

令和 2 年 5 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K12608

研究課題名（和文）胎児期化学物質曝露が動脈硬化症に及ぼす影響のエピゲノム及び血管生物学的解析

研究課題名（英文）Epigenetic effects of prenatal environmental exposure on fetal blood vessels.

研究代表者

森 千里（Mori, Chisato）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90174375

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では胎児期環境が血管のエピジェネティック状態に与える影響を明らかにすることを目的とした。出生時に臍帯動脈を採取しDNAメチル化と胎児期環境因子と関連を検討した。PCBと臍帯動脈のDNAメチル化に相関が認められなかったが、出生体重との間には相関を示す部位が認められた。この血管におけるメチル化状態が持つ意義を明らかにするために、DNAメチル化を調節することを試みたが、十分は変化を示すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児期の栄養環境が成人後の心血管疾患に影響を与えることが報告されている（DOHaD学説）。本研究では胎児期環境因子が血管のエピジェネティクスに与える影響の一端を示すことができた。DNAメチル化は長期間保存されることが示されており、この変化の生物学的意義やメチル化状態を変化させる手法を開発することができれば、心血管疾患の先制医療の確立に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the effect of the fetal environment on the epigenetic status of blood vessels. In a birth cohort study, umbilical arteries were obtained at birth and their DNA was extracted. To examine the relationship between DNA methylation and prenatal environmental factors, we assessed correlations between one of the persistent organic pollutants, PCB, or birth weight and DNA methylation levels. No correlation was found between serum PCB concentrations and DNA methylation levels of umbilical arteries, but there was a site showing a correlation with the birth weight. To clarify the effects of the methylation status in the umbilical artery, we attempted to regulate DNA methylation, but failed to show sufficient changes.

研究分野：環境医学

キーワード：DNAメチル化 臍帯動脈 環境化学物質 子宮内環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心血管疾患は我が国における死因の第一位となっており、その対策が急務である。心血管疾患の基盤となる動脈硬化症の危険因子としては、喫煙、高コレステロール血症、糖尿病、肥満、高血圧症があり、それぞれに対して、対策が行われている。近年、環境中の汚染物質、特に蓄積性有機汚染物質 (POPs) が動脈硬化症と関連する可能性が報告されている (1)。2015年のヨーロッパ糖尿病学会において POPs が動脈硬化症の重要な危険因子である糖尿病の発症リスクを高めるという報告もなされている。また、胎児期の子宮内環境が成人後の冠動脈疾患を増加させるという報告 (2) があり、胎児子宮内環境と成人後の non-communicable diseases (NCDs) との関連に注目が集まっている。これは Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 学説として提唱されている。一般に、化学物質に対する感受性が胎児期に高いことが知られており、胎児期の POPs 曝露が成人後の動脈硬化性疾患の発症に寄与している可能性が考えられる。また、POPs の一つである PCB が DNA メチル化に影響を与えることが報告されている (3)。

胎児期の環境因子が NCDs に影響を与えるメカニズムの一つとして DNA のメチル化が考えられている。しかしながら、子宮内環境が胎児由来の血管に与える影響に関する報告はほとんどない。子宮内環境が血管特に動脈に与える影響を解明することは DOHaD 学説に基づく心血管疾患・動脈硬化症の発症メカニズムの解明及び予防においても重要である。

### 2. 研究の目的

本申請課題は子宮内環境が動脈硬化の発症に影響を与える機序を解明することを目的とし、1) 子宮内環境、特に POPs と新生児期の動脈における DNA メチル化の関連を明らかにする、2) 血管において DNA メチル化が動脈硬化に及ぼす影響、すなわち平滑筋あるいは内皮細胞の機能への影響を明らかにするとともにその分子生物学的機序を明らかにすることを旨とする。すなわち、1) で同定されたメチル化状態を血管平滑筋細胞および血管内皮細胞に導入し、細胞機能の変化および遺伝子発現の変化を検討する。これにより同定された胎児期の POPs 曝露と関連する DNA メチル化領域が実際の細胞機能に与える影響を明らかにする。この結果は胎児期からの動脈硬化症対策に寄与するとともにハイリスク児抽出のバイオマーカーの確立に寄与すると考える。

### 3. 研究の方法

#### 対象

千葉大学が実施する千葉出生コホート調査 (C-MACH) (4) の参加者のうち、新鮮な状態で臍帯を入手し、臍帯動脈を採取しえた参加者 26 名。

#### 質問票および血液・臍帯動脈採取

妊娠前期および後期において質問票調査を行った。児の体格は医療機関における出産時記録より抽出した。母体血は妊娠前期および後期に採取し、血清に分離したのち凍結保存とした。臍帯血は出産時に採取し、血清を分離したのち凍結保存とした。臍帯は出産時に採取し、速やかに冷蔵し研究室に移送した。研究室において、臍帯動脈をのち-80 にて保存した。

#### DNA メチル化アレイ解析

凍結保存されていた臍帯動脈から、Nucleospin Tissue (タカラバイオ株式会社) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を bisulfite 処理し、Infinium MethylationEPIC BeadChip (イルミナ社) を用いて DNA メチル化状態を評価した。各プローブにおける DNA メチル化状態は GenomeStudio ソフトウェア (イルミナ社) により 値に変換した。

#### 血清 PCB 測定

母体血および臍帯血の PCB 濃度は既報 (5) に従いガスクロマトグラフ-負イオン化学イオン化-四重極質量分析計 (GC-NICI- qMS) を用いて行った。血清 PCB 測定では 16 異性を合計した値を総 PCB 濃度として解析に供した。

#### 領域特異的 DNA メチル化変化

領域特異的に DNA メチル化を低下させる方法には、CRISPR-Cas9 を応用した方法 (6) を用いた。これは、同一のベクターに変異 Cas9 と TET1 及びガイド RNA (gRNA) を挿入し、TET1 のメチル化シトシンヒドロキシラーゼによりメチル化されたシトシンを脱メチル化するシステムである。上記解析により抽出されてプローブを含む領域に対する gRNA を作製し、ベクターに挿入したのち、細胞に遺伝子導入した。DNA メチル化状態の検討はメチル化検出高分解融解 (HRM) 分析により行った。

#### 統計解析

各プローブの 値の標準偏差が 0.1 以上となるプローブを抽出し、母体血清及び臍帯血清中の PCB 濃度あるいは出生体重との相関をスピアマンの順位相関係数を用いて分析した。多重検定の補正には false discovery rate (FDR) を用いた。FDR 補正後の q 値が 0.1 未満を有意とした。

#### 4. 研究成果

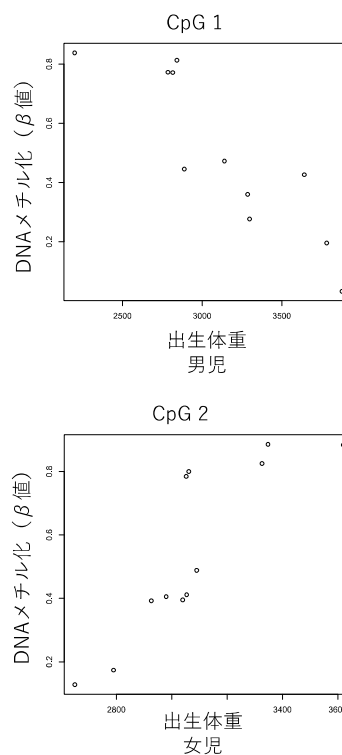
C-MACH 参加者のうち、臍帯動脈を採取できた 26 名を対象とした。母親の背景因子は、平均年齢 32.5 歳、平均妊娠前 BMI 21.2 kg/m<sup>2</sup>、平均妊娠中体重増加量 7.5kg であった。児の背景因子は、性別 男 12 人/女 13 人/不明 1 人、平均出生時妊娠週数 38.4 週、平均出生時体重 3099g、平均出生時身長 49.5cm であった。平均臍帯血総 PCB 濃度は 0.069 ng/g-wet であった。

DNA メチル化アレイにおける 値の標準偏差が 0.1 以上の変動を示すプローブを抽出したところ、約 18000 プローブであった。これらのプローブを用い、以下の分析を行った。動脈硬化症のリスクには性差があるため、分析は男女に分けて行った。

妊娠中母体血清及び臍帯血清中 PCB 濃度との相関を検討した。多重検定の補正後において、男女とも母体血及び臍帯血に PCB 濃度と有意な相関を示すプローブは認められなかった。一方、出生体重と 値の相関を検討したところ、多重検定の補正後に有意 (補正後  $q < 0.1$ ) となるプローブが男児で 2 個、女児で 3 個認められた。これらのプローブがアノテーションされている遺伝子を確認したところ、血管機能との関連が報告されている遺伝子が複数認められた。

次に、出生体重と相関を認めた CpG が含まれる領域の DNA メチル化を変化させるシステムの構築を試みた。標的とする領域に対する gRNA を RISPR デザインツール「CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>)」を用いて標的配列の候補を選択した。既報に従い gRNA をベクターに挿入し、脱メチル化ベクターを作成した。

脱メチル化ベクターを 293 細胞に導入し、同部位の DNA メチル化レベルを HRM 分析を用いて確認したところ、十分な DNA メチル化レベルの変化は認められなかった。細胞への遺伝子導入効率が低いことが一つの要因と考えられた。今後の検討のためには、導入効率を上昇させるとともにベクターが導入された細胞を分取するなどの手法を取り入れることが必要と思われる。



#### 文献

1. Lind PM et al. Circulating levels of persistent organic pollutants (POPs) and carotid atherosclerosis in the elderly. *Environ Health Perspect.* 2012 Jan;120(1):38-43.
2. Barker DJ et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2:577-80, 1989
3. Matsumoto Y et al. Embryonic PCB exposure alters phenotypic, genetic, and epigenetic profiles in turtle sex determination, a biomarker of environmental contamination. *Endocrinology* 155:4168-77, 2014
4. Sakurai K et al. Chiba study of Mother and Children's Health (C-MACH): cohort study with omics analyses. *BMJ Open.* 6: e010531, 2016
5. Eguchi A et al. Exploration of potential biomarkers and related biological pathways for PCB exposure in maternal and cord serum: a pilot birth cohort study in Chiba, Japan. *Environ Int* 102:157-164
6. Morita S et al. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol.* 34:1060-1065, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	江口 哲史  (Eguchi Akifumi)  (70595826)	千葉大学・予防医学センター・助教    (12501)	
研究分担者	櫻井 健一  (Sakurai Kenichi)  (80323434)	千葉大学・予防医学センター・准教授    (12501)	