

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461641

研究課題名(和文) 低出生体重児のストレス反応とグルココルチコイドレセプター遺伝子DNAメチル化解析

研究課題名(英文) DNA methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and stress response 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：極低出生体重児31名の臍帯血、退院後血でグルココルチコイド(GR)遺伝子プロモーター領域の8つのCpGのメチル化率と周産期、新生児期要因の関係を解析した。臍帯血のメチル化率の平均値およびCpG#209のメチル化率は在胎期間と負の相関を認めた。退院後血と臍帯血の同CpGのメチル化率の差は、平均値およびCpG#209、#205において在胎期間と有意な正の相関を認めた。出生前ステロイド投与例は非投与例にくらべ臍帯血CpG#206のメチル化率が有意に高率であった。早産であるほどストレス反応を制御するGR遺伝子の一部CpGのメチル化率が出生前に増加し、生後のストレス反応に影響している可能性が示唆された。

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). Genomic DNA was extracted from cord blood and neonatal blood collected after discharge in 31 VLBW infants. Methylation levels at 8 CpG sites in exon 1F of NR3C1 were analyzed and quantified using a pyrosequencing method. The mean methylation levels of 8 CpG sites in cord blood were negatively correlated to gestational age ($r = -0.432$, $p = 0.02$). The increase of methylation levels at CpG# 205 and #209 between neonatal blood and cord blood were positively correlated to gestational age. Methylation levels at any CpG sites measured in cord blood did not correlated with maternal smoking, or major maternal morbidities. Thus, smaller gestational age at birth was related to higher methylation levels of NR3C1, which controls cortisol stress response, and may affect to stress reactivity in later life.

研究分野：新生児医学 発達小児科学

キーワード：低出生体重児 ストレス反応 グルココルチコイド メチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) 低出生体重児における発達障害

日本の新生児医療の進歩に伴い早産・低出生体重児の救命率は向上し、生存児が増加するとともに、障害発症の増加が懸念されている。国内の各周産期施設や全国調査のフォローアップ研究により、脳性麻痺、重度の知的障害、失明、難聴、てんかんなどのいわゆる major handicap については、その病態やリスク因子が多く臨床・疫学研究から解明されてきている。しかし重篤な神経学的障害がない低出生体重児であっても、一般児に比べると「落ち着きがない」、「友達ができない」、「話がかみ合わない」、「不器用」など行動や感情の発達上での問題を生ずることが少なくない。低出生体重児の発達障害について、以前から注意欠陥多動性障害 (Attention Deficit/Hyperactivity Disorder、以下 ADHD) の割合が多いことが指摘されていたが、近年、米国の大規模調査により、自閉症スペクトラム障害 (Autism spectrum disorders、以下 ASD) の頻度も、一般人口に比べて高率であることが報告された (Pinto-Martin JA ら, Pediatrics, 2011)。

(2) 低出生体重児における ASD 発症に関わる環境要因としてのストレス反応

低出生体重児の ASD の発症メカニズムとして、遺伝的素因をもつ個体の脳の成熟過程における critical period に早産・低出生体重の出生に伴う環境要因が加わることが想定されている。動物実験では、母親ラットの子育て行動の減少により、グルココルチコイドレセプター (Glucocorticoid receptor, GR) 遺伝子プロモーターの DNA メチル化が増加し、ストレスに対する脆弱性を決定するという報告がなされた (Weaver ら, Nat Neurosci, 2004)。ヒトの場合、低出生体重児では、より小さく、早期に出生するほど未熟性と合併症のため、母子分離を余儀なくされ、痛みや不快を伴う集中治療が長期に必要な。このような環境は、高度のストレスを伴い、その反応として副腎 下垂体 視床下部 (HPA) アキシスの活性化がおこり、副腎からグルココルチコイドが (人では主にコルチゾール) が放出される。その後、上位中枢である海馬に negative feedback がおこり、コルチゾールの反応は抑制される (Huang L-T, Pediatr Res, 2011)。この HPA アキシスの活性化が続くと児のストレス反応を調節する適応が働き、GR 遺伝子 DNA メチル化の変容が起こり、遺伝子発現の不活性化によりストレス反応の脆弱化をもたらす、行動や感情の障害をきたすというメカニズムが推定される。これらのことから、低出生体重児における行動や感情の発達障害の発症に、新生児期からうけるストレスとその反応が続くことへの適応として、エピジェネティクスによる GR 遺伝子の DNA メチル化変化が関与するという仮説を立てた。

(3) 出生前、出生後の病態、生物環境要因と発達予後の関係

極低出生体重児の予後の観察研究において、3歳時で、多動、ADHD の疑い、ASD および ASD の疑いについて行動発達評価を行った結果、いずれかの項目に該当した割合は出生体重 1000g 未満で 13%、1000~1500g で 10% であった。6歳時では、専門医の確定診断のある割合は ADHD 1%、広汎性発達障害 5% であったが、疑い例や境界例をあわせると ADHD 15%、広汎性発達障害 12% と一般児より高率なことが明らかとなった。また、3歳での発達遅滞は、より小さい体重、早産であることそのものに加え、敗血症、慢性肺疾患などの合併症と有意に関連していた (Kono et al, Pediatr Int, 2011)。これらの結果とエピジェネティクスの理論から、早産低出生体重児の脳の成熟過程での、出生前後のライフイベントや出生後の疾患合併に伴うグルココルチコイドを介したストレス反応の変化のメカニズムの解析が、児の行動や感情の発達障害への影響を明らかにする上で必須と考えられた。

2. 研究の目的

低出生体重児における発達障害発症メカニズムの解析のひとつとして、NICU に入院した低出生体重児のストレス反応のバイオマーカーの経時変化と GR 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を検討することを目的とした。具体的には、1) 臍帯血および NICU 退院後初回採血の血液中の白血球 DNA を用いて、GR 遺伝子 (*NR3C1*) のプロモーター領域にある CpG island の DNA メチル化の解析を行った。2) GR 遺伝子 (*NR3C1*) の DNA メチル化率と他のストレスバイオマーカー、生物環境要因 (在胎期間、出生体重、NICU での合併症) を組み合わせ、NICU でのストレス反応と DNA メチル化率の関係を検討した。3) 1歳以降に視覚刺激テスト等により児の長期的なストレス反応の評価を行い、DNA メチル化率との関連を明らかにすることを目的とした。

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同院の NICU に入院した、在胎 32 週未満または出生体重 1500g 未満の極低出生体重児とした。NICU 入院 ~ 退院初回外来受診時まで保護者に研究の説明を行い、同意取得できた例について試料、情報の取得を行った。

対象の、妊娠中の経過、母体へのステロイドを含めた投与薬物、在胎期間、出生体重、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) についての情報を経時的に取得した。

(2) 試料の収集と保存

出生時の臍帯血(2 ml)と NICU 退院後初回採血時(以下、退院後血)に血液(2 ml)を採取した。採取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 で保存した。退院後初回採血時まで研究参加への同意が得られた例を対象として解析に使用した。

(3) ヒト GR 遺伝子(NR3C1)の DNA メチル化解析

ヒト GR 遺伝子(NR3C1)の exon 1 F 領域を含む CpG islands の DNA メチル化を、バイサルファイトシーケンスによって定量化を行った。この領域は Weaver ら(Nat Neurosci, 2004)が報告したラットの母親の子育て行動の減少と DNA メチル化が関連した GR 遺伝子(Nr3c1)と相同とされている。具体的には、バ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 により精製しシーケンスを行った。2 つのシーケンス primer を用いて 15 の CpG サイト(202~216)の DNA メチル化を測定した。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を得た。

4. 研究成果

(1) 対象

保護者から同意の取得できた 31 名の臍帯血および退院後血の試料を用いて NR3C1 メチル化の測定、解析をおこなった。対象の生物学的/周産期背景を表 1 に、新生児合併症を表 2 に示した。全例の児が生存退院した。

表 1 対象の背景

	平均	95%信頼区間
出生体重(g)	1015	878 - 1152
在胎期間(w)	28.7	27.8 - 29.6
出生体重 SD スコア	-1.14	-1.67 - -0.67
母年齢(y)	33.9	31.9 - 35.8
	N	%
児の性別: 男	16	51.6%
多胎	5	16.1%
出生前ステロイド投与	20	64.5%
NRFS	15	48.4%
母体合併症		
精神疾患	0	
喫煙	6	19.3%
妊娠高血圧腎症	12	38.7%
切迫早産	12	38.7%

絨毛膜羊膜炎	7	22.6%
胎盤早期剥離	4	12.9%

表 2 新生児合併症

	平均	95%信頼区間
Apgar 5 分値	7.3	6.7 - 7.9
人工呼吸日数	35.9	24.6 - 47.2
酸素投与日数	68.6	51.2 - 85.9
退院時日齢	101	85 - 119
退院時体重	2489	2361 - 2617
	N	%
RDS	28	90.3%
CLD	21	67.6%
晩期循環不全	7	22.6%
NEC/消化管穿孔	3	49.7%
IVH	2	6.5%
PVL	1	3.2%
ROP	4	12.9%
昇圧剤投与	20	64.5%
人工呼吸管理	28	90.3%
ステロイド投与	17	54.8%
甲状腺ホルモン投与	5	16.1%

(2) 臍帯血および退院後血の NR3C1 遺伝子 Exon 1F promoter 領域(-3492 ~ -3082)の CpG メチル化率

退院後血は、平均生後 153 日、範囲 56 ~ 321 日に採取された。平均修正在胎期間 50.9 週、範囲 40.1 ~ 69.9 週に相当した。

NR3C1 遺伝子の ADS749FS については、臍帯血、退院後血ともに、全例でメチル化率の測定感度以下であった。そのため ADS2386FS に存在する 8 つの CpG サイト(#202-#209)についてメチル化率と周産期、新生児期要因の関係を解析した。ADS2386FS の CpG サイトのメチル化率を表 3 に示した。いずれの CpG においても同一症例の臍帯血と退院後血のメチル化率に有意差を認めなかった。

表 3 NR3C1 CpG メチル化率

	臍帯血		退院後血	
	平均	95%信頼区間	平均	95%信頼区間
#209	0.91	0.74 - 1.09	0.86	0.67 - 1.05
#208	1.79	1.63 - 1.94	1.67	1.44 - 1.88
#207	0.52	0.34 - 0.70	0.48	0.29 - 0.67
#206	0.66	0.43 - 0.89	0.49	0.30 - 0.68
#205	1.16	0.94 - 1.38	0.97	0.75 - 1.19
#204	0.16	0.02 - 0.30	0.21	0.04 - 0.38
#203	0.48	0.28 - 0.68	0.58	0.34 - 0.82
#202	0.07	-0.07 - 0.20	0.58	0.34 - 0.82
Total	0.39	0.34 - 0.43	0.35	0.28 - 0.42

(3) ADS2386FS の CpG サイトのメチル化率と周産期・新生児期要因等の関連

在胎期間、出生体重との関連

臍帯血の測定したすべての CpG のメチル化率の平均は在胎期間と負の相関 ($r=-0.432$, $p=0.02$) を認めた。CpG#209 のメチル化率も在胎期間と負の相関(相関係数 -0.36 , $p=0.047$) を認めた。退院後血と臍帯血の同部位のメチル化率も在胎期間と負の相関(相関係数 -0.36 , $p=0.047$) を認めた。

ル化率の増減（メチル化率）は、測定したすべてのCpGの平均値、およびCpG#209、#205において、在胎期間と有意な正の相関を認めた。すなわち、より早産であるほど出生時のグルココルチコイドレセプターのメチル化率が高いことが示唆された。更に、出生からNICU退院までの間のメチル化率の増加は、より早産であるほど大きいことが示唆された。

出生体重と退院後血のCpG#206のメチル化率は有意な弱い正の相関を認め、メチル化率の平均およびCpG#206、#205のメチル化率と有意な弱い正の相関を認めた。すなわち、より出生体重が小さいほどCpG#206、#205のメチル化率は出生から退院までの増加が大きいことが示唆された。

母体合併症・出生前ステロイド使用との関連

母体の喫煙、妊娠高血圧腎症、切迫早産、絨毛膜羊膜炎、胎盤早期剥離の合併症の有無によりADS2386FSのCpGサイトのメチル化率に有意差を認めなかった。出生前ステロイド投与有り群は投与なし群と比較し、臍帯血CpG#206のメチル化率が有意に高率であった。そのほかのCpG、退院後血のすべてのCpGのメチル化率、およびすべてのCpGのメチル化率に有意差は認めなかった。

新生児合併症、ステロイド投与との関連

新生児合併症のうち、RDS、CLD、ROP、IVH、PVL、NEC/消化管穿孔の有無により臍帯血、退院後採血のすべてのCpGのメチル化率、メチル化率に有意差を認めなかった。しかし、晚期循環不全（ステロイド治療を要する）有り群はなし群とくらべ、臍帯血CpG#206および#205のメチル化率が有意に高率、退院後血のCpG#206のメチル化率が有意に低率で、CpG#206および#205のメチル化率が有意に低値であった。

児へステロイド投与有り群は、臍帯血CpG#206および#205のメチル化率が有意に高率、退院後血のCpGに有意差は認めなかったが、CpG#206および#205のメチル化率が有意に低値であった。

(4) 考察と今後の展開

今回の結果から、臍帯血のNR3C1遺伝子Exon 1F promoter領域の一部のCpGのメチル化率は在胎期間と関連することが明らかとなった。より早産であるほど出生前に大きなストレスが生じ、ストレス反応を制御するグルココルチコイドレセプター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。出生前ステロイド投与群も臍帯血CpG#206のメチル化率が増加しており、同様にストレス反応を制御する方向に働いていると考えられた。一方、出生後の児へのステロイド投与群は、臍帯血CpG#205、#206のメチル化率が増加していたが、退院後血では有意差を認めなかったことから、NR3C1遺伝子は主として出生前のメチル化により制御を受けているのではないかと考えられた。

今回、NR3C1遺伝子Exon 1F promoter領域のADS749FSのCpGサイトのメチル化率はすべてのCpGにおいて測定値が低値であり、測定感度の問題があることが考えられた。

今後、対象とした児のストレス反応について、ストレス負荷時の唾液中のコルチゾール値の測定、質問紙法や診察による行動評価により、今回測定したメチル化率との関連を調べることにより、早産低出生体重児のストレス反応、行動発達とNR3C1遺伝子DNAメチル化の関係が明らかになると考えられる。

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5件）

- Kono Y, Yonemoto N, Kusuda S, et al., Developmental assessment of VLBW infants at 18 months of age: a comparison study between KSPD and Bayley III, 査読有, Brain Dev 38, 2016, 377-385, DOI: 10.1016/j.braindev.2015.10.010.
- Miyazaki K, Furuhashi M, Kono Y, et al., Long-term outcomes of antenatal corticosteroids treatment in very preterm infants after chorioamnionitis, 査読有, Arch Gynecol Obstet, 2015, 29, 1239-46
DOI:10.1007/s00404-015-3762-6
- Ishikawa H, Miyazaki K, Kono Y, et al., The effects of antenatal corticosteroids on short- and long-term outcomes in small-for-gestational-age infants. Int J Med Sci, 査読有, 2015, 12, 295-300, DOI:10.7150/ijms.11523.
- 河野由美, 早産・低出生体重児の発達障害, 医学のあゆみ, 査読無, 2017, 260, 231-236, <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=aa7ayuma/2017/026003/008&name=0231-0236j&UserID=203.180.97.18>
- Kono Y, Yonemoto N, Nakanishi H, et al., Changes in survival and neuro-developmental outcomes of infants born at <25 weeks' gestation: a retrospective observational study in tertiary centres in Japan. BMJ Paediatr Open. 査読有, 2018, 2, e000211, DOI: 10.1136/bmjpo-2017-000211.

〔学会発表〕（計3件）

- 河野由美, 超早産児の予後, 日本小児科学会学術集会, 2015年
- Kono Y, Trends of neuro-developmental outcomes of extremely preterm infants: a retrospective observational study in tertiary centers in Japan, Hot Topics in Neonatology, 2016年
- Kono Y, Changes in survival and

neurodevelopmental outcomes of infants
born at <25 weeks gestation: a
retrospective observational study in
tertiary centers in Japan、PAS meeting、
2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等(計0件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

神保 恵理子 (JINBO, Eriko)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：20291651

鈴木 由芽 (SUZUKI, Yume)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：40458302

俣野 美雪 (MATANO, Miyuki)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：90458315

(4) 研究協力者