

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03895
研究課題名(和文) 妊娠期間欠的低酸素がもたらすエピゲノム変化の分子機構解明と医療応用の基盤構築

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of epigenomic changes caused by intermittent hypoxia during pregnancy and construction of a foundation for medical applications

研究代表者
小野 卓史 (Ono, Takashi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30221857
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠後期においては、体重増加に伴う上部気道狭窄や、女性ホルモン変動がもたらす妊娠性鼻炎が生じ、高頻度で妊娠期の閉塞性睡眠時無呼吸症(OSA)が認められる。妊娠期のOSAは、断続的に繰り返される無呼吸・低呼吸による「間欠的低酸素(Intermittent Hypoxia; IH)状態」がもたらす低酸素ストレスに胎児を曝し、胎児の成長発育不全のみならず、生後の発達・機能障害を惹起し、成人後の生活習慣病のリスクとなる。本研究課題は、日本人妊婦と出生児を対象とした臨床調査とともに、疾患モデル動物を用いて、成長期の出生仔ラットの解析をおこない、妊娠期のOSAの病態および出生児(仔)への影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで認識されていなかった妊娠期の睡眠呼吸障害が、次世代に成長発育障害をもたらす分子基盤の解明を国内外にて初めて行うことにより、妊娠期OSAのスクリーニングの重要性を啓発し、先制医療基盤構築の契機となり、巨視的には医療費の削減と「すべての人に健康と福祉を」という持続可能な開発目標(SDGs)に沿った健康長寿社会を実現する波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gestational intermittent hypoxia (IH) is a hallmark of obstructive sleep apnea that occurs frequently during pregnancy, and effects caused by this environmental change during pregnancy may be transmitted to the offspring. We aimed to clarify the effects of IH in both pregnant patients and rats on the growth and development of infants and adolescent offspring rats. Clinical study suggested that higher BMI as a major risk factor for OSA among Japanese pregnant women. In addition, maternal OSA during pregnancy negatively influences birth weight and postnatal growth of the offspring. Animal model study suggest that respiratory and limb muscles are vulnerable to gestational IH, which induces altered energy metabolism with decreased aerobic motor function. These changes were partially owing to the decreased expression of adiponectin receptors and decreased capillary density in adolescent offspring rats.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：閉塞性睡眠時無呼吸症 妊娠女性 胎児 出生児 DOHAD仮説 間欠的低酸素

1. 研究開始当初の背景

妊娠後期においては、体重増加に伴う上部気道狭窄や、女性ホルモン変調がもたらす妊娠性鼻炎が生じ、26.7%という高頻度で妊娠期の閉塞性睡眠時無呼吸症 (OSA) が認められる。妊娠期の OSA は、断続的に繰り返される無呼吸・低呼吸による「間欠的低酸素 (Intermittent Hypoxia; IH) 状態」がもたらす低酸素ストレスに胎児を曝し、胎児の成長発育不全のみならず、生後の発達・機能障害を惹起し、成人後の生活習慣病のリスクとなる。近年、環境からの妊娠母体に対するストレスにより、エピジェネティック機構を介して、胎児に遺伝子の変性 (エピゲノム変化) が記憶され、成長後にさまざまな全身疾患を合併しやすくなること、『DOHaD 仮説』として知られており、疾患の発症機序の解明および先制医療実現への新規アプローチとして注目されている。しかしながら、妊娠母体の睡眠呼吸障害と、出生児の中枢性の成長発育障害の機構について、国内外において解明されていない状況である。

また、これまでに妊娠時に間欠的低酸素曝露を経験した仔ラットやマウスは、出生時にはやや低体重で呼吸状態にも異常が認められること、さらに成獣期には体重の増加、インスリン抵抗性、学習機能障害が起こることが報告されている (図 1)。一方、成長期の仔への影響については報告がない。

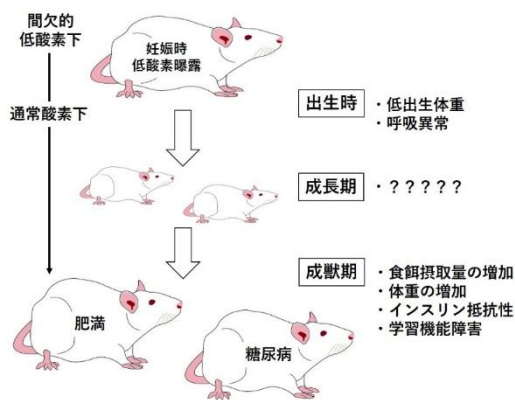


図 1: 妊娠時低酸素曝露による仔への影響

2. 研究の目的

本研究は、妊娠期の OSA の病態および出生児への影響を調査することを目的とし、具体的には、日本人妊婦と出生児を対象とした臨床調査とともに、疾患モデル動物を用いて、成長期の出生仔ラット骨格筋を解析することで、その後の疾患リスクへの関与を検討する。

3. 研究の方法

1) 臨床調査

日本人妊婦の OSA の病態および出生児への影響を調査することを目的とした臨床調査において、所属研究機関附属病院にて分娩予定の 20 歳以上の妊婦 (妊娠 28 ~ 36 週) を対象とした睡眠ポリグラフ検査 (PSG) のデータ収集をおこなった。検体数の収集目標としては、データの正規性を考慮し、OSA 群の目標症例数は 30 症例に達する必要があるが、OSA 群の患者は、OSA 治療を受けることを前提として、10 か月の妊娠期間の OSA 曝露期間を考慮し、妊娠 7 か月目で OSA 治療を開始する場合は、統計学的には、OSA 群のデータに対して、0.7 の重み付けをできる。したがって、OSA 群は平均 7 か月で OSA 治療を受けると仮定すると、本調査の OSA 群のサンプルサイズ (30 症例) として、 $30 \times 10/7 = 43$ 症例が必要となる。また、妊娠後期妊婦の OSA 有病率は約 25% と報告されている。以上を踏まえて、172 症例の妊婦を登録し、OSA の認められる妊婦 43 症例を OSA 群、OSA の認められない妊婦 129 症例をコントロール群の目標とした。

また、母胎環境の記録とともに、妊娠 36 週前後の妊婦健康診査時にて母体血、分娩後に臍帯血採血の残余検体をそれぞれ採取し、解析まで所属研究機関疾患バイオリソースセンターで冷凍保存し、その後、血球 DNA の DNA メチル化解析および血清中のストレス関連ホルモンの ELISA 解析をおこなった。

2) 基礎研究

分担研究者の所属研究機関内に設置された「小動物用 IH 曝露チャンバー」内で、SD 系妊娠ラットにおける妊娠期 OSA 患者の呼吸状態を再現する。具体的には、1 日 8 時間 (午前 9 時 - 午後 5 時) の IH 条件 (酸素濃度が 1 時間に 20 サイクルの頻度かつ 4-21% で変動) 下で、妊娠 7 日目から出産前日の妊娠 20 日目まで、SD 系妊娠ラット 72 匹を飼育 (IH 群)、その後、大気下にて出産させる。

なお、母ラットによる仔ラットの哺育・授乳状況は個体差があり、生後の栄養状況の実験データへの影響を除外するため、出生後、無作為に、母子の交換を行い、出生後3週齢まで、授乳を行う。離乳後は、仔ラットは母ラットと別離し、生後10週齢（ヒトでいう成人期）までストレスを与えずに飼育する。一方、実験期間中すべて大気下で飼育する群（対照群）を作製する。

その後、出生仔の骨格筋、顎骨および脛骨を採取し、形態学的、組織生化学的および生化学的解析をおこなう。

4. 研究成果

1) 日本人 OSA 妊婦を対象とした臨床調査

日本人の妊婦において、高い BMI は OSA の主要なリスクファクターであることが判明し、2023 年度に、これらの成果を海外学会および国内学会にて発表予定である。さらに、現在、被験者から採取した臍帯血および母体血の DNA メチル化解析のデータの解析中である。

2) 妊娠期 OSA モデル動物からの出生仔を対象とした基礎研究

胎児期に IH 曝露された仔ラットは、成長期の体重や食餌摂取量、握力に差は認められず、強制運動負荷試験では運動機能の低下が明らかとなった。そこで、横隔膜と前脛骨筋の筋線維径と筋線維タイプの割合を評価したが、変化は認められなかった。一方、これらの筋部位では糖代謝（図2）・脂質代謝に関与する遺伝子発現が減少し、糖・脂質代謝に関与する骨格筋内アディポネクチン受容体1 (Adipor1) の遺伝子発現の低下が認められました（図3A）。また、血管形成に関与するアディポネクチン受容体2 (Adipor2) の遺伝子発現も低下していたことから（図3A）、骨格筋内毛細血管密度を定量した結果、間欠的低酸素に曝露された仔ラットの横隔膜で血管密度が有意に減少していることを突き止めた（図3B, C）。このような変化は同じ骨格筋でもオトガイ舌骨筋や咬筋では認められなかったことから、胎児期の低酸素曝露による骨格筋への影響には部位特異性が存在することが考えられる。

以上の結果から、妊娠時の低酸素曝露が成長期の仔ラットにおいて、全身の代謝制御を司る骨格筋のエネルギー代謝異常や血管密度の減少を引き起こすことが明らかとなりました。このような成長期での変化が、成獣期の肥満や糖尿病といった生活習慣病発症の「鍵」となる可能性を示唆しました。

今後は、より詳細な検討を行うべく、出生後から成長期、成獣期にかけて経時的に骨格筋のエネルギー代謝変化を確認していく予定であり、また、定期的な運動介入が骨格筋内のエネルギー代謝や毛細血管密度の改善につながるのかを明らかにしていきたい。

その他、現在、下顎骨の低成長および皮質骨の低形成を実証し、顎顔面領域の骨・筋の成長障害をもたらす可能性を示唆され、学術発表にて報告し、論文投稿の用意をおこなっている。

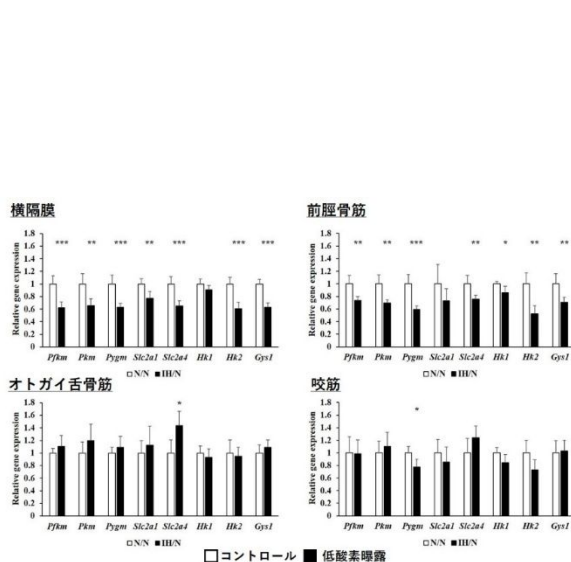


図2：骨格筋内・糖代謝関連因子の発現変化

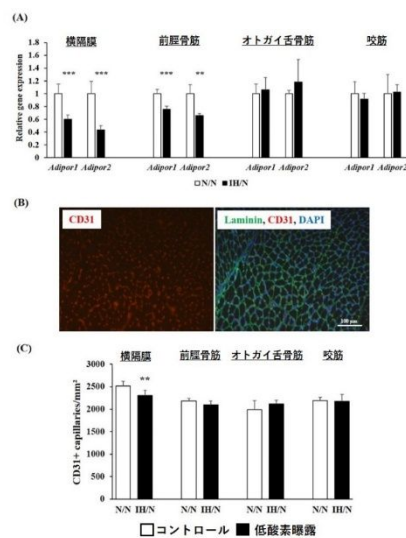


図3：骨格筋内・アディポネクチン受容体遺伝子発現 (A) と毛細血管密度 (B,C) への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wongkitikamjorn Wirongrong, Wada Eiji, Hosomichi Jun, Maeda Hideyuki, Satrawaha Sirichom, Hong Haixin, Yoshida Ken-ichi, Ono Takashi, Hayashi Yukiko K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Metabolic dysregulation and decreased capillarization in skeletal muscles of male adolescent offspring rats exposed to gestational intermittent hypoxia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2023.1067683	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wongkitikamjorn Wirongrong, Hosomichi Jun, Wada Eiji, Maeda Hideyuki, Satrawaha Sirichom, Hong Haixin, Hayashi Yukiko K, Yoshida Ken-ichi, Ono Takashi	4. 巻
2. 論文標題 Gestational Intermittent Hypoxia Induces Mitochondrial Impairment in the Geniohyoid Muscle of Offspring Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.25088	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takumi Suzuki, Jun Hosomichi, Naoyuki Miyasaka, Yasunari Miyazaki, Atsuko Taki, Takashi Zaitzu, Manaka Moro, Chikako Morioka, Noriko Sato, Takashi Ono.
2. 発表標題 Characteristics of obstructive sleep apnea among pregnant Japanese women and birth outcomes of offspring
3. 学会等名 SLEEP 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 拓望, 細道 純, 宮坂 尚幸, 宮崎 泰成, 滝 敦子, 財津 崇, 毛呂 愛香, 森丘 千夏子, 佐藤 憲子, 小野 卓史
2. 発表標題 日本人妊婦の閉塞性睡眠時無呼吸症の病態と出生児への影響について
3. 学会等名 日本女性栄養代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田 英治, Wongkitikanjorn Wirongrong, 細道 純, 前田 秀将, 小野 卓史, 林 由起子
2. 発表標題 妊娠時の間欠的低酸素曝露が成長期の仔ラット骨格筋に与える影響
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 拓望, 細道 純, 前田 秀将, 石田 雄之, 白見 莉沙, 毛呂 愛香, 小野 卓史
2. 発表標題 妊娠期の間欠的低酸素曝露が仔ラットの下顎骨の出生後成長に与える影響について
3. 学会等名 第32回日本顎変形症学会総会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takumi Suzuki, Jun Hosomichi, Naoyuki Miyasaka, Yasunari Miyazaki, Atsuko Taki, Takashi Zaitso, Manaka Moro, Chikako Morioka, Noriko Sato, Takashi Ono
2. 発表標題 Characteristics of obstructive sleep apnea among pregnant Japanese women and birth outcomes of offspring
3. 学会等名 SLEEP 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木拓望1)、細道純1)、宮坂尚幸2)、宮崎泰成3)、滝敦子4)、財津崇5)、毛呂愛香1)、森丘千夏子4)、佐藤恵子6)、小野卓史
2. 発表標題 日本人妊婦の閉塞性睡眠時無呼吸症の病態と出生児への影響について
3. 学会等名 第47回日本女性栄養・代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木拓望、細道純、前田秀将、石田雄之、白見莉沙、毛呂愛香、小野卓史
2. 発表標題 妊娠期間欠的低酸素曝露が仔ラットの下顎骨の出生後成長に与える影響について
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>共同プレスリリース（東京医科大学・東京医科歯科大学） 妊娠時の間欠的低酸素曝露による成長期仔ラット 骨格筋における代謝異常と血管密度の減少を発見 - 胎児期における低酸素環境への曝露が、成長後の骨格筋に影響を及ぼす - , 2023年01月27日掲載 https://www.tmd.ac.jp/files/topics/59023_ext_04_6.pdf</p>
--

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	細道 純 (Hosomichi Jun) (00420258)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	動物モデルの作製および解析
研究分担者	宮崎 泰成 (Miyazaki Yasunari) (30396999)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	睡眠呼吸障害のスクリーニング
研究分担者	宮坂 尚幸 (Miyasaka Naoyuki) (70313252)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	妊娠女性のリクルート、妊娠女性の調査

6. 研究組織（つづき）

	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	財津 崇 (Zaitso Takashi) (80611508)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	疫学解析
研究分担者	下澤 達雄 (Shimosawa Tatsuo) (90231365)	国際医療福祉大学・医学部・主任教授 (32206)	エピゲノム解析
研究分担者	森丘 千夏子 (Morioka Chikako) (50796191)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教 (12602)	出生児の調査およびデータ解析
研究分担者	滝 敦子 (Taki Atsuko) (20614481)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602)	出生児の調査およびデータ解析

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			
タイ	チュラロンコン大学			
中国	深セン大学			