

令和元年6月5日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09707

研究課題名(和文) 周産期における母児エピゲノムの体系的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of maternal and fetal epigenetic changes during perinatal period

研究代表者

宮坂 尚幸 (miyasaka, naoyuki)

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：70313252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中の母体および胎児のエピゲノム変化、およびその環境因子との関連性を検討した。妊娠中期の母体脂質代謝関連遺伝子(CPT1A、SREBF1)は、肥満形質におけるエピゲノム変化と類似していた。一方、妊娠中のメチル化レベルの変化は、このような代謝変化以外にも免疫細胞組成が影響することが明らかとなった。臍帯血のADHD関連遺伝子(SKI)のメチル化は、妊娠初期に母体が摂取したたんぱく質エネルギー量と関連することが示された。また、母体血中のmiRNAのエクソソーム内発現レベルは胎児胎盤重量比と関連しており、胎児胎盤機能のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠中の母体環境が胎児の遺伝子発現調節を修飾し、将来の慢性疾患の要因となること(Developmental Origin of Health and Disease, DOHaD)が注目されている。本研究では、妊娠中の母体栄養摂取や精神状態などの環境因子、母体血、臍帯血のエピゲノム関連因子を測定し、そのメカニズムを検討した。妊娠中の脂質代謝は肥満のそれと類似しているが、代謝変化以外にも細胞組成の影響を受けること、妊娠初期に母体が摂取したたんぱく質エネルギー比が注意欠陥多動性障害関連遺伝子に影響すること、母体血中の循環しているマイクロRNAが胎児胎盤機能の指標となることなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have studied the maternal and fetal epigenetic changes during pregnancy using peripheral blood samples, and their association with the maternal environmental factors. Maternal epigenetic changes in lipid metabolism genes (CPT1A and SREBF1) during mid-gestation was similar to those reported in obese women. On the other hand, dynamic changes in methylation levels during pregnancy was affected by not only these metabolic changes but also differences in peripheral leukocyte population. Methylation in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) associated gene (SKI) in cord blood was correlated with protein/energy ratio of the dietary intake in early pregnancy. This finding might be useful for the prevention of ADHD. Finally, circulating exosomal micro RNA level was associated with fetal/placental weight ratio, which indicated that micro RNA might be a biomarker of fetoplacental function and fetal growth.

研究分野：周産期医学

キーワード：DOHaD エピゲノム 注意欠陥多動性障害 白血球組成 マイクロRNA 慢性疾患

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

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた本邦において、生活習慣病などの慢性疾患を個別に予防する先制医療の実現は喫緊の課題である。近年、胎児期を含む出生前環境が胎児のエピゲノム変化をもたらし、これが将来の生活習慣病発症に大きく影響するという成人病胎児起源 (DOHaD) 仮説が注目されている。しかし、日本人コホートにおいて、どのような母体環境が、胎児にどのようなエピゲノム変化を引き起こし、それがどのような相互作用により生活習慣病発症のリスク因子になるかについてのデータは集積されていない。また妊娠は母体にとってはある種のストレステストであると考えられており、妊娠糖尿病や妊娠高血圧症候群を発症した女性が将来 2 型糖尿病や慢性腎疾患を発症する確率が高いことはよく知られた事実である。しかしながら妊娠が母体のエピゲノムに及ぼす影響に関しては明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究は先制医療実現を最終目的として、日本人を対象とした母子コホートを立ち上げ、母胎環境要因と胎児、新生児、妊娠女性のエピゲノム変化との関連性を明らかにすることを第 1 の目的とし、妊娠が母体の健康およびエピゲノムにもたらす影響、また母体の栄養や種々のストレス、生活環境を含めた健康状態が胎児 (胎盤) 新生児のエピゲノムに与える影響を体系的に調査する。妊娠期および胎児期のエピゲノム変化に関係する要因を同定することにより、将来の生活習慣病の発症リスクの予測、さらには低減が可能となり、予防医学の観点からも社会的意義が大きいと考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究では出生前コホートを新規に立ち上げ、当施設にて分娩予定で、産後の調査も可能と判断された妊娠初期症例を対象に、必要な情報を収集しながら前方視的に追跡する体制を確立し、研究参加者のリクルートを行なった。周産期外来における母体、胎児、新生児の診療情報収集はもとより、フードダイアリーを用いた妊娠中の食事調査、成育歴調査、睡眠調査、妊娠初期・後期・産褥期のメンタルヘルス、ストレス調査を実施してデータを集積し、専門の研究協力者と共に解析を行なった。

また妊娠初期・後期の母体血、臍帯血を収集し、血清および血液 DNA を取得した。生後 5 日目に新生児採血の際、ごく少量の血液の乾燥標本 (Dried blood spot) を取得した。これらの生体試料を用いて、血中脂質等の濃度測定、血清無細胞性 miRNA レベルの測定、DNA メチル化レベルの定量解析を行なった。

さらに乳児健診で母子手帳に記載された児の身長、体重、頭囲などを追跡調査した。

### 4. 研究成果

本研究は母児を前向きに長期追跡するコホート研究であり、研究内容の説明と同意の取得、多岐にわたる情報の管理と解析、採取された検体の管理と分析など、研究計画が複雑であることから、遂行にあたり多くの懸念があったが、各部署の協力と研究参加者の献身的な努力により、一連の研究実施方法が確立され効率的に運用することが可能となった。研究参加者は 100 名を超え、同意取得率は 60% 以上であり、また研究参加者からの情報収集、生体試料採取は問題なく実施することができた。産後も子育てに関するニュースレターなどを郵送して研究参加者との関わりを継続することで、母体の産後の経過や母乳育児の実態、児の発達育データの収集もこれまで順調に行われ、追跡は現在継続中である。

妊娠が進行するにつれて母親の体内環境は劇的に変化する。妊娠中期までは体重を増加させ母体内にエネルギーを蓄える同化が優位なのに対し、妊娠後期では急速な胎児成長のためにエネルギーを産生する異化が優位となり、さらにインスリン抵抗性を呈する。特に妊娠中期から後期にかけて脂質代謝は大きく変化する。妊娠には肥満と一部共通する点があるものの、エピゲノムに与える影響は妊娠経過に伴い変化していくことが予想された。そこで、本研究では、Epigenome-wide association study (EWAS) によって肥満形質関連 CpG と同定されたカルニチンパルミトイル基転移酵素 1A 遺伝子 (*CPT1A*) およびステロール調節配列結合蛋白遺伝子 (*SREBF1*) のイントロン部位に着目し、妊娠経過に伴いそのメチル化状態がどのように変化するかを明らかにした。その結果、妊娠中期においては肥満形質と DNA メチル化状態との関連は EWAS で示された関係とほぼ一致した。これに対し、妊娠後期においては、肥満形質と DNA メチル化状態との関係は弱められたが、唯一 *CPT1A* のメチル化と BMI の関係が逆に強められた。*CPT1A* のメチル化は白血球の組成によって影響を受けるため、我々は細胞タイプ特異的メチル化マーカーを用いて、白血球組成を推定した。その結果、白血球組成の妊娠経過に伴う変化が妊娠前 BMI と関連することがわかり、さらに *CPT1A* のメチル化と BMI の関係が後期に見かけ上強められたのは、白血球組成の変化を介したものであることがわかった。このように末梢血 DNA の脂質代謝関連遺伝子 (*CPT1A*, *SREBF1*) の DNA メチル化状態の妊娠進行に伴う変化を、代謝変化と免疫細胞

変化による影響で説明できることを明らかにした。

また、候補遺伝子の DNA メチル化解析において、白血球の細胞組成をメチル化データから推定し、細胞組成の違いの影響を除外して、環境要因と DNA メチル化レベルの関係を解析する我々が確立した方法を、新生児の DNA メチル化データにも応用し、臍帯血 DNA メチル化個人差に母親の食事がどのように影響するのかも予備的に解析した。モデル領域として、ALSPAC 研究で明らかにされた注意欠陥多動性障害 (Attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD) 発症と関連するとされた Sloan-Kettering Institute 癌原遺伝子 (SKI) のメチル化部位を解析した。その結果、妊娠初期の母親の食事において、タンパク質エネルギー比と SKI 遺伝子のメチル化には正の相関があることを見出している。ADHD リスクが高いほどこの領域のメチル化レベルが低いことが報告されているため、妊婦の摂取するタンパク質の割合がもし疾患発症と関係するのであれば、疾患予防に重要な知見を提供する可能性がある。現在、サンプルサイズを増やし、さらに検証を進めている。

さらに、妊婦の血清の無細胞性 RNA の動態については、近年胎児の発生発達にしたがって胎盤由来、胎児由来の RNA が母血中に出現することが明らかにされ、妊娠経過のモニタリングに有用ではないかと考えられている。我々は血清の無細胞性 miRNA と、さらに血清エクソソーム内 miRNA の両方の発現解析を進めたところ、予備的に一部の miRNA のエクソソーム内発現レベルが胎児胎盤重量比 (Fetal /placental weight ratio; F/P ratio) と関連している可能性を見出した。F/P ratio は胎盤機能不全や周産期死亡との関連があるとされており、今回解析したエクソソーム miRNA が周産期合併症の予知や胎児発育の評価として重要なマーカーとなる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Pavethynath S, Imai C, Jin X, Hichiwa N, Takimoto H, Okamitsu M, Tarui I, Aoyama T, Yago S, Fudono A, Muramatsu M, Miyasaka N, Sato N. Metabolic and Immunological Shifts during Mid-to-Late Gestation Influence Maternal Blood Methylation of CPT1A and SREBF1. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 1;20(5). pii: E1066. DOI:10.3390/ijms20051066 (査読あり)
2. Udagawa S, Katagiri S, Maekawa S, Takeuchi Y, Komazaki R, Ohtsu A, Sasaki N, Shiba T, Watanabe K, Ishihara K, Sato N, Miyasaka N, Izumi Y. Effect of Porphyromonas gingivalis infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight. *Acta Odontol Scand*. 2018 Aug;76(6):433-441. doi:10.1080/00016357.2018.1426876. (査読あり)
3. Komazaki R, Katagiri S, Takahashi H, Maekawa S, Shiba T, Takeuchi Y, Kitajima Y, Ohtsu A, Udagawa S, Sasaki N, Watanabe K, Sato N, Miyasaka N, Eguchi Y, Anzai K, Izumi Y. Periodontal pathogenic bacteria, Aggregatibacter actinomycetemcomitans affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. *Sci Rep*. 2017 Oct 24;7(1):13950. doi:10.1038/s41598-017-14260-9. (査読あり)
4. Sato N, Sudo K, Mori M, Imai C, Muramatsu M, Sugimoto M. Early gestational maternal low-protein diet diminishes hepatic response to fasting in young adult male mice. *Sci Rep*. 2017 Aug 29;7(1):9812. doi: 10.1038/s41598-017-10380-4. (査読あり)
5. 宮坂尚幸. 将来に備えて胎児環境を整える-DOHaD を学ぼう. 産婦人科の実際, 2017, 66, 942 (査読なし)
6. 佐藤憲子. DOHaD の基礎: DOHaD の分子機構. 産婦人科の実際, 2017, 66, 959-966 (査読なし)
7. 瀧本秀美. DOHaD の臨床(胎児): わが国における妊婦の栄養摂取の現状. 2017, 66, 979-986 (査読なし)

### 〔学会発表〕(計 9 件)

不殿絢子 他、Trimester specific difference in exosomal microRNA expression、第 71 回日本産科婦人科学会学術講演会、2019  
Shilpa Pavethynath 他、妊娠後半期の末梢血における脂質関連遺伝子の DNA メチル化、第 73 回日本栄養・食糧学会大会、2019  
金昕 他、妊娠による炎症関連遺伝子 TNF の Gene body 領域 DNA メチル化状態の変化、第 7 回 DOHaD 学会、2018  
飛知和尚美 他、新生児における SKI 遺伝子 ADHD 関連部位の DNA メチル化個人差、第 41 回日本分子生物学会、2018  
Noriko Sato, et al. Study design: the evaluation of interindividual differences in neonatal epigenome - the BC-GENIST project. The 21st international Epidemiological Association World Congress of Epidemiology, 2017.

Hidemi Takimoto, et al. Dietary intakes from 3-day weighed dietary records among pregnant participants in the Birth Cohort - Gene and ENvironment Interaction Study of TMDU (BC-GENIST) The 21st international Epidemiological Association World Congress of Epidemiology, 2017.

今井千裕 他、妊娠中の環境要因が影響するエピゲノム変化と母児の健康指標との関連-BC-GENIST-, 第6回 DOHaD 学会, 2017.

岡光基子 他、包括的出生前コホート-母親のメンタルヘルスとその関連要因-, 第14回日本周産期メンタルヘルス学会, 2016.

佐藤憲子 他、Cohort profile: Birth Cohort- Gene and Environment Interaction Study of TMDU (BC-GENIST)、第5回 DOHaD 学会, 2016.

〔その他〕

東京医科歯科大学 先制医療実現化 DOHaD 研究プロジェクト ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/ppepi/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。