



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Effects of Maternal Undernutrition on DNA Methylation, Gene Expression, and Metabolites of Fetal Thymus and Growth in Wagyu (Japanese Black) Cattle [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	PHOMVISITH, Ouanh
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第16187号
Issue Date	2024-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94076
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	PHOMVISITH_Ouanh_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 PHOMVISITH Ouanh

審査委員 主査 教授 後藤 貴文

副査 教授 星野 洋一郎

副査 准教授 鈴木 裕

副査 教授 室谷 進 (鹿児島大学 共同獣医学部)

学 位 論 文 題 名

Effects of Maternal Undernutrition on DNA Methylation, Gene Expression, and Metabolites of Fetal Thymus and Growth in Wagyu (Japanese Black) Cattle

(和牛 (黒毛和牛) における母牛の低栄養が胎児胸腺のDNAメチル化、遺伝子発現、代謝産物および成長に及ぼす影響に関する研究)

畜産は食料安全保障と経済的安定を確保する上で重要な役割を担ってきたが、昨今、生産コストの上昇、収益性の低下、動物の健康と生態系への悪影響などの要因により、困難になっている。牛肉生産においては、牛の感染症への罹患による生産性への負の影響も高くなっており、免疫の強い健康な家畜による効率的な生産が求められる。近年、母体の栄養は胎児の発育に大きく影響し、DOHaD 理論に従って出生後の種々の表現型に影響を及ぼす。近年、母体栄養がエピジェネティックな変化を誘発し、遺伝子発現を変化させることで、胎児の器官形成と生理学に影響を及ぼす可能性があることから、この概念は畜産にも応用できるコンセプトとして注目される。家畜にとって健康とそれにつづく生産性が重要である。特に胸腺は、出生前および出生後の免疫恒常性の確立と維持に不可欠である。本研究では、黒毛和牛における妊娠期の低栄養が和牛胎児胸腺のDNAメチル化、遺伝子発現、および代謝物プロファイルに及ぼす影響を調べ、その結果生じる新生和牛子牛の生理学的および成長変化を評価した。

妊娠期の低栄養が仔畜の成長に及ぼす初期影響を調べるため、妊娠牛 8 頭を妊娠後期に 2 群に分けた。対照群 (CON, n=4) には必要栄養量の 100%を給与し、低栄養群 (LOW, n=4) には分娩まで 60%を給与した。牛とその新生仔牛の血液サンプルから代謝ホルモン(Growth Hormone: GH)と代謝産物を分析し、初乳についても同じ形質を調べた。妊娠牛の GH 分泌量は CON 群に比べ LOW 群で高く、この差は分娩後も持続し、初乳含量にも同時に観察された。LOW群では、CON群と比較してインスリン分泌が全体的に低い傾向がみられた。血漿グルコース濃度はCON群に比べLOW群で低く、遊離脂肪酸濃度は栄養投与期間を通じてCON群に比べLOW群で高かった。さらに、血漿タンパク質濃度は、栄養剤投与期間を通じてCON群と比較してLOW群で低く、この格差は分娩後も持続し、初乳含量にも同時に観察された。仔畜では、GH分泌はCON群の子供と比較してLOW群の仔畜で高かった。しかしながら、2群の子供の間のGH分泌における全体的な格差は明らかではなかった。分娩日のインスリン様成長因子-I(Insulin-like Growth Factor-I: IGF-I)レベルは LOW群で高かった。それにもかかわらず、IGF-Iの全体的な分泌量はCON群と比較して LOW群で少なかった。本試験の子牛は性別とグ

グループ別に分類され、雄の子牛はCON群、雌の子牛はLOW群に分類された。出生時、LOW群の子牛はCON群の子牛に比べて出生体重が低く、この体重差は観察開始 5カ月間持続した。しかしながら、成長率および飼料要求率に差は認められなかった。

次に11頭の黒毛和牛の妊娠牛を用いて2群に分けて、胎齢 8.5カ月齢まで、CON群 (n=6) には栄養所要量の120%を与え、LOW群 (n=5) には60%を与えた。まず、胸腺の組織学的および免疫組織化学的解析に焦点を当てて実験を行った。胸腺重量は、LOW群ではCON群に比べて大幅に減少していた。組織学的解析では、CON群と比較してLOW群で髄質面積が減少していた。T細胞に関する組織化学的解析では、LOW群ではCON群と比較してCD4陽性のT細胞の数が有意に多く、CD4陽性T細胞の核に対する比率が高かった。次の実験では胎児の胸腺におけるDNAメチル化、遺伝子発現、代謝産物を調査した。Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) により、8,869個のメチル化動態の差異を示す遺伝子が明らかになり、LOW群では4,566個の遺伝子が低メチル化、4,303個の遺伝子が高メチル化を示した。遺伝子間領域はDNAメチル化の頻度が最も高く、次いでイントロンであったが、プロモーター領域は両群ともDNAメチル化の変化が最も少なかった。KEGGパスウェイ解析によると、LOW群では低メチル化遺伝子部位 (Differently methylated region: DMG) はRasシグナル伝達経路、cGMP-PKGシグナル伝達経路、視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸の合成と分泌に関する経路 (GnRH, オキシトシン, レニン, アルドステロン, リラキシン, コルチゾール, インスリンなど) と関連していた。高DMGが濃縮した経路には、Hippo, Wntシグナル伝達, 副甲状腺ホルモン, FcガンマRを介した食作用が含まれた。RNA-sequencing 解析により、94の発現の異なる遺伝子が同定され、LOW群では66遺伝子が発現上昇し、28遺伝子が発現低下した。KEGGパスウェイ解析により、代謝経路、酸化的リン酸化、化学発がん-活性酸素種、グルタチオン代謝に関連する遺伝子の発現上昇が明らかになった。一方、発現が低下した遺伝子は、MAPKシグナル伝達, C型レクチン受容体シグナル伝達, ナチュラルキラー細胞媒介性細胞毒性に関連していた。さらに、DNAメチル化と遺伝子発現データの統合解析により抽出されたGRIA1, CACNA1D, 及びSLC25A4などの重要な重複遺伝子は、cAMPシグナル伝達経路, cGMP-PKGシグナル伝達経路を含む経路に関連していた。メタボローム解析の結果、妊娠期栄養に反応してヒスチジン, アラニン, セリン, ヒスタミン, フェニルアラニンのレベルが上昇した。Metabolite Set Enrichment Analysisの結果は、特定の代謝経路、特にアミノ酸代謝に関連する経路の変化が示唆された。さらに、胎児胸腺のT細胞におけるCD4の発現は、CON群と比較してLOW群で有意に高かった。

これらの知見は、黒毛和牛において妊娠期低栄養は、胎児胸腺のエピジェネティックな変化を誘導するとともに、代謝に関連する遺伝子発現を調節し、その結果、特にヘルパーT細胞におけるストレスや免疫応答に影響を及ぼす可能性があること、さらに、GHとIGF-1の分泌を変化させ、仔畜の初期成長を生理学的に調節することを明らかとした。本研究の成果は、妊娠期栄養が家畜の健康と効率的飼養技術の開発における畜産研究分野の科学的基礎知見として意義が大きく、新たな牛肉生産システムの構築に寄与するものと期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士 (環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。