

エピゲノム異常を介した胎生期の コリン・タンパク質摂取不足による生活習慣病発症機構

山梨大学大学院総合研究部生命環境学域・教授 望月 和樹

■ 緒 言

「発達期の環境の変化に対応した不可逆的な反応が生じると、発達完了期の環境とマッチすれば健康に生活できるし、マッチしなければ様々な疾患の源となる」という Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 学説が提唱されている。これまでに DOHaD 学説を元にした疫学研究では、第2次世界大戦中オランダの冬の飢餓時の出生世代は前後の世代と比較して50歳時の冠動脈性心疾患や肥満が増加したというが報告されている¹⁾。発育期に栄養状態が悪いことによって、身長が伸びないことが発展途上国では問題になっており、先進国では、妊娠中においても偏ったダイエットを実施する女性が増えており、出生児の生活習慣病の発症リスクの増大が危惧されている。

しかし、胎生期の低栄養による生活習慣病発症機構はいまだ不明な点が多い。これまでにげっ歯類を用いて、妊娠期の栄養素の不足による出生仔獣の生活習慣病の発症リスクに関する研究が行われている。30%～50%のエネルギー制限を妊娠期の母獣に行うと、出生体重が低下した結果や、仔獣の高血圧、膵β細胞の数、耐糖能低下が誘導された結果が報告されている²⁾。タンパク質制限モデルでは母獣の食餌への制限が仔獣に高血圧や耐糖能異常を誘導することが報告されている³⁾。微量栄養素では、核酸代謝に必要なビタミンである葉酸、ビタミンB12、ビタミンB6が妊娠期において重要であると考えられており、その中でも、葉酸は、妊娠期の摂取不足が胎児の神経管閉塞障害を引き起こすことが知られている⁴⁾。ラットにおいても妊娠期の葉酸不足は、仔獣の耐糖能異常を誘導することが報告されている⁵⁾。妊娠期の母獣のビタミンB12の不足に関しては、仔獣のホモシステイン濃度が増大することが報告されている⁶⁾。

このような核酸合成やメチオニン代謝に関与する栄養素にタンパク質とともに摂取されることが多い微量栄養素の一つにコリンがある。コリンは四級アンモニウムカチオンのトリメチルアミノエタノールで、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン等のリン脂質の親水基である。コリンリン脂質は細胞膜の構成成分であり、特にコレステロールやトリアシルグリセロール、リン脂質を全身へ供給するアポタンパク質の構成物質として脂質栄養の基本物質である。コリンから合成されるベタインは、エピゲノム修飾の一つであるDNAのメチル化に関与するメチオニンが代謝されて生成されるホモシステインをメチオニンに再合成するために必要な物質である (Fig.1)。げっ歯類では、コリン合成酵素が欠損しているため、コリンの欠乏が脂肪肝を誘導することが報告されている⁷⁾。げっ歯類におけるコリン欠乏による脂肪肝形成機構はいまだ明確ではないが、肝臓におけるVLDL形成不足や、ホモシステイン増加に伴う酸化障害がミトコンドリアのβ酸化機能を低下させる可能性が考えられている。しかし、妊娠期のコリン不足が出生仔獣の脂肪肝などの代謝異常を誘導するかはいまだ明らかではない。

本研究では、妊娠したICRマウスを用いて出産まで、タンパク質とコリンを制限した食餌を与え、妊娠期コリン不足の仔獣の耐糖能異常および代謝異常への関連を検証した。さらに、コリンを多く含む卵黄粉をタンパク質-コリン制限食に添加し、妊娠マウスに摂取させることによって、出生仔獣の代謝改善効果を検証した。

■ 方 法

妊娠1日目のICRマウス20匹を、AIN-93G基準食(以下、タンパク質のエネルギー比率16%)、タンパク質制限食、タンパク質制限+軽度コリン制限食、タンパク質制限+重度コリン制限食、タンパク質制限+軽度コリン制限+卵黄粉食をそれぞれ粉食で調整し、それぞれの群に分け、飼育した。タンパク質制限食においてはタンパク質のエネルギー比を8%にし、タンパク質制限+軽度コリン制限食はコリンを基準食の2分の1、タンパク質制限+重度コリン制限食はコリンを基準食の4分の1、タンパク質制限+軽度コリン制限+卵黄粉食はタンパク質制限食と同じ組成になるよう、卵黄粉(3.41g/100g diet)で調整した。妊娠17日目からは、すべての群で固形食のAIN-93G基準食を自由摂食とし、出生後21日齢まで母獣と飼育した。出生後28日から高脂肪・高ショ糖食を投与した。24(メス)、198～200日齢(オス)で解剖を行った。肝臓組織を採取し、肝臓から総RNA抽出は

グアニジンチオシアネート法に従い抽出し、qRT-PCRによって標的遺伝子の mRNA 発現量を測定した。目的とする遺伝子の mRNA 発現量と対応する内部標準である *Actb* (Actin, beta) もしくは *Hprt* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) 発現量値の比を計算し、発現量の相対値を求めた。血漿中および肝臓における組織 1g 当たりの中性脂肪量を測定した。実験データは平均値±標準誤差で表した。2 群間比較の場合は Student *t*-test を行い、3 群間比較は一元配置分散分析(下位検定は Tukey-Kramer 検定)を行った(エクセル統計 2010)。 $P<0.05$ の場合を統計学的に有意な差と判断した。本研究は山梨大学動物実験規定および山梨大学動物実験指針に従い山梨大学実験倫理委員会の承認の上で測り行われた。

■ 結 果

24 日齢のメスの仔獣において、タンパク質制限食群における体重、腸間膜脂肪重量が対照食群と比較して有意に低かった。タンパク質・軽度コリン制限食群における体重、肝臓重量、腸間膜脂肪重量が対照群と比較して有意に低く、血漿中トリグリセライド濃度がタンパク質制限食群と比較して有意に低かった。タンパク質・重度コリン制限群で体重がタンパク質・軽度コリン制限食群と比較して有意に高かった(Table 1)。198 日齢-200 日齢のオスの仔獣において、タンパク質制限食群における体重、腸間膜脂肪重量が対照群と比較して有意に低かった。タンパク質・重度コリン制限食群における体重、肝臓重量、腸間膜脂肪重量がタンパク質制限食群と比較して有意に高かった。タンパク質・軽度コリン制限卵黄粉添加食群における副睪丸脂肪重量がタンパク質・軽度コリン制限食群と比較して有意に低かった(Table 2)。

仔獣の肝臓における脂肪酸合成関連遺伝子(*Acaca*、*Acacb*、*Fasn*、*Scd1*、*Dgat1*、*Fabp4*、*Gpd1*、*Cidec*、*Pparg2*)および、脂肪酸酸化関連遺伝子(*Acox1*、*Cd36*)の発現量を qRT-PCR 法を用いて検討した。24 日齢においてタンパク質・軽度コリン制限食群における *Acaca*、*Acacb*、*Fasn*、*Pparg2*、*Scd1* の mRNA 発現量は対照群と比較して有意に高かった。タンパク質・軽度コリン制限食卵黄粉添加群における *Acaca*、*Acacb*、*Fasn*、*Scd1* の mRNA 発現量はタンパク質・軽度コリン制限食群と比較して有意に低かった。198-200 日齢において、タンパク質・軽度コリン制限食群における *Cidec*、*Acox1* の mRNA 発現量はタンパク質制限食群と比較して有意に高かった。タンパク質・重度コリン制限食群における *Fabp4*、*Cidec*、*Pparg2*、*Scd1*、*Cd36*、*Acox1* の mRNA 発現量はタンパク質制限食群と比較して有意に高かった(Fig.2)。

■ 考 察

本研究では、母獣のタンパク質制限に加え、コリンを制限すると、仔獣の肝臓や内臓脂肪等の脂肪を蓄積する臓器重量や肝臓中の中性脂肪量が増大することが明らかとなった。その肝臓や内臓脂肪中への脂肪蓄積のメカニズムを調べるために、肝臓における糖・脂質代謝に関連する遺伝子の mRNA 発現量を測定した。その結果、タンパク質制限の上にコリンを 2 分の 1 低下させた食餌では、24 日齢のメスおよび 198-200 日齢のオスともに脂肪酸合成・蓄積や分解遺伝子(*Scd1*、*Cidec*、*Pparg2*、*Cd36* など)の mRNA 発現量が AIN93G 食群と比較して増大した。一方、卵黄粉を投与する 24 日齢のメスおよび 198 日齢のオス共に、これらの遺伝子の発現が低下することが明らかとなった。これらから、母獣がタンパク質制限にコリン制限が加わることにより、仔獣において脂肪合成や蓄積経路が促進され肝臓や内臓脂肪に脂肪の蓄積の増加が起きるが、卵黄粉を添加すると、コリンが提供されることなどにより脂肪合成遺伝子の発現が低下し、脂肪肝や内臓脂肪の肥満のリスクが低下すると考えられた。

今後、胎生期のコリン不足が肝臓の脂質代謝関連遺伝子周辺のエピゲノム修飾を変動させるかを調べる必要がある。

■ 要 約

タンパク質ならびにエピゲノム修飾に関与する栄養素であるコリンの妊娠期の母獣における不足は、仔獣における肝臓の脂質代謝を攪乱し、生活習慣病の発症リスクを増大させる可能性が示唆された。さらに、卵黄をタンパク質とコリンが不足した食餌に添加し母獣に摂取させると、仔獣の生活習慣病の発症リスクが低下する可能性が示唆された。

■ 文 献

1. Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E., and Lumey, L. H. (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17046–17049.
2. Muramatsu-Kato, K., Itoh, H., Kohmura-Kobayashi, Y., Ferdous, U. J., Tamura, N., Yaguchi, C., Uchida, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Suganami, T., Ogawa, Y., and Kanayama, N. (2015) Undernourishment in utero Primes Hepatic Steatosis in Adult Mice Offspring on an Obesogenic Diet ; Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress, *Scientific reports* 5, 16867.
3. Nishina, H., Green, L. R., McGarrigle, H. H., Noakes, D. E., Poston, L., and Hanson, M. A. (2003) Effect of nutritional restriction in early pregnancy on isolated femoral artery function in mid-gestation fetal sheep, *The Journal of physiology* 553, 637–647.
4. (1992) Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects, *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* 41, 1–7.
5. Maloney, C. A., Hay, S. M., and Rees, W. D. (2009) The effects of feeding rats diets deficient in folic acid and related methyl donors on the blood pressure and glucose tolerance of the offspring, *The British journal of nutrition* 101, 1333–1340.
6. da Silva, V. C., Fernandes, L., Haseyama, E. J., Agamme, A. L., Guerra Shinohara, E. M., Muniz, M. T., and D'Almeida, V. (2014) Effect of vitamin B deprivation during pregnancy and lactation on homocysteine metabolism and related metabolites in brain and plasma of mice offspring, *PloS ONE* 9, e92683.
7. Nakamura, M., Suetsugu, A., Hasegawa, K., Matsumoto, T., Aoki, H., Kunisada, T., Shimizu, M., Saji, S., Moriwaki, H., and Hoffman, R. M. (2017) Choline-Deficient-Diet-Induced Fatty Liver Is a Metastasis-Resistant Microenvironment, *Anticancer research* 37, 3429–3434.

Table1. Basic characteristics of female mice at 24 days after birth

	AIN-93G		Low protein (LP)						LP+Egg powder
			Choline		1/2		1/4		1/2
	10	8	1	7	6	7			
Number									
Body weight(g)	21.4 ± 0.38	19.5 ± 0.35 ab*	18.4 ± 0.77 a##	21.1 ± 0.63 b	19.2 ± 0.83				
Liver weight(g)	1.09 ± 0.04	1.03 ± 0.03	0.97 ± 0.04 ##	1.07 ± 0.04	1.01 ± 0.04				
Liver weight/body weight(g/10g)	0.51 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.51 ± 0.01	0.53 ± 0.02				
Mesenteric fat weight(g)	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.005 **	0.08 ± 0.01 #	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01				
Mesenteric fat weight(g)/body (g/10g)	0.05 ± 0.003	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00				
Serum triglyceride(mg/dL)	161 ± 16.3	206 ± 16.9 a	126 ± 18.0 b	178 ± 25.1 at	184 ± 16.7 \$				
Liver triglyceride(mg/g tissue)	13.4 ± 1.54	14.7 ± 1.30	16.4 ± 2.20	14.3 ± 1.46	11.6 ± 0.82				

a-c : Values not sharing common superscripts are significantly different from each other at $P < 0.05$ (Tukey's test). Student's *t*-test : AIN-93G vs LP : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; AIN-93G vs LP+Choline1/2 : # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; LP+Choline1/2 vs LP+Choline1/2+Egg powder : \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$

Abbreviations : AIN-93G, group fed a AIN93G diet ; LP, group fed a protein restricted diet (8%E protein).

Table 2. Basic characteristics of Male mice at 198-200 days after birth

	AIN-93G	Low protein (LP)			LP+Egg powder	
		Choline			1/2	
		1	1/2	1/4	1/2	
Number	10	13	16	15	13	
Body weight(g)	87.0 ± 4.17	72.2 ± 2.94 a**	84.1 ± 4.62 ab	93.3 ± 3.40 b	85.1 ± 1.85	
Liver weight(g)	5.39 ± 0.61	4.34 ± 0.36 a	6.18 ± 0.69 ab	6.69 ± 0.46 b	6.24 ± 0.480	
Liver weight/body weight(10g)	0.608 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.71 ± 0.06	0.71 ± 0.03	0.73 ± 0.046	
Mesenteric fat weight(g)	2.04 ± 0.22	1.45 ± 0.13 a*	2.00 ± 0.25 ab	2.24 ± 0.14 b	2.01 ± 0.089	
Mesenteric fat weight/body weight(g/10g)	0.230 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.009	
Epididymal fat weight(g)	3.62 ± 0.39	3.17 ± 0.24	4.03 ± 0.65	3.75 ± 0.29	2.61 ± 0.216	
Epididymal fat weight/body weight(g/10g)	0.422 ± 0.05	0.44 ± 0.04	0.47 ± 0.06	0.42 ± 0.04	0.31 ± 0.027 ^s	
Gastrocnemius muscle weight(g)	0.403 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.012	
Gastrocnemius muscle weight/body weight(g/10g)	0.05 ± 0.003	0.05 ± 0.003 a	0.05 ± 0.003 b	0.04 ± 0.002 b	0.04 ± 0.002	
Soleus muscle weight(g)	0.05 ± 0.003	0.05 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.05 ± 0.002	
Blood glucose(mg/dL)	204 ± 17.2	192 ± 9.09	207 ± 11.0	218 ± 10.2	201 ± 12.9	
Serum triglyceride(mg/dL)	154 ± 16.7	190 ± 25.6	216 ± 58.6	146 ± 21.6	130 ± 15.8	
Liver triglyceride(mg/g tissue)	138 ± 23.0	169 ± 20.6	207 ± 19.4 [#]	225 ± 17.4	190 ± 15.4	

a-c : Values not sharing common superscripts are significantly different from each other at $P<0.05$ (Tukey's test). Student's t -test : AIN-93G vs LP : * $P<0.05$, ** $P<0.01$; AIN-93G vs LP+Choline1/2 : # $P<0.05$, ## $P<0.01$; LP+Choline1/2 vs LP+Choline1/2+Egg powder : \$ $P<0.05$, \$\$ $P<0.01$
Abbreviations : AIN-93G, group fed a AIN93G diet ; LP, group fed a protein restricted diet (8%E protein) .

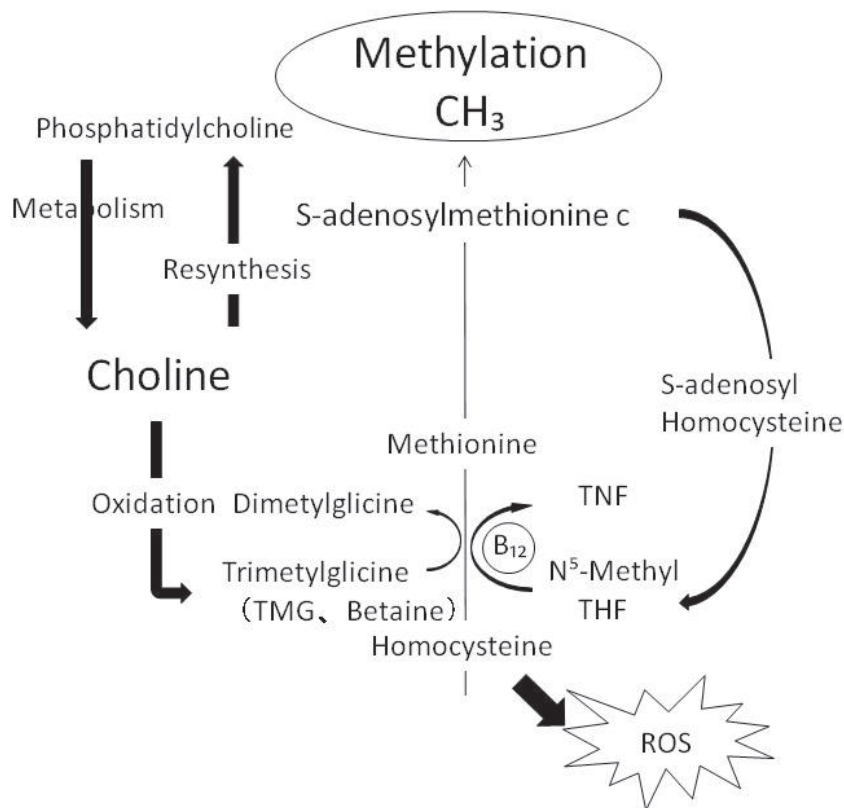


Fig.1 Choline's metabolic pathway

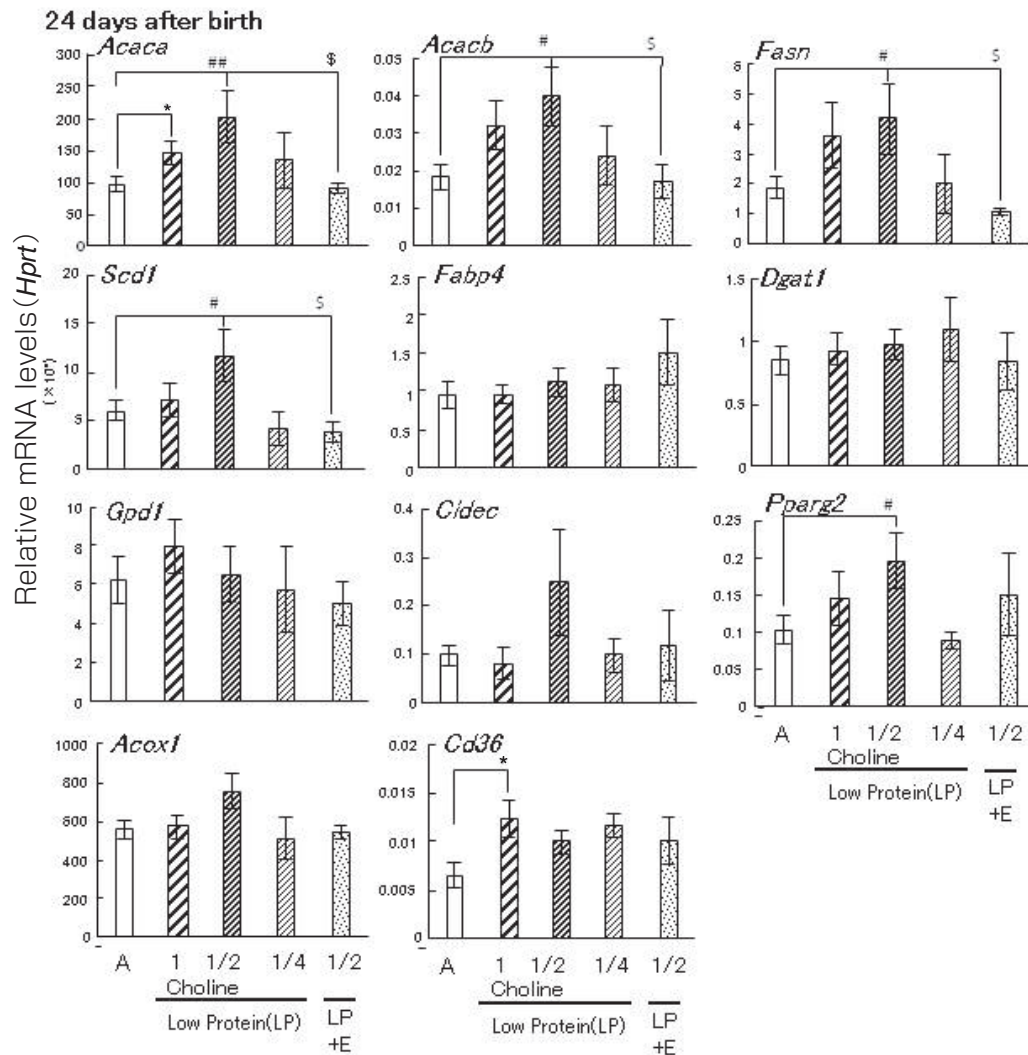


Fig. 2. Effects of feeding mother mice restriction diets on mRNA expression levels of genes related to lipogenesis in the liver of female mice (24day after birth).

a-c : Values not sharing common superscripts are significantly different from each other at $P < 0.05$ (Tukey's test). Student's *t*-test : AIN-93G vs LP : * $P < 0.05$; AIN-93G vs LP+Choline1/2 : # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; LP+Choline1/2 vs LP+Choline1/2+Egg powder : \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$

Abbreviations : A, group fed a AIN93G diet ; LP, group fed a protein restricted diet (8%E protein) ; E, egg

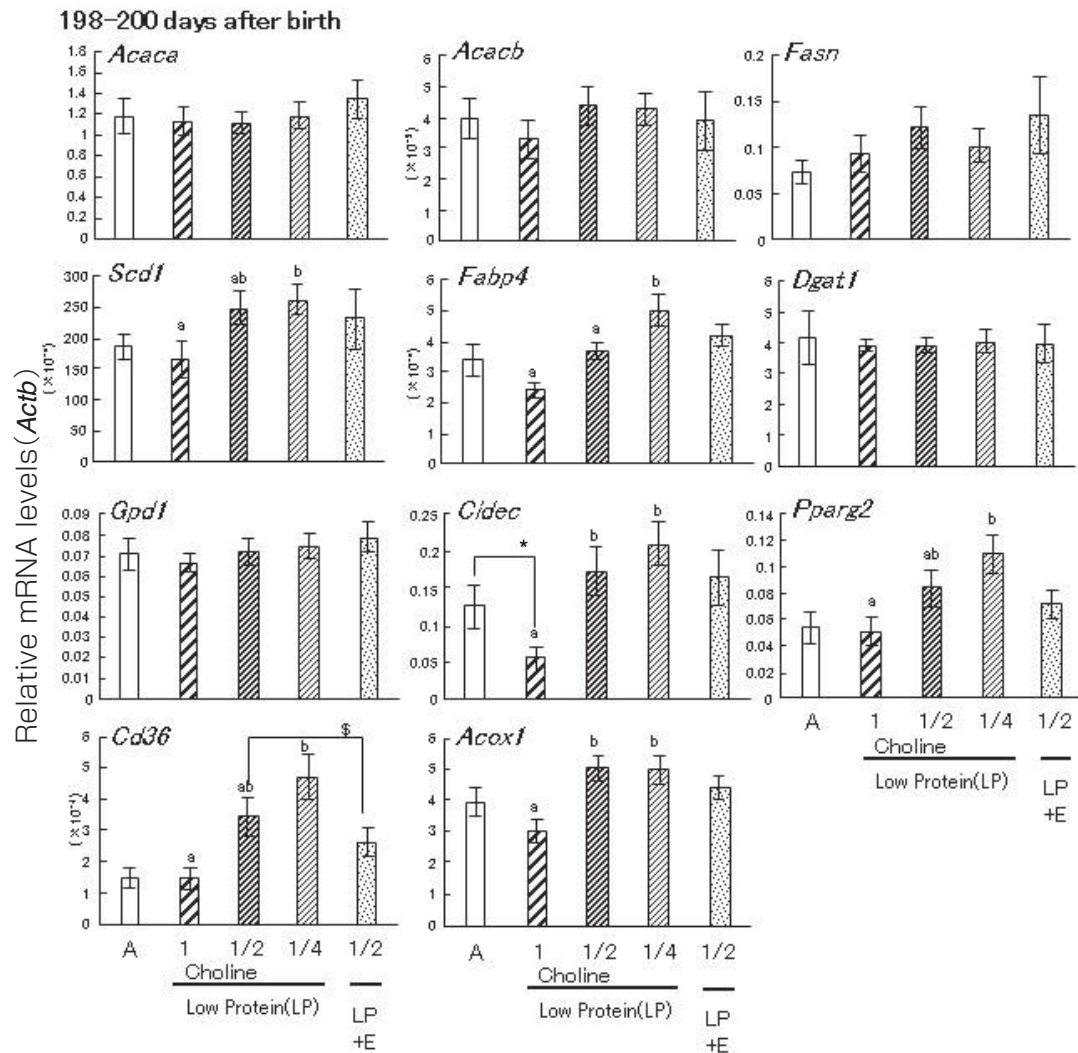


Fig. 3. Effects of feeding mother mice restriction diets on mRNA expression levels of genes related to lipogenesis in the liver of male mice (198–200 day after birth).

a-c : Values not sharing common superscripts are significantly different from each other at $P < 0.05$ (Tukey's test). Student's *t*-test : AIN-93G vs LP : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; AIN-93G vs LP+Choline1/2 : # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; LP+Choline1/2 vs LP+Choline1/2+Egg powder : \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$

Abbreviations : A, group fed a AIN93G diet ; LP, group fed a protein restricted diet (8%E protein) ; E, egg