

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10190

研究課題名(和文) 低出生体重児のストレス反応関連遺伝子DNAメチル化の複合的变化と精神行動発達

研究課題名(英文) DNA methylation levels of stress-response related genes and behavior development in low birth weight infants

研究代表者

河野 由美 (Kono, Yumi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50243390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低出生体重児のストレス行動関連遺伝子のエピジェネティクス変化と胎内ストレスの関連を明らかにするため、早産低出生体重児の臍帯血で、ヒトGR遺伝子(NR3C1)、セロトニントランスポーター遺伝子(SLC6A4)のメチル化率を測定した。NR3C1の全CpGの平均メチル化率と出生体重に有意な負の相関($r=-0.477$)を認めた。SLC6A4の全CpGの平均メチル化率は在胎期間と有意な負の相関($r=-0.41$)を認めた。NR3C1とSLC6A4のメチル化率の間に有意な関係は認めなかった。低出生体重、早産であるほどストレス反応制御関連遺伝子のメチル化率は増加しており、出生後の行動発達への影響が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産低出生体重児の臍帯血を用いてストレス反応関連遺伝子であるGR遺伝子、セロトニントランスポーター遺伝子のメチル化率を同時解析し、出生体重、在胎期間との関連が明らかとなった。早産低出生体重を生じるような子宮内ストレスが関連遺伝子のメチル化変化を介して発現制御を変容させ、将来の精神行動発達に影響する可能性が示唆された。対象数が少なく出生体重、在胎期間以外の要因とは有意な関係を認めなかった点は研究の限界であり、また長期の行動発達の観察が必要であるが、本結果は早産低出生体重児の行動発達特性の発症メカニズムおよび病態解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate mechanism of behavior developmental disorder in very low birth weight (VLBW) infants, we investigate DNA methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and serotonin transporter gene (SLC6A4) in cord blood of preterm VLBW infants. Methylation levels at 10 CpG sites in NR3C1 exon 1F and those at 20 CpG sites in SLC6A4 exon 1a were quantified using a pyrosequencing method. The mean methylation levels of NR3C1 were negatively correlated to BW ($r=-0.477$). The mean methylation levels of SLC6A4 were negatively correlated to gestational age (GA) ($r=-0.410$). Correlation of methylation levels between NR3C1 and SLC6A4 were not significant. Either methylation of NR3C1 or SLC6A4 did not correlated with maternal smoking, mental disorder, or prenatal steroid use. Thus, methylation levels of NR3C1 and SLC6A4, which could control stress-response were related to lower BW or smaller GA and they may affect to stress-related behavior regulation in later life of VLBW infants.

研究分野：新生児医学

キーワード：低出生体重児 ストレス メチル化 発達障害

1. 研究開始当初の背景

(1) 早産・低出生体重児の精神行動発達の特徴

早産・低出生体重児では、年少期には易刺激性や多動性、学童期では不注意やコミュニケーション力の低さ、思春期、成人では内向性、抑うつ気分などの合併が一般にくらべ高率なことが知られている。注意欠如・多動症(ADHD)や自閉スペクトラム症(ASD)などの発達障害や精神疾患の症状と一致するが、程度が軽い、複数の疾病症状が併存する、男女差が少ない、年齢とともに主症状が変化するなどの特徴がみられる。脳白質障害や生理的・解剖学的な脳発達との関連も示唆され、一般児の発達障害や精神疾患とは異なるメカニズムの関与が考えられるが、その病因や病態は明らかになっていない。

(2) 発達障害の要因としてのストレス関連遺伝子のエピジェネティクスの関与

妊娠中の母親の精神状態、出生直後の母児分離や母の育児行動からうける幼若期体験は、児のストレス反応を長期間にわたり変容させること、ストレス反応の脆弱性が、後の行動発達や感情の障害に影響することが知られている。そこで、低出生体重児の特徴的な精神行動発達障害のメカニズムとして「胎内から生後早期の成育環境が、ストレス反応に関与する遺伝子のエピジェネティックな修飾をもたらし、外的刺激に対する適応反応の脆弱性を形成する」という仮説をたてた。先行研究では、ストレス反応の関連遺伝子としてグルコルチコイドレセプター (GR) 遺伝子 (*NR3C1*) プロモーター領域の DNA メチル化率を解析し、Exon 1F promoter 領域の一部の CpG のメチル化率と在胎期間が関連すること認めた。より早産であるほど出生前により大きなストレスが生じ GR 遺伝子のメチル化率を増加させているのではないかと考えられた。一方、出生体重 SD スコアや新生児合併症とは有意な関連を認めなかったことから、GR 遺伝子以外のストレス反応や行動の制御に関わる遺伝子である 11 - hydroxysteroid dehydrogenase 2 (*11 HSD2*)、セロトニントランスポーター遺伝子 (*SLC6A4*) などのエピジェネティクス変化も同時に調べることが必要と考えた。

2. 研究の目的

早産・極低出生体重児の対象で、*NR3C1* の DNA メチル化解析に加えて、同様の方法でコルチゾールの不活化酵素 11 - hydroxysteroid dehydrogenase 2 遺伝子 (*11 HSD2*)、セロトニントランスポーター遺伝子 (*SLC6A4*) のメチル化解析を同一検体で行うことを目的とした。妊娠中・NICU 入院中の臨床情報を元に、1) 臍帯血のストレス反応関連遺伝子 (*NR3C1*, *11 HSD2*, *SLC6A4*) のメチル化率とその相互関係、2) 出生時から NICU 退院後間のメチル化率の変化、3) 在胎期間、出生体重、NICU での合併症などの生物環境要因と各遺伝子メチル化率との関連を調べることを目的とした。更に、対象のフォローアップを継続的に行い、メチル化率と行動発達との関連を調べることとした。

3. 研究の方法

(1) 研究対象と臨床情報の取得

研究対象は、自治医科大学附属病院で出生し NICU に入院した、在胎 33 週未満または出生体重 1500g 未満の早産児または低出生体重児で、NICU 入院時から退院後初回外来受診時までには保護者に研究の説明を行い、同意の取得ができた例とした。

対象児の、母親の妊娠中の経過、母親へのステロイドを含めた投与薬物、在胎期間、出生体重、LFD または SFD (light or small dates)/AFD (appropriate for dates)、新生児仮死の有無などの周産期情報に加え、NICU 入院期間中の合併症 (呼吸窮迫症候群、慢性肺疾患、晚期循環不全、壊死性腸炎、脳室内出血、脳室周囲白質軟化症、退院時合併症) 治療 (入院日数、酸素投与日数、人工呼吸器使用日数、甲状腺ホルモン投与、ステロイド治療、退院時体重) についての情報を取得した。

(2) 試料の収集と保存

臍帯血は最大 2 ml として可能な範囲で採取した。NICU 退院時採血 (以下、退院時血) は、通常の採血に追加して全血 2 ml を採取した。NICU 入院中に NICU バイオバンクに試料の保管について同意を取得した。研究の同意を得た対象者の保管した全血の白血球分画から DNA 抽出キット (Flexigene DNA Blood Kit) を用いてゲノム DNA を抽出し -20℃ で保存し、解析に使用した。

(3) ヒト GR 遺伝子 (*NR3C1*)、セロトニントランスポーター遺伝子 (*SLC6A4*) の DNA メチル化解析

当初の計画では、臍帯血を用いて *NR3C1*、*SLC6A4*、*11 HSD2* の 3 つの遺伝子のメチル化の同時解析を行う予定であったが、臍帯血から採取できる血液量が 2 ml に至らない例があり、3 遺伝子の同時解析に必要な DNA 量が得られなかったため、*NR3C1* と *SLC6A4* の二つの遺伝子の同時メチル化解析を行うこととした。*NR3C1* の解析は、先行研究と同様に、パイサルファイト処理した DNA から、PCR 法により *NR3C1* 遺伝子の -3492 ~ -3082 領域 (ADS749FS、ADS2386FS) を増幅し、PCR 産物を PyroMark MD system により精製しシークエンスを行った (文献 Oberlander ら, Epigenetics, 2008)。2 つのシークエンス primer を用いて 15 の CpG サイト (216 ~ 202) の DNA メチル化を測定した。*SLC6A4* のメチル化率の測定方法も同様に行い、解析部位は、新生児の痛み刺激ストレスとの関連を調べた Provenzi らの方法に従い、exon 1 に隣接した promoter 領域

(ASD580-FS-2, ADS580-FS1)の20CpGサイト(252~233)のメチル化率を測定した(文献 Provenziら、Front Behav Neurosci, 2015)。各サイトのメチル化はPyro Q-CpGソフトウェアにより定量化を行った。メチル化率の定量はEpigenDx, Incに委託を行った。

(4) 倫理的事項

研究実施について、遺伝子解析研究倫理審査委員会に申請し承認後に実施した(遺17-039号)。

4. 研究成果

(1) 対象

対象26名の33サンプル(臍帯血24サンプル、退院時または修正40週時の生後血9サンプル)を用いてNR3C1、SLC6A4のメチル化の同時測定と解析をおこなった。臍帯血の解析を実施できた対象24名の基本的特性・周産期背景を表1に、新生児合併症を表2に示した。全例が生存退院した。

表1 対象の周産期背景(n=24)

	平均	95%信頼区 間
出生体重(g)	1025	902 - 1149
在胎期間(w)	29.1	27.6 - 30.5
母年齢(y)	34.4	32.7 - 36.1
	N	%
児の性別：男	10	41.7%
LFDまたはSFD	9	37.5%
多胎	8	33.3%
出生前ステロイド投 与	13	54.2%
NRFS	3	12.5%
母体合併症		
精神疾患	3	12.5%
喫煙	4	16.7%
妊娠高血圧腎症	6	26.1%
切迫早産	15	62.5%
絨毛膜羊膜炎	7	29.2%
胎盤早期剥離	1	4.2%

表2 新生児合併症(n=24)

	平均	95%信頼区 間
Apgar 5分値	7.2	6.6 - 7.8
人工呼吸日数	31.0	18.5 - 43.4
酸素投与日数	74.4	51.8 - 97.0
退院時日齢	107	84 - 129
退院時体重	2614	2406 - 2821
	N	%
RDS	20	87.0%
CLD 36週時	12	50.0%
晩期循環不全	1	4.2%
NEC/消化管穿孔	1	4.2%
IVH	1	4.2%
PVL	0	0.0%
ROP	5	20.8%
昇圧剤投与	9	37.5%
人工呼吸管理	22	91.7%
ステロイド投与	4	16.7%
甲状腺ホルモン投与	2	18.3%

(2) 臍帯血のNR3C1遺伝子、SLC6A4遺伝子 promoter領域のメチル化率

NR3C1遺伝子のCpG#210~214については、全例でメチル化率の測定感度以下であった。SLC6A4遺伝子ではCpG#242と#237が測定感度以下であった。測定感度以下を除くNR3C1遺伝子の10の各CpGサイト(#215、216、#202~#209)、測定した全CpGの平均メチル化率と95%信頼区間、同様にSLC6A4遺伝子の18の各CpGサイト(#252~#233)、全CpGの平均メチル化率と95%信頼区間を表3に示す。NR3C1の全CpGの平均値とSLC6A4の全CpGの平均メチル化率の間に有意な相関関係はみられなかった(Pearsonの相関係数=-0.212、p=0.319)。

表3 臍帯血のNR3C1およびSLC6A4遺伝子CpGメチル化率(n=24)

NR3C1 CpG	平均	95%信頼区間	SLC6A4 CpG	平均	95%信頼区間	SLC6A4 CpG	平均	95%信頼区間
#216	0.21	-0.13 - 0.54	#252	4.01	3.13 - 4.89	#241	0.29	-0.12 - 0.65
#215	0.05	-0.00 - 0.69	#251	1.06	0.45 - 1.67	#240	0.48	0.00 - 0.95
#209	5.06	3.10 - 7.03	#250	2.23	1.36 - 3.11	#239	0.41	-0.07 - 0.88
#208	6.27	4.99 - 7.55	#249	5.77	4.44 - 7.09	#238	0.27	-0.12 - 0.65
#207	0.99	0.72 - 1.26	#248	4.77	3.96 - 5.55	#236	3.50	0.79 - 6.21
#206	5.74	3.48 - 8.02	#247	0.72	0.23 - 1.22	#235	2.23	0.69 - 3.77
#205	1.50	1.06 - 1.95	#246	2.07	1.28 - 2.86	#234	0.93	0.08 - 1.78
#204	0.54	0.21 - 0.88	#245	4.55	3.87 - 5.22	#233	3.46	0.72 - 6.20
#203	0.32	0.04 - 0.60	#244	1.08	0.40 - 1.75	#252~233	1.96	1.61 - 2.31
#202	0.05	-0.06 - 0.16	#243	1.35	0.56 - 2.13	Total/CpG		
#216~#202 Total/CpG	1.39	0.99-1.79						

(3) 臍帯血の *NR3C1* 遺伝子、*SLC6A4* 遺伝子 promoter 領域のメチル化率に影響する要因
出生体重、在胎期間との関連

表 3 に示した *NR3C1* の 10CpG のうち、#209($r=-0.492$)、#208($r=-0.485$)、#206($r=-0.496$)、#205($r=-0.520$) は出生体重と有意な負の相関を示した。有意な正の相関を示す CpG はなく、全 CpG の平均メチル化率とは $r=-0.477$ 、 $p=0.02$ の負の相関を認めた(図 1A)。 *SLC6A4* の 18CpG では、#251($r=-0.619$)、#247($r=-0.416$)、#244($r=-0.576$)、#243($r=-0.472$) が出生体重といずれも負の相関を、#236($r=0.407$) が有意な正の相関を示した。全 CpG の平均メチル化率とは有意な相関を認めなかった(図 1A)。

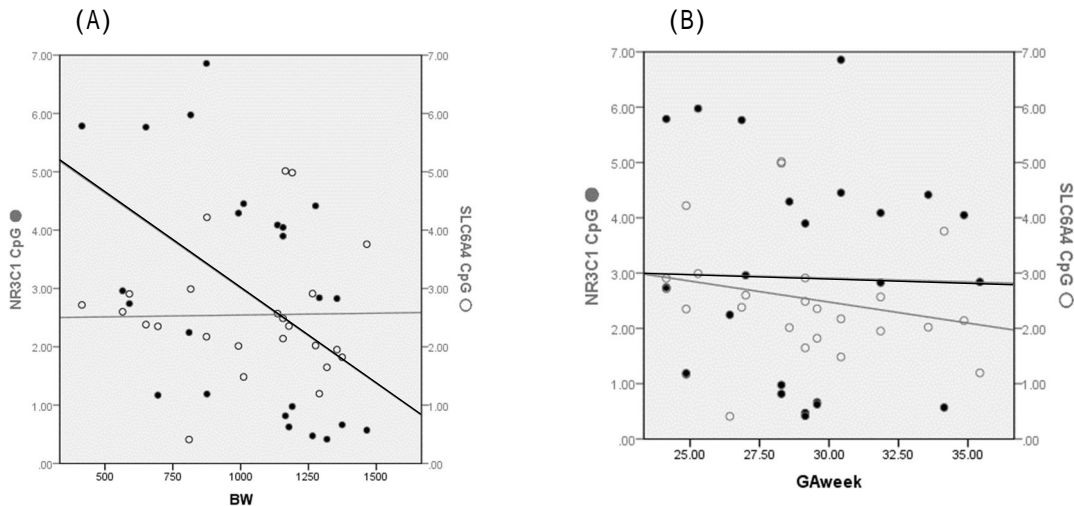


図 1 *NR3C1* と *SLC6A4* の全 CpG メチル化率と(A)出生体重、(B)在胎期間との関係

在胎期間との関係では、*NR3C1* のいずれの CpG および全 CpG の平均メチル化率と有意な相関は認めなかった(図 1B)。 *SLC6A4* の 18 の各 CpG と有意な相関は認めなかったが、全 CpG の平均メチル化率とは $r=-0.41$ 、 $p=0.04$ の負の相関を認めた(図 1B)。LFD/SFD と AFD の比較では、LFD/SFD は AFD と比較し *NR3C1* の#207 および全 CpG 平均のメチル化率が有意に高値であったが、*SLC6A4* のメチル化率には有意差を認めなかった。これらの結果から、出生体重が小さいほど胎内での *NR3C1* および *SLC6A4* の一部の CpG のメチル化率が出生時に高率であることが示された。在胎期間との関係では *SLC6A4* の CpG はより早産であるほどメチル化率が高いことが示唆された。この結果は、早産低出生体重児の子宮内でのストレスが GR 遺伝子、セロトニントランスポーター遺伝子のメチル化変化を介してその発現制御を変容すること、更にその後の行動発達特性に影響する可能性が示唆された。

他の周産期要因との関連

NR3C1 の全 CpG 平均値、*SLC6A4* の全 CpG の平均メチル化率を各種出生前要因、母体合併症、治療の有無により比較した。妊娠高血圧腎症合併で、*SLC6A4* の全 CpG の平均メチル化率は合併なしに比べ有意に低く、*NR3C1* の全 CpG のメチル化率に有意差は認めなかった。切迫早産合併では、*NR3C1* の CpG のメチル化率は有意に低値で、*SLC6A4* の全 CpG の平均メチル化率は同合併なしに比べ有意に高値であった。母体の喫煙、精神疾患、その他の合併症の有無および母体ステロイド投与の有無と二つの遺伝子のメチル化率に有意な関係は認めなかった。

臍帯血と退院時血の比較

全サンプルで比較すると、*NR3C1* の全 CpG の平均メチル化率は、退院時の方が低値であった。*SLC6A4* の全 CpG の平均メチル化率には有意差を認めなかった。*SLC6A4* CpG では CpG#233、#234、#236 のみ有意な増加を認めた。臍帯血と退院時または修正40週時の血液の両方で測定できた8名でメチル化率の変化を比較したところ、*NR3C1* の全 CpG 平均メチル化率、*SLC6A4* の全 CpG の平均メチル化率に有意差を認めなかった。*NR3C1* の全 CpG の平均メチル化率が増加したのは3例、*SLC6A4* の増加も3例で、両方とも明らかに増加した症例は1例であった。

(4) 臍帯血の *NR3C1* 遺伝子、*SLC6A4* 遺伝子 promoter 領域のメチル化率と発達予後

対象症例は研究終了時で暦月齢 7 か月 ~ 3 歳 3 か月(中央値 1 歳 10 か月)であった。24 例中、

言語発達遅滞を 5 例、言語発達遅滞 + ASD 疑いを 2 例に、全般的な発達遅滞を 1 例に認め 16 例は定型発達であった。明らかな多動を認める例は全般的な発達遅滞の 1 例のみであった。*NR3C1* の全 CpG の平均メチル化率、*SLC6A4* の全 CpG の平均メチル化率に上記の発達パターン 4 グループ間で有意な違いは認めなかった (図 2、図 3)。しかしながら、1 歳以下の例が 6 例あり、発達予後との関連については、引き続きフォローアップを行いメチル化率との関係を調べる必要がある。

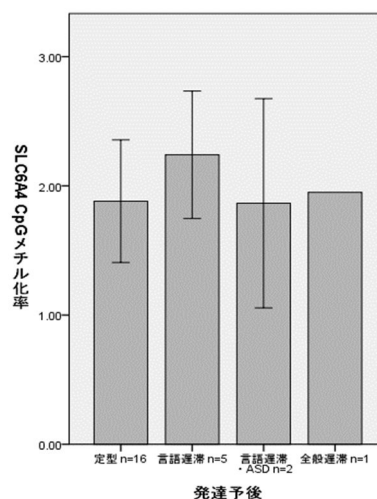
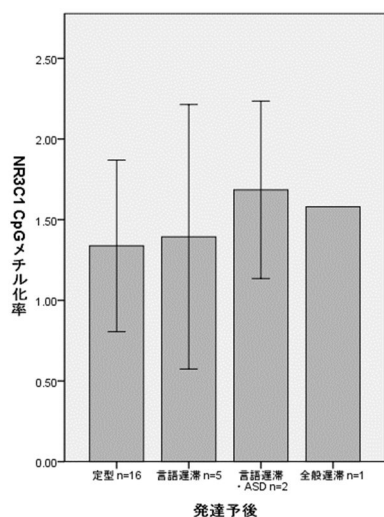


図2 発達パターンと*NR3C1*の全CpGメチル化率 図3 発達パターンと*SLC6A4*の全CpGメチル化率 (平均 ± SD)

(5) 研究の限界と今後の展開

本研究は早産または低出生体重児を対象とし、臍帯血を用いてストレス反応関連遺伝子である GR 遺伝子 (*NR3C1*) と、セロトニントランスポーター遺伝子 (*SLC6A4*) のメチル化率を同時解析し、その相互関係、影響要因を解析した新規の研究である。出生体重が小さいほど胎内での *NR3C1* および *SLC6A4* の一部の CpG のメチル化率が出生時に高率であることが示された。この結果は子宮内で低出生体重を来すようなストレスがストレス反応関連遺伝子のメチル化変化を介してその発現制御を変容させる可能性が示唆された。一方で *NR3C1* と *SLC6A4* のメチル化率に有意な相関はなく、また CpG の部位によりメチル化率に差が認められた。また出生前の母体疾患、周産期合併症、ステロイド使用の有無との関連は不明であった。臍帯血のメチル化率を測定できたのは 24 例であり、在胎期間は 24 ~ 35 週と比較的広範囲であったことなどから、出生体重以外の要因で有意な関係を認めなかった可能性があり本研究の限界と考えられた。また、児の行動発達との関連については、評価期間が短く、3 歳以後に健在化してくることが多い ADHD との関連はより長期のフォローアップが必要と考えられた。また出生時と退院時でのメチル化率の変化は個々の症例で異なることから、今後対象数を増やし検討すること、より長期に行動発達をフォローしていくことで更なる知見が得られると考えられた。

引用文献

- Oberlander, T.F., Weinberg, J., Papsdorf, M., et al. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics* 2008, 3:97-106.
- Provenzi L, Fumagalli M, Sirgiovanni I, et al. Pain-related stress during the Neonatal Intensive Care Unit stay and *SLC6A4* methylation in very preterm infants. *Front. Behav. Neurosci.* 2015, 9:99.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kono Y, Yonemoto N, Nakanishi H, Kusuda S, Fujimura M	4. 巻 2
2. 論文標題 Changes in survival and neurodevelopmental outcomes of infants born at <25 weeks' gestation: a retrospective observational study in tertiary centers in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMJ Paediatr Open	6. 最初と最後の頁 e000211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjpo-2017-000211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yumi Kono
2. 発表標題 Survival and neurodevelopmental outcomes of infants born at less than 25 weeks' gestation in the Neonatal Research Network of Japan
3. 学会等名 the 69th Korean Pediatric Society Annual Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	神保 恵理子 (Jinbo Eriko) (20291651)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	
研究協力者	鈴木 由芽 (Suzuki Yume) (40458302)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究協力者	俣野 美雪 (Matano Miyuki) (90458315)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------