20. Horne DW, Cook RJ, Wagner C. Effect of Dietary Methyl Group Deficiency on Folate Metabolism in Rats. *J Nutr*.1989; 119, 618-621
 21. Maloney CA, Hay SM, Rees WD. Folate deficiency during pregnancy impacts on methyl metabolism without affecting global DNA methylation in the rat fetus. *Br J Nutr*. 2007; 97,1090-1098
 22. Choi SW, Friso S, Keyes MK, et al. Folate supplementation increases genomic DNA methylation in the liver of elder rats. *Br J Nutr*. 2005; 93,31-35
 23. Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, et al. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72,998-1003
 24. Kotsopoulos J, Sohn KJ, Kim YI. Postweaning Dietary Folate Deficiency Provided through Childhood to Puberty Permanently Increases Genomic DNA Methylation in Adult Rat Liver. *J Nutr*.2008; 138: 703-709
 25. Kim YI, Christman JK, Fleet JC, et al. Moderate folate deficiency does not cause global hypomethylation of hepatic and colonic DNA or c-myc-specific hypomethylation of colonic DNA in Rats. *Am J Clin Nutr* 1995,61,1083-1090

IX. 謝辞

本研究にあたりご指導・ご高閲を賜りました、東北大学大学院医学系研究科
医科学専攻婦人科学分野 八重樫伸生教授、岡村州博名誉教授に、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導を賜りました、木村芳孝先生、千坂泰先生、
伊藤拓哉先生、Jafar Sharif 先生に心より感謝致します。

本研究中、様々なご支援をいただきました東北大学産科婦人科学教室の先生方に心より感謝致します。



- C : 妊娠全期間、通常餌を与えた群
- FD(8-17) : 妊娠後半期(8-17日目)に葉酸欠乏餌を与えた群
- (blank) : 妊娠全期間(0-17日目)葉酸欠乏餌を与えた群
- PR(8-17) : 妊娠後半期(8-17日目)にタンパク(カゼイン)制限餌を与えた群

図1 葉酸欠乏マウスモデルの作製

マウスをd0にPR(8-17)、FD(8-17)、FD(0-17)及びPR(8-17)にそれぞれ飼育し、妊娠17日目に胎仔・胎盤を採出した。

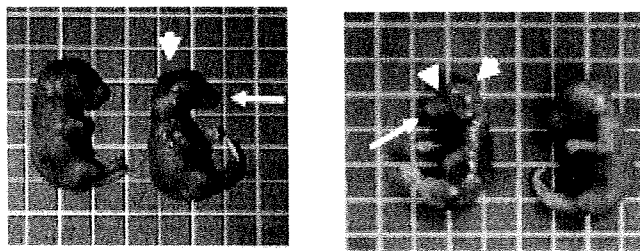


図2 葉酸欠乏群にみられた奇形

図2-1は、胎児の頭部が小さく、耳が欠損している。
 図2-2は、胎児の頭部が小さく、耳が欠損している。
 図2-3は、胎児の頭部が小さく、耳が欠損している。

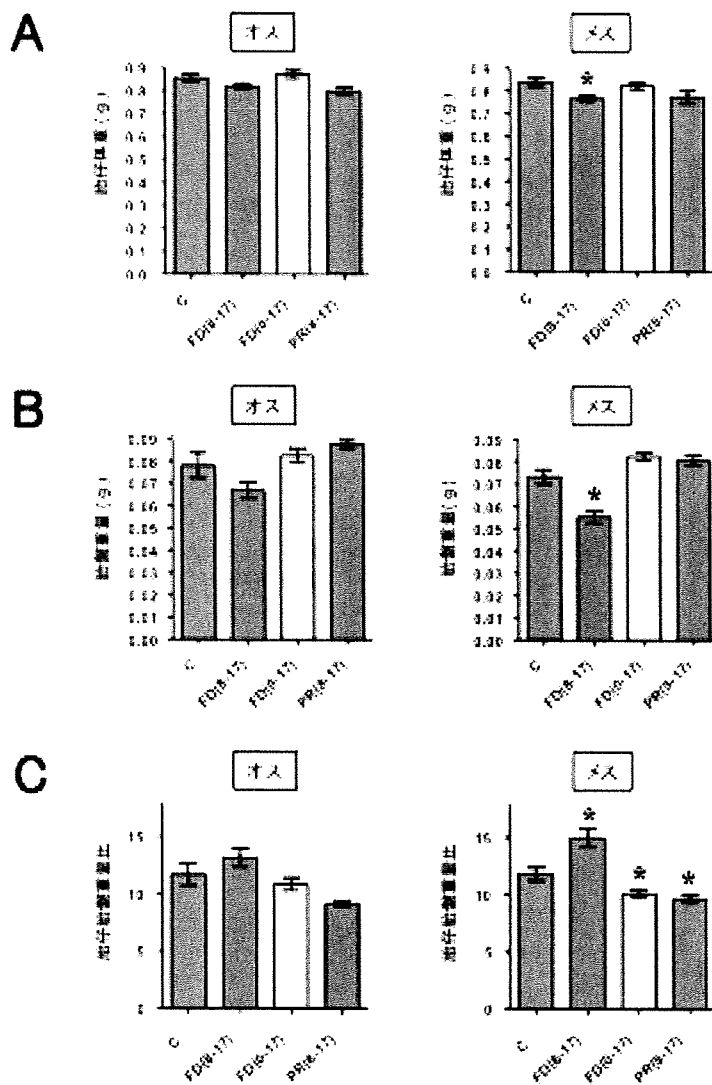


図3 胎仔体重・胎盤重量・胎仔胎盤重量比の比較解析

○オス、△メス、□胎仔胎盤重量比。胎仔胎盤重量比は胎仔体重を胎盤重量で割った値である。胎仔胎盤重量比は胎仔体重と胎盤重量の両方に影響を受ける。胎仔胎盤重量比は胎仔体重と胎盤重量の両方に影響を受ける。胎仔胎盤重量比は胎仔体重と胎盤重量の両方に影響を受ける。

Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$, Dunn's multiple comparison test, * $p < 0.05$

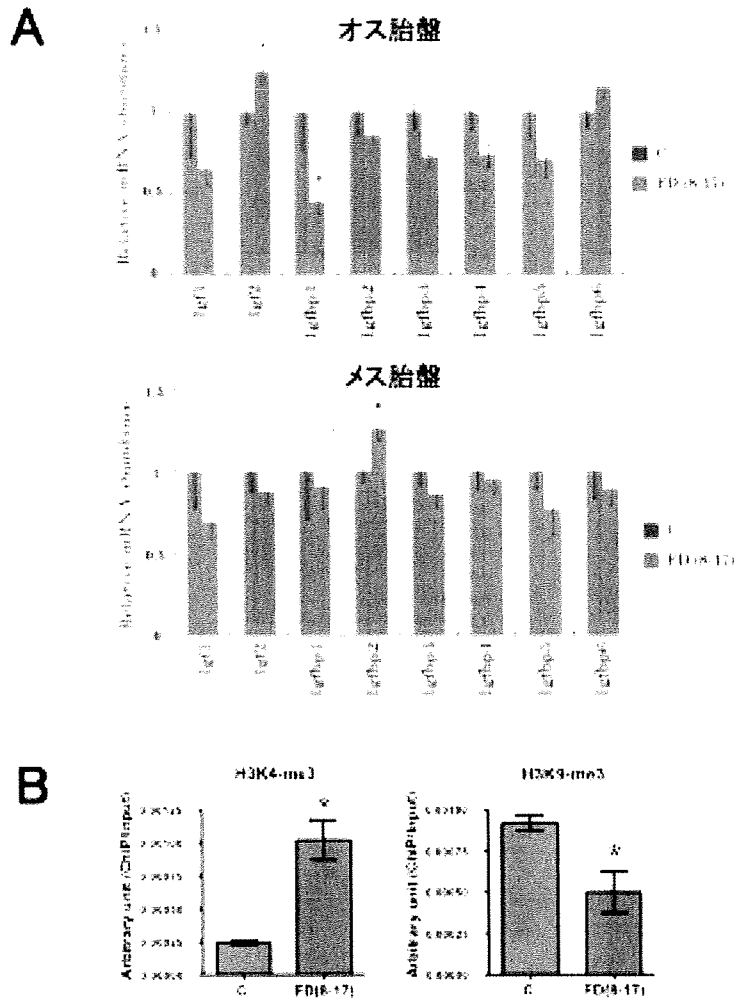


図4 胎盤における遺伝子発現変化とエピジェネティック変化解析

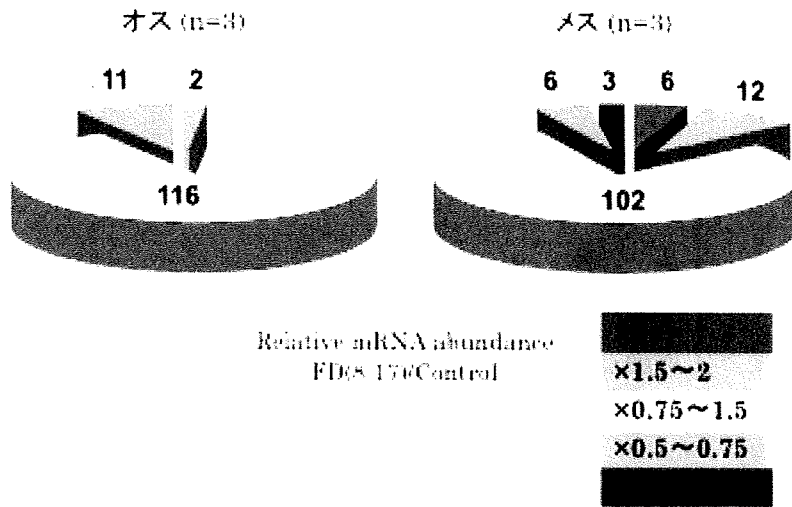
A: オス・メスの胎盤におけるIg lociの遺伝子発現変化

オス・メスの胎盤におけるIg lociのFD(8-17)由来の調節因子発現変化の有無を調べる。FD(8-17)由来の調節因子発現変化の有無を調べる。オス胎盤では、IgT, IgT2, IgDp2, IgDp3, IgDp1, IgDp5, IgDp6の遺伝子発現が有意に変化した。メス胎盤では、IgT, IgT2, IgDp1, IgDp2, IgDp3, IgDp1, IgDp3, IgDp6の遺伝子発現が有意に変化した。

B: オス胎盤におけるIg lociのヒストン修飾変化

オス胎盤におけるIg lociのH3K4-me3とH3K9-me3の発現変化を調べる。H3K4-me3の発現は有意に増加し、H3K9-me3の発現は有意に減少した。FD(8-17)由来の調節因子発現変化の有無を調べる。オス胎盤では、H3K4-me3の発現が有意に増加し、H3K9-me3の発現が有意に減少した。

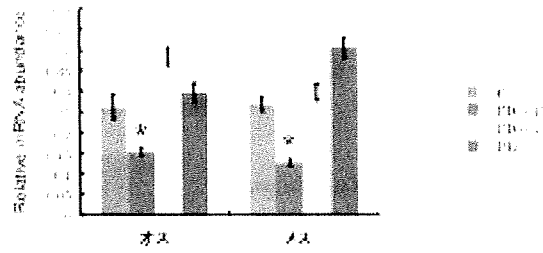
Mann-Whitney test: * p<0.05



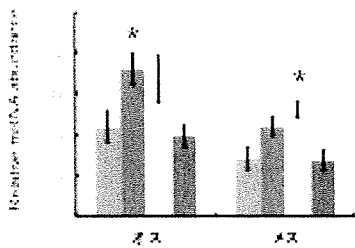
- 脳神経系関連遺伝子 (*Hdac7a, Gfra, Apoa1* etc.) 96
 - 発生発達関連遺伝子 (*Igf-axis, Acox1, Ppara* etc.) 11
 - 葉酸関連遺伝子 (*Folr1/2/4, Slc19a1/2/3* etc.) 14
 - インプリンティング遺伝子 (*Dlk1, Mash2* etc.) 8
- 計 129個

図5 胎仔脳における129遺伝子の発現変化のスクリーニング結果
 胎仔脳（オス）を個体ごと（3個）に分析してスクリーニング結果を判別し、発現変化を解析した
 結果は、オスに11遺伝子、発現変化を判別した遺伝子の数は多く、メスの発現変化は少ない。

A



B



C

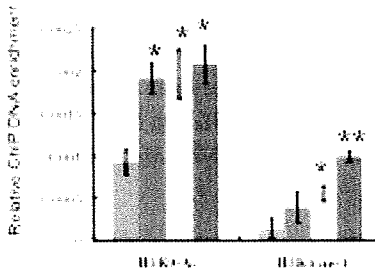


図6 胎仔脳における遺伝子発現変化とエピジェネティック変化解析

A: *Hmox1*の遺伝子発現変化

オスとメスの胎仔脳における遺伝子発現解析。Hmox1の発現はオスよりもメス胎仔脳において有意に減少していることが観察された。

B: *Pfkfb3*の遺伝子発現変化

オスとメスの胎仔脳における遺伝子発現解析。Pfkfb3の発現はオスよりもメス胎仔脳において有意に増加していることが観察された。

C: オス胎仔脳における*Hmox1*のヒストン修飾変化

胎仔脳におけるヒストン修飾解析。Hmox1の発現はオス胎仔脳において有意に減少していることが観察された。これはHmox1の発現を抑制するヒストン修飾の変化によるものである。

Kruskal-Wallis test, post hoc, Dunn's multiple comparison test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

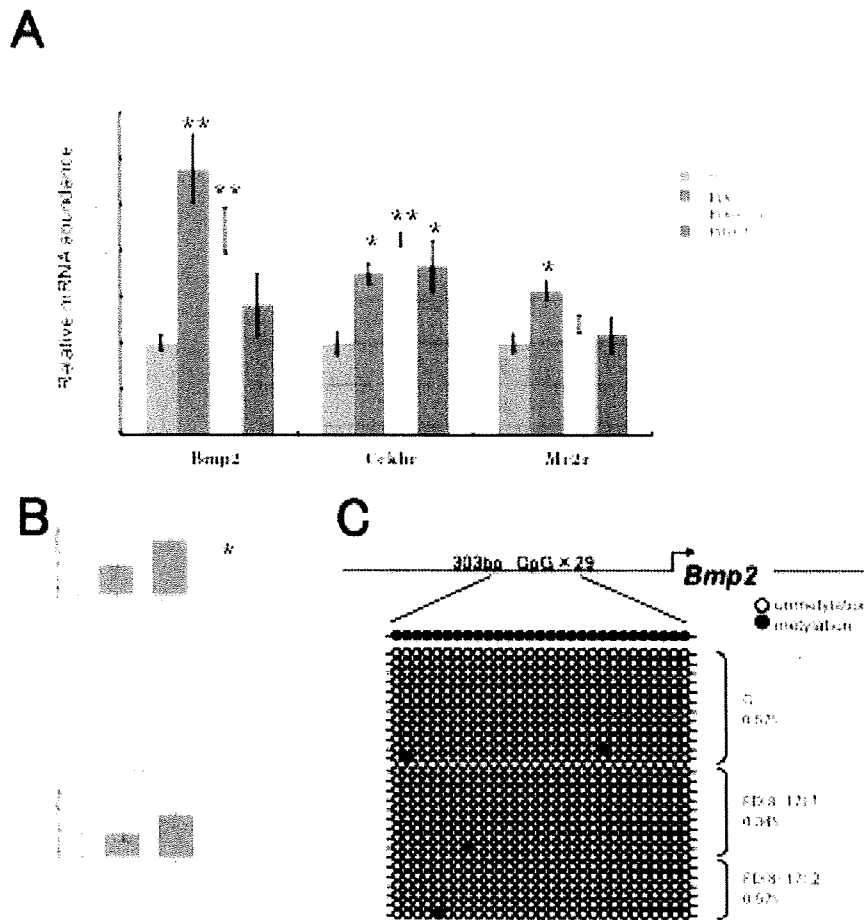


図7. メス胎仔脳で起きた遺伝子発現変化とエピジェネティック変化

A: リアルタイムRT-PCR法によるメス胎仔脳に特異的な遺伝子発現変化

Bmp2, Uts1hr, Mir2rの発現はF1x, F2x, F3xの世代間で有意な変化を示した。

メス胎仔脳に特異的な遺伝子発現変化は、胎児期脳発達時に「タコノコ」遺伝子

Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$; Dunn's multiple comparison test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

B: ChIP1クローニング/免疫沈降法によるBMP2プロモーター領域におけるヒストン3修飾解析

メス胎仔脳で特異的にメチル化されたCpGアイランドはBMP2の発現に阻害的である。

ヒストン3 H3K9me3のレベルはMann-Whitney test, * $p < 0.05$

C: バイサルアイトシーケンス法によるCpGメチル化解析

Bmp2プロモーター領域のCpGアイランドはF1xとF2x世代間で有意な変化を示した。

成分	0餌	10餌	19餌
カゼイン(g/kg)	200	200	100
L-シスチン(g/kg)	3	3	3
葉酸(mg/kg)	2	0	2
ビタミンB6(mg/kg)	7	7	7
ビタミンB12(mg/kg)	25	25	25
コーンスターチ(g/kg)	397	397	472
シュクロース(g/kg)	100	102	100
重酒石酸コリン(g/kg)	2.5	2.5	2.5
ミネラル混合(g/kg)	35	35	35
セルロース(g/kg)	50	50	50
大豆油(g/kg)	70	70	70
ビタミンA(mg/kg)	8	8	8
ビタミンD3(mg/kg)	2.5	2.5	2.5
ビタミンE(mg/kg)	150	150	150
ビタミンB1(mg/kg)	6	6	6
ビタミンB2(mg/kg)	6	6	6
ビタミンK1(mg/kg)	0.75	0.75	0.75
ビオチン(mg/kg)	0.2	0.2	0.2
ハントニン酸カルシウム (mg/kg)	16	16	16
ニコチン酸(mg/kg)	30	30	30
摂取エネルギー(kcal/kg)	377	377	353

表1 餌の成分表

	母体数	胎仔数(オス:メス)
C	5	40 (16 : 24)
FD(8-17)	5	45 (23 : 22)
FD(0-17)	5	35 (17 : 18)
PR(8-17)	5	33 (14 : 19)

表2 実験に用いたマウス母体・胎仔数