

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16202

研究課題名(和文) ヒト胎児組織のエピゲノム変化を伴う、ハイリスク・妊娠中マクロ複合環境要因の同定

研究課題名(英文) Identification of environmental factors associated with epigenetic change in human fetal tissues during pregnancy

研究代表者

宮宗 秀伸 (Hidenobu, Miyaso)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：80422252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

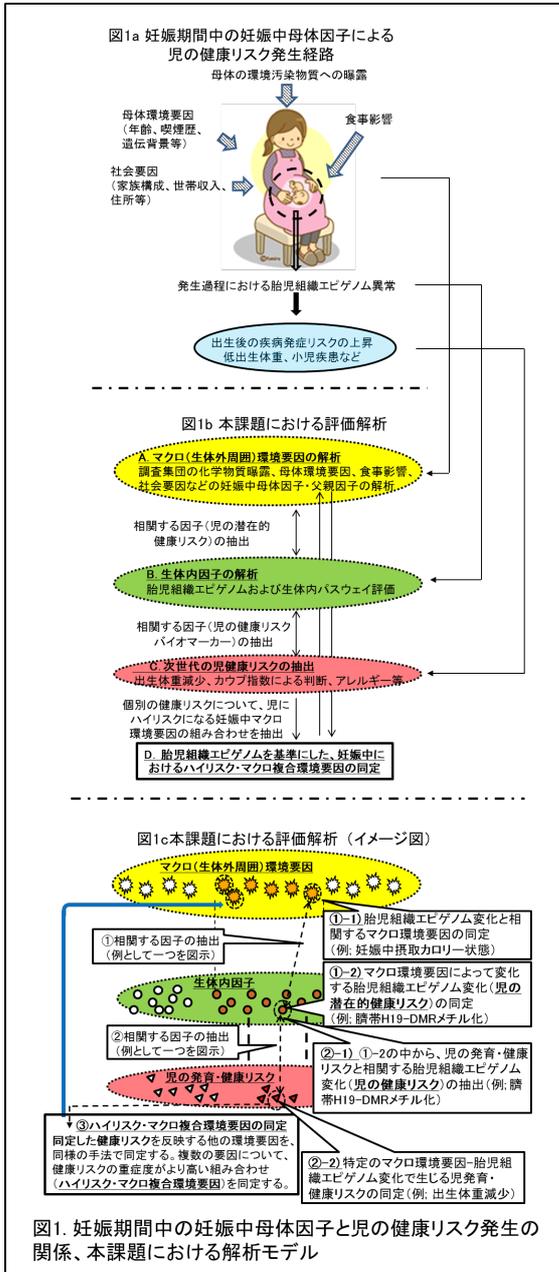
研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒトの妊娠初期から出産時までの母親の環境要因と胎児組織としての臍帯のメチル化変動の関係、ならびに関係する児の健康影響を評価する試みである。本解析は約100名の被検者に対して、出生時の児の頭囲の低値と関係し得る、臍帯のH19遺伝子におけるdifferentially methylated region (H19-DMR) のメチル化状態、さらにH19-DMRのメチル化に影響をおよぼし得る妊娠初期の母体のカロリー摂取量を評価した。さらに妊娠中低栄養と児組織メチル化の関係を解析するための、妊娠中低栄養誘導のモデルマウスを作成、複数の臓器を採取し、保存するに至った。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to evaluate the relationship between the environmental factors in pregnant women and the methylation level in umbilical cord and the health effects on newborns. One hundred specimens were subjected to this study. This study evaluated that the methylation level of H19 differentially methylated region (H19-DMR) in umbilical cords which was associated with lower head circumference of newborn. In addition, amount of calorie intake which was associated with decrease of methylation level of H19-DMR in umbilical cord was analyzed. To evaluate the relationship between the low calorie intake during pregnancy and the change of methylation level in fetal tissues, animal models were made, several tissue samples were collected from model mice, and stocked.

研究分野：発生学 環境医学

キーワード：メチル化 臍帯 出生コホート 母体環境要因

1. 研究開始当初の背景



エピゲノムとはゲノム DNA のメチル化など、
遺伝子配列の変化なしにその発現量を制御
するためのゲノムの修飾状態を指す。近年の
研究は、エピゲノム状態の変化と疾患の関連
性を示しており、またエピゲノム状態の変化
は様々な要因で引き起こされることを示唆
している(図 1a)。例えばヒト妊婦母体血や
妊娠中胎児血である臍帯血、胎児由来組織で
ある臍帯(へその緒)において、ポリ塩化ビ
フェニル (polychlorinated biphenyls,
PCBs) などの残留性環境汚染物質が検出され
ることが報告されている (Kawashiro et al.
2008) が、いくつかの研究はこれらの汚染物
質はエピゲノム状態に変化を引き起こすこ

とを指摘している。申請者もこれまでに、胎
児期新生児期マウスに残留性環境汚染物質
を曝露した場合、エピジェネティクス (=エ
ピゲノム状態を制御するための機構) に変化
が生じることを明らかにしてきた (Miyaso et
al. 2014)。これらの結果は、現代日本人胎
児は発生過程の母体内環境中においてエピ
ゲノムやエピジェネティクスに変化を起こ
しうる汚染物質に晒されていることを示し
ている。申請者は最近ヒト臍帯で、がん抑
制遺伝子 H19 の differentially methylated
region (H19-DMR) のメチル化が、妊娠中の
カロリー摂取不足により有意に減少するこ
とを同定した。低レベル H19-DMR メチル化は、
臍帯の横断面積肥大化や組織像変化を伴い、
さらに児の出生体重や頭圍の減少と関係し
ていた。これらは、化学物質曝露に加えて、
妊婦がおかれる様々な環境要因もまた、ヒト
胎児組織のメチル化や組織像に変化を生じ
ること、胎児組織のこのような変化は児の出
生体重減少や、その他様々な健康被害と相関
する可能性があることを示しており、詳細な
調査が急がれる。

2. 研究の目的

本課題ではヒトにおいて、A. 妊娠中の妊婦
がおかれるマクロ(生体外周囲)環境要因を
解析(マクロ環境要因の解析)、B. 胎児組織
のゲノム DNA メチル化を網羅的に解析(生体
内因子の解析)、さらに C. 児の出生体重を含
む身体測定値および発育・健康状態を評価す
る(次世代の児健康リスク抽出)。これらか
ら、H19 のように児の出生体重減少に相関し
て、またはその他様々な児の健康リスクに相
関して DNA メチル化変動を生じる遺伝子と、
そのようなメチル化変動を引き起こすマク
ロ環境要因を抽出する。さらに本研究で同定
した様々な「児健康リスク」に対して抽出し
た複数のマクロ環境要因・メチル化変動遺
伝子の解析によって、D. 健康被害が大きくな
るような複合的な妊娠中マクロ環境要因を
同定する(胎児組織エピゲノムを指標にした
ハイスリスク・妊娠中マクロ複合環境要因の
同定)(図 1b、c)。

3. 研究の方法

平成28年度

* 研究全体の概略、質問票および生体試料採

取時期の概略については図2を参照

1)A. マクロ（生体外周囲）環境要因の解析
妊娠中の様々な環境要因が児の健康リスクを引き起こす可能性が報告されているが、詳細は明らかになっていない。本項目では母体がおかれる妊娠中環境要因を分析するために、以下を行う。

A1 妊娠中母体因子としての、母体中PCBs および環境化学物質蓄積量の測定（図2. の部分）

代表者が参加するコホート調査で得られた母体血、臍帯血中に残留するPCBs等の環境化学物質をガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）を用いて計測する（既に、解析が進行中である）。

A2 その他妊娠中母体因子としての、母体環境要因、社会要因、栄養状態の評価（図2. の部分）

コホート調査において作成した質問票から、調査集団について、妊娠初期（妊娠12週付近）、後期（妊娠32週付近）、入院中（分娩前）、産後の各調査時期における母体環境要因（喫煙の有無、生活習慣、運動習慣、持病の有無、居住地域環境など）を評価する。また社会要因においては、健康への影響が指摘される社会経済状況（SES: Socio Economic Status）として、世帯等所得、教育歴などを評価し、必要であればその後のモデルにおいて調整する。

栄養状態は妊娠初期、後期、産後1ヶ月、4ヶ月時点で、簡易型自記式食事歴法質問票（brief-type self-administered diet history

questionnaire、BDHQ）により評価する。A1とA2によって、各調査対象における環境要因由来のリスクを評価する。

2) B. 生体内因子の解析（図2. の部分）

胎児組織のゲノムDNAメチル化の変動は児の健康に影響することが報告されており、さらに喫煙などいくつかの妊娠中母体環境要因によってメチル化の変動が生じること明らかにされているが、詳細はよくわかっていない。本項目ではこのようなメチル化変動を明らかにするため、胎児組織（臍帯および臍帯血細胞）についてゲノムDNAメチル化の網羅的解析を行う。臍帯組織ゲノムDNAは、凍結保存された臍帯0.1gから、MACHEREY-NAGEL社のNucleoSpin Tissue kitを用いて抽出する。臍帯血ゲノムは、産後採取された臍帯血から定法に従って分離後保存された白血球細胞（単核球細胞）を用いて同様に抽出する。抽出したゲノムについてアガロース電気泳動に

よる精製度確認、およびQuantiFluor™ dsDNA System（Promega社）による2本鎖DNA濃度測定を実施した後、500ng分をZYMO research社のEZ DNA Methylation Kitを用いてバイサルファイト（BS）処理を行う。BS処理済みゲノムDNAについて、イルミナ社のiScanシステムおよびメチル化チップ（Infinium HD HumanMethylation450）を用いて、約48,000箇所のCpGメチル化レベルを網羅的に評価する。局所的・詳細なメチル化レベルの解析には、高解像度融解曲線分析（High Resolution Melting analysis, HRM分析）、pyro-sequencingを用いる。HRM法には、上記同様にBS処理したDNAを用いる。

Pyro-sequencingには、同様に抽出したゲノムDNA 1μg分をBS処理したものをを用いる。これによって、妊娠中マクロ環境要因から引き起こされ、さらに児の健康リスクとなるような、胎児組織におけるメチル化変動の部位および対象となる遺伝子群を同定する（図2. および）。我々は予備検討としてメチル化チップ、HRM pyro-sequencingによる解析を既に実施しており、調査集団の一部について、既に解析結果を得ている。

3) A×B AB. 児の潜在的健康リスクの抽出（図2. の部分）

AとBの結果から、PCBsや環境汚染物質の蓄積量と相関してメチル化が変動（=児の潜在的健康リスク）する遺伝子を、クラスタリングを始めとした多変量解析によって同定する。さらに、健康リスクとなる可能性のある既報の要因（両親の年齢や低栄養）を中心に、その他妊娠中マクロ環境要因（母体環境要因、食事影響、社会要因など）と相関してメチル化が変動（=同じく児の潜在的健康リスク）する遺伝子を同定する。これらの遺伝子を、児の潜在的健康リスクバイオマーカーとする。既に代表者は、妊娠初期の妊婦のカロリー摂取不足が臍帯のH19-DMRメチル化を有意に減少させることを同定している。

平成29年度（その他、平成28年度の解析の残りを継続する）

4) C. 次世代の児健康リスク抽出（図2. の部分）

胎児組織ゲノムDNAメチル化変動と児の健康リスクの関係

が一部報告されているが、詳細は明らかになっていない。本項目では調査集団における児の健康状態を評価するために、出生時の診療カルテ情報、児の検診、健康診断の結果を評価し、児の出生体重等の身体測定値、生後の

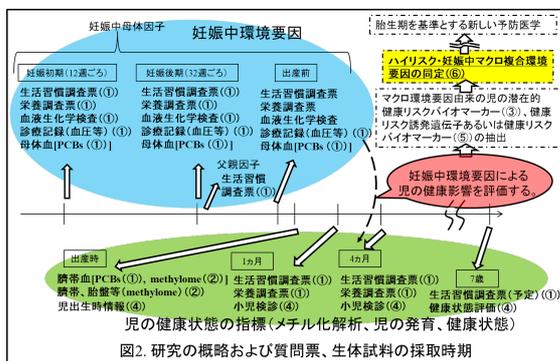
発育や健康状態、小児疾病などにおけるリスクを抽出する。

5) C×AB ABC. マクロ環境要因由来の胎児組織メチル化変化に伴う次世代の健康リスクの同定(図2. の部分)

C とAB の結果から、児の潜在的健康リスクバイオマーカーの中から、出生体重減少など児の健康状態と相関してメチル化が変動(=児の健康リスク)する遺伝子(児の健康リスク誘発遺伝子、または健康リスクバイオマーカー)を、多変量解析などの手法を用いて同定する。例として代表者はこれまでに、妊娠中のカロリー摂取不足が引き起こす臍帯におけるH19-DMRメチル化レベル減少が、出生体重および頭囲の減少に関係することを同定している。重要と思われるマクロ環境要因と胎児組織メチル化変化について、動物実験によって再現性を確認する。

6) D. 胎児組織エピゲノムを指標にしたハイリスク・妊娠中マクロ複合環境要因の同定(図2. の部分)

1)~5)から、本研究で同定した様々な「児健康リスク」に対して、各々複数のマクロ環境要因・メチル化変動遺伝子が抽出されることが期待出来る。ここで、抽出された複数の遺伝子でメチル化変動が同時に生じた場合、そうでない場合と比較して、著しい児健康リスクを生じる可能性がある(出生体重の顕著な減少など)。本項目ではそのようなリスク抽出のため、複数の遺伝子の複合的なメチル化変動を有する児とそうでない児のグループの間で健康影響を比較し、より重篤な児健康影響をおよぼすメチル化変動の組み合わせと、それらを誘導するマクロ環境要因の組み合わせ(ハイリスク・妊娠中マクロ複合環境要因)を同定する。比較には臍帯の組織像解析を併用する。臍帯は胎児期に児と直接接続されており、組織像の変化は児のリスクを評価する一助になると思われる。



4. 研究成果

平成 28 年度は研究計画に従い、マクロ環境要因(すなわち今回の場合、日本人妊婦における年齢、喫煙の有無、出産回数、栄養摂取状態、世帯収入、学歴などを含む母体の環境要因)と生体内因子(すなわち今回の場合、胎児由来組織とされる臍帯のメチル化状態)の評価を行った。その他、母児に関する情報として、病院における診療記録が用いられた。「千葉大出生コホート(Chiba Study of Mother and Children's Health)」において調査同意を得た参加者のうちおよそ 100 名を対象として評価が行われた。その結果、1) 臍帯における H19 遺伝子の differentially methylated region (H19-DMR) のメチル化率が 50%未満の場合、出生時の児の頭囲がより低値であったこと、2) 妊娠初期の母親の一日当たりの栄養摂取量が 1000kcal 未満の場合には、臍帯の H19-DMR におけるメチル化率が有意に低値であったことが示された。さらに 3) 母体の加齢は、臍帯の H19-DMR におけるメチル化率と負の相関がある可能性が明らかになった。以上のことから、臍帯におけるメチル化の変動は出生時の児の状態と関係すること。さらにこのようなメチル化の変動は妊娠中の母体環境要因にも関係することが示された。

平成 29 年度はこの業績をまとめると同時に、実験動物を用いた解析を試みた。本研究課題期間中にはメチル化の解析までには至らなかったが、実験動物において、特に妊娠中低栄養と児組織メチル化の関係を解析するための、妊娠中低栄養誘導のプロトコルを確立することに成功した。これらの実験動物では出生体重が対照群と比較して有意に低下していた。この有意差は児の成長に伴ってやがて確認されなくなる。このことはヒトにおける低栄養が関係する出生体重の減少とその後のキャッチアップと同様の現象であるものと思われる。これら妊娠中低栄養モデル動物におけるメチル化レベルの変動を解析するためこれまでに、実験動物からの臍帯採取のプロトコルを確立し、さらに上述した実験動物において複数の臓器を採取し、保存するに至っている。

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 3件)

Miyaso H, Sakurai K, Takase S, Eguchi A, Watanabe M, Fukuoka H, Mori C.

The methylation levels of the H19 differentially methylated region in human umbilical cords reflect newborn parameters and changes by maternal environmental factors during early pregnancy. Environ Res. 2017 Aug;157:1-8. doi: 10.1016/j.envres.2017.05.006. Epub 2017 May 10. PMID: 28500962 Free Article

(査読有)

Tachibana K, Sakurai K, Watanabe M, **Miyaso H**, Mori C

Associations between changes in the maternal gut microbiome and differentially methylated regions of diabetes-associated genes in fetuses: A pilot study from a birth cohort study. J Diabetes Investig. 2017 Jul;8(4):550-553. doi: 10.1111/jdi.12598. Epub 2017 Feb 2.

(査読有)

Sakurai K, **Miyaso H**, Eguchi A, Matsuno Y, Yamamoto M, Todaka E, Fukuoka H, Hata A, Mori C; Chiba study of Mother and Children's Health group.

Chiba study of Mother and Children's Health (C-MACH): cohort study with omics analyses.

BMJ Open. 2016 Jan 29;6(1):e010531. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010531.

(査読有)

〔学会発表〕(計 2件)

新生児期の母児分離が引き起こすマウス
雄性生殖器系への影響

宮宗秀伸 永堀健太 表原拓也 河田晋一
李 忠連 倉升三幸 小川夕輝 伊藤正裕
第3回生殖系懇話会(東京都武蔵野市), 2018
年3月27日(火)(3月27日発表)

(シンポジウム)

出生後栄養状態によって生じるマウス雄性
生殖器系への影響

宮宗秀伸、永堀 健太、林 省吾、曲 寧、李
忠連、倉升 美幸、河田 晋一、
櫻井健一、森千里、伊藤正裕

第24回精子形成・精巣毒性研究会(東京都
文京区), 2016年12月3日(12月3日発表)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮宗 秀伸(MIYASO Hidenobu)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80422252

