

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890299

研究課題名(和文) 胎児期・新生児期の栄養状態に起因する成人期の遺伝子発現異常の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of aberrant gene expressions in adulthood caused by fetal and neonatal nutrition status.

研究代表者

河合 智子 (Tomoko, Kawai)

独立行政法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・研究員

研究者番号：40423404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正常出生体重群、胎児発育不全群、さらに、胎児期栄養状態の影響を検討するため母体体重変化にも注目し、ヒト胎盤を試料に、エピゲノム制御の一つである、DNAメチル化の程度を比較検討した。その結果、正常出生体重であっても、妊娠全期間の母体体重変化が適正範囲を外れると、胎盤エピゲノムに揺らぎが生じやすくなることを認めた。また、胎児発育不全例では、母体体重変化には依存しない胎盤エピゲノムの揺らぎがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on human placental epigenetic regulation which might be affected by fetal growth restriction or gestational maternal weight gain. As a result, inadequate gestational weight gain augmented randomness at epigenetic regulations even in placentas from normal birth weight. Furthermore, it is suggested that fetal growth restriction caused non-uniformity in epigenetic status independent from gestational weight gain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：エピゲノム DNAメチル化 胎盤

## 1. 研究開始当初の背景

我が国での低出生体重児の頻度は、昭和50年の5.1%を最低に、平成19年には9.6%と増加の一途をたどっている(厚生労働省「人口動態統計」より)。研究開始当初から今でも増加の傾向は続いている。その一因として、妊娠期の栄養摂取の過度の制限が考えられる。「小さく産んで、大きく育てる」という俗説はいまだに広く受け入れられているが、出生時低体重と生活習慣病発症率に正の相関が認められるという様々な疫学的エビデンスが報告されており、モデル動物においてもその機構が徐々に解明されてきている。妊娠期をはじめ授乳期の、胎児ならびに新生児の環境が疾患の素因として大きく影響しているという概念は、Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)学説として認知され、International Society for DOHaDも研究開始当初、7回目の大会を迎えた。

これまでに、胎児期の低栄養が、中枢の視床下部でのレプチンシグナル伝達に異常をきたし、成熟期の表現型に異常をもたらすことが報告されている(Coupé et al. PloS one. 2012)。しかし、肝臓のレプチンレセプターを欠失させても、代謝因子を始め何も表現型に変化を及ぼすことはなく(Cohen et al. J Clin Invest 2001)、肝でのレプチンレセプターの発現意義は不明であった。しかし近年、シグナル伝達が可能なレプチンレセプターの唯一のアイソフォームのみを肝で欠失したマウスでは、老化に伴う耐糖能異常が改善されるという報告が出された(Huynh et al. Diabetes 2010)。

我々は研究開始当初、未発表の独自データとして、妊娠期の低栄養が、新生仔獣の肝臓Ob-Rの発現を抑制すること、この遺伝子プロモーター部位のメチル化パターンに変化をきたすこと、という知見を得ていた。

プロモーター部位のメチル化パターンの変化は、細胞分裂時にもその修飾が複製機構により維持され、細胞記憶の一端を担っていることが知られている。哺乳類では、胚発生の初期にDNAメチル化パターンが確立され、維持される。したがって、妊娠期の環境によって、胎児のDNAメチル化パターンを変えてしまうことは、胎児期の出生後の長期に渡る遺伝子発現状態に対する影響の遺残という観点から、重大な意味を持つ。

そこで、本研究では、ヒトサンプルを用いて、妊娠期の栄養状態がDNAメチル化に及ぼす影響を、ゲノム全体で網羅的に見ることを試みた。

## 2. 研究の目的

妊娠期の低栄養が胎児に及ぼす影響は、出生後も長期に渡って遺残し、成人期においても代謝調節に関わる種々の因子の遺伝子発現異常に関与することが知られている。本研究では、胎児期の栄養状態に起因する成人期の遺伝子発現異常の分子メカニズムを解明

することを目的とした。我々はすでに試験的研究を行い、モデル動物を用いて、妊娠期の低栄養が、出生仔の肝臓のレプチンレセプターの発現低下に関与していること、この遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構に変化が起こっていること、を同定していた。そこで、本研究では、胎児期の栄養状態とエピジェネティックな変化を介した遺伝子発現異常との関連の詳細を明らかにすることを目的とした。モデル動物を用いた研究成果は報告数を増やしていたものの、ヒト検体を用いた解析報告は限られていたことより、本研究では、ヒト胎児発育遅延および正常出生体重出産例を対象に、ヒトでの胎児期低栄養によるエピジェネティックな影響の有無の解析を試みた。本研究成果は、適切な妊産婦栄養管理の指標として、また、成人期の代謝異常危険予測因子としての応用展開が期待される。

## 3. 研究の方法

(1)ヒト胎児発育遅延および正常出生体重出産例より、胎盤サンプルをいただき、絨毛組織よりDNAを抽出した。

(2)胎児期の栄養状態を反映する指標として、母体の妊娠期の体重変化量に注目した。厚生労働省から発表されている適正範囲の妊娠期体重増加量(7~12kg)を指標に、ヒト胎児発育遅延例、および正常出生体重出産例検体を適正、不足、超過の3群に分けた。本研究では、妊娠合併症を持つ検体は除き、妊娠前のBMIが正常範囲にある妊婦を対象とした。また、3群間で、妊婦の年齢差や妊娠前のBMIに差は見られなかった。

(3)ゲノム網羅的なDNAメチル化解析は、イルミナのInfinium HumanMethylation450BeadChipを用いて行った。このチップはヒトゲノムの99%の遺伝子上に位置する、約45万箇所のCytosine(CpG site)のメチル化率の検出が可能である。得られたデータの解析は、Illumina GenomeStudio Methylation Analysis Module v1.9.0、ならびにR scriptを用いて行った。

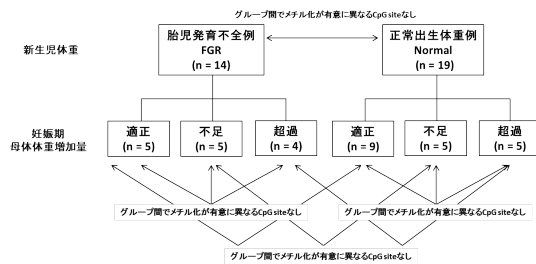
(4)本研究は、国立成育医療研究センター並びに北海道大学の倫理委員会の承認を得て、被験者への説明と被験者の同意のもとに行った。

## 4. 研究成果

(1)正常出生体重出産例と比較して、胎児発育遅延例の胎盤ゲノムDNA内で、有意に共通して変化するメチル化サイトは検出されなかった。したがって、特定の遺伝子領域のエピゲノム異常が胎児発育不全に関連しているとは考えられなかった。

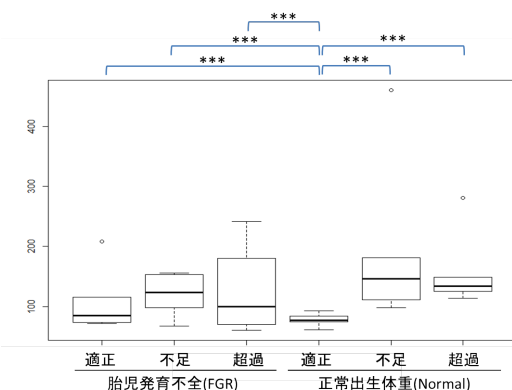
(2)次に、正常出生体重出産例の中でも、妊娠

期体重増加量別に設けた、適正群、不足群、超過群間で、有意に共通して変化するメチル化サイトの検出を試みたが、該当する領域は認められなかった。これは、胎児発育遅延例においても同様の結果であった。また、同じ妊娠期体重増加群に属する、正常出生体重出産例と胎児発育不全例の比較においても、該当する領域は検出されなかった。したがって、本解析サンプルでは、栄養状態に起因するエピゲノム異常のホットスポットは見つからなかった。



(3)そこで、本解析に用いた胎盤 33 例すべてを対象に、外れ値検定を行った。この解析により、各胎盤サンプルにおいて、他の 32 例に比べて有意にメチル化値が外れているシトシン DNA の場所と数を検出することができた。この数の頻度を各サンプルで算出し、群間の分布の特徴を見たところ、正常出生体重出産例内において、妊娠期体重増加量が適正であった群は、不足群、超過群に比べて、有意に外れ値を持つ頻度が低いことが明らかになった。また、胎児発育不全例では、どの妊娠期体重増加量の群に属していても、正常出生体重出産例適正群にくらべて、外れ値を持つ頻度が高くなっていることが明らかになった。

栄養状態別の外れ値出現頻度



正常体重出生児であっても、妊娠全期間の母体体重変化が適正範囲を外れると、胎盤エピゲノムに揺らぎが生じやすくなることを認めた。また、胎児発育不全例では、母体の体重変化だけではない要因がエピゲノム調節に揺らぎをもたらしている可能性が示唆された。

(4)次に、エピゲノム以上の揺らぎはどんな特徴を示すのか検討した。全体的に、高メチル

化外れ値を示すサイトのほうが、2345 か所と、低メチル化外れ値を示すサイトの 971 か所に比べて多かった。外れ値を示すシトシン DNA の位置に注目したところ、高メチル化外れ値を示すサイトは、その 75%が CpG アイランドに属しているのに対し、低メチル化サイトは 48%がアイランド外に属していた。また、高メチル化外れ値を示すサイトは同一検体内で 1 遺伝子上に複数認められるのに対し、低メチル化外れ値を示すサイトは、単発的に異常値を示す頻度が高いことが明らかになった。さらに、高メチル化外れ値を示すサイトは、CpG アイランドが多くみられる場所として知られる、遺伝子転写開始点付近に集積していることが明らかとなった。

これらの結果より、本来低メチル化に保たれているべき、CpG アイランドかつ転写開始点付近が高メチル化異常を示すことによって、遺伝子発現抑制を引き起こしている可能性が示唆された。また、栄養状態が適正から外れることにより、胎盤においてこの異常が蓄積されていくことが明らかとなった。

(5)これまで、本研究より多くの検体数を用いて、胎児発育不全例を対象に、胎盤エピゲノム以上のホットスポットを検出しようとした研究が海外より報告されている。しかし、結果として、そのような確定的なサイトは見つかっていない。本研究成果により、胎児発育不全例、並びに、胎児期の栄養状態は、ある特定の遺伝子領域のエピゲノム異常を引き起こすのではなく、エピゲノム調節異常を引き起こす頻度を左右する要因となる結論を導き出した。本研究のように、エピゲノム調節の揺らぎを数値化して示した解析手法並びに得られた研究成果は、これまでに報告がなく、新たな知見となると考えている。また、正常出生体重出産例であっても、子宮内環境に着目し、妊娠期体重増加量が不適切である場合の影響を検討した結果、エピゲノムレベルで、その影響が遺残する可能性が示唆された。

今後の研究の展望としては、今回胎盤を用いて得られた結果が、胎児においてどれだけ維持保存されているのかを明らかにすることである。ヒトを対象とした研究から得られる検体は限られているため、モデル動物を用いて各臓器における詳細な検討を進める必要もあるが、ヒト試料でこの解析法に基づく結論を得たいと考える。したがって、今後は胎盤と同時に臍帯血の DNA を対象に解析すると同時に、コホート研究として、新生児の追跡を行い、定期的な末梢血の採取を実施して、産後すぐに認められたエピゲノム異常がどれだけ遺残しているのか、実際に評価する必要があると考える。そのうえで、妊娠期の栄養状態、つまり、母体体重増加量に関して、胎児の生涯の健康維持も視点に入れた、DOHaD の観点からの指針作りに、結果を反映させることができると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

河合智子、妊娠期エネルギー摂取量と胎盤ゲノム DNA エピジェネティック変化、日本栄養改善学会、2013年9月12日~14日、神戸国際会議場

河合智子、妊娠期体重変化量と胎盤ゲノム DNA のエピジェネティック調節、日本DOHaD研究会、2013年6月7日~8日、厚生労働省戸山研究庁舎

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 智子 (KAWAI, Tomoko)

国立成育医療研究センター研究所周産期病態研究部・研究員

研究者番号：40423404

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：