

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12896

研究課題名(和文) 妊娠中のエピゲノム変化を起こす栄養・生活環境要因と母児の健康指標との関連

研究課題名(英文) Association between nutritional/life-environmental factors causing epigenetic changes during pregnancy and healthy parameters of mother and child

研究代表者

今井 千裕 (IMAI, Chihiro)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：50778842

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)：本研究では、妊婦における前向きコホート研究を実施し、妊娠中期および後期の母体血を用いて、肥満形質との関連が示唆されている脂質代謝関連遺伝子(CPT1A, SREBF1)のDNAメチル化を調べた。SREBF1のDNAメチル化は、妊娠経過による脂質代謝の同化から異化への代謝変化と一致して、妊娠中期にみられた関連性が後期には減弱した。一方でCPT1Aイントロン1のメチル化とBMIとの関連は、妊娠後期において見かけ上強化されたが、これは妊娠中に起こるリンパ球割合の妊娠前BMI依存性の変化によって仲介されていた。妊娠中のDNAメチル化変化は、代謝および免疫学的変化が影響することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、妊娠中の母体血における脂質代謝関連遺伝子のエピゲノムが、妊娠期特有の代謝変化や免疫学的変化に影響されて変化することを示した。妊娠期の母体環境を適切にすることは、母体の産後のみならず児の出生後の健康にも重要であることが明らかになっている。母児にもたらされるエピゲノム変化は、さまざまな結果形質が顕在化する前の予測因子としての価値を見出せる可能性がある。本研究のように、同一母児を前向きに追跡し、母児エピゲノム、栄養摂取状況、生活環境要因、メンタルヘルス、身体形質などの情報を包括的に解析するコホート研究を日本において行うことは、今後の予防医療を推進するために重要である。

研究成果の概要(英文)：We performed a prospective cohort study of pregnant women, and analyzed the methylation levels of variably methylated sites, including CPT1A intron 1 and SREBF1 intron 1, which were previously revealed that lipid-related traits. Although methylation of SREBF1 was associated with BMI and LDL-cholesterol at mid-gestation, this association was attenuated at late gestation, which was consistent with the metabolic switch from an anabolic to a catabolic state. The BMI association with CPT1A intron 1 methylation was strengthened at late gestation, which was mediated by a BMI-dependent change in the lymphocyte proportion. Thus, this study has shown that leukocyte methylation of the adiposity-related differentially methylated regions is sensitive to the metabolic and immunological changes that occur during mid-to-late gestation.

研究分野：公衆栄養

キーワード：母子コホート研究 妊娠期環境要因 妊娠期栄養 DNAメチル化 妊娠によるエピゲノム変化 DOHaD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠期の母体の健康管理は、産後の健康のみならず児の生涯の健康にも重要である。近年の疫学研究では、妊娠中の低栄養環境などが将来の児の生活習慣病発症と関連することが報告され、生活習慣病の新たな発症要因として注目されている。妊娠期の子宮内環境や両親の生活習慣は、次世代の健康の起源であり、母親が妊娠期を健康に過ごすことは予防医療の観点からも重要であると考えられる。しかしながら妊娠期の母体は、体格変化による身体的負荷や、出産・子育てに対する心理的負荷などの妊娠期に特異的な要因に曝露される。さらに、糖・タンパク質・脂質代謝系の変化、基礎代謝量や体組成の変動、循環血液量の増大などといったさまざまな生理的变化に必需的に曝される。また、上記のような必需的なストレスに影響を受け、栄養摂取や生活環境を含めた日常的な要因もまた影響を受けるため、妊娠期の健康の評価は複雑化する。一般的に、妊娠合併症や胎児異常がある場合は、正常な妊娠に比して、検査値などを基に明確にスクリーニングされるが、正常な妊娠・出産におけるこれらの指標は乏しい。生理的ストレスと栄養・生活環境要因の単独作用・相互作用による健康への影響を調べるには、同一母児における様々なデータを網羅的に収集する調査研究の基盤を整備することが必要である。特に日本では、女性のやせや低栄養状態の妊婦の増加が指摘されており、欧米における過体重や過栄養の妊婦の問題とは対照的な特性がある。このことから、日本人の妊産婦を対象とした、妊娠周囲環境を包括したコホート研究の推進が急務であると考えられた。

また以前に行った研究では、2型糖尿病の発症・進展には、食後高血糖の繰り返しが末梢白血球における炎症関連遺伝子の発現を徐々に増幅させていく炎症の慢性化が根底にあること、さらに炎症の慢性化には栄養によるエピゲノムの変化・維持が関与する可能性があることを明らかにしている。これは、栄養・生活習慣等の要因は、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御・調節するエピゲノムとして刻印される可能性があることを示すが、短期間でさまざまな内部・外部環境が変化する妊娠中にも、こうしたエピジェネティックな変化が生じやすいことが推測される。実際に、妊娠合併症を発症した妊婦では、その後生活習慣病を発症しやすくなることも報告されていることから、妊娠期要因の影響を反映する指標として妊娠期間中の母体エピゲノム変化が有用ではないかと考えた。しかしながら、妊娠が母児のエピゲノムに与える影響や、エピゲノム変化を引き起こす要因および母児の健康指標との関連はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠が母体のエピゲノムにもたらす影響について明らかにすることを目的とし、同一母児での栄養・生活要因、エピゲノム、身体形質情報を、妊娠前から産後まで包括的に調査する母児コホート研究を大学附属病院において推進した。その中で、妊娠中期および後期に採取した母体血液を用い、成人の末梢血におけるEpigenome-wide association study (EWAS) によって肥満形質 (BMI や血中脂質濃度) との関連が同定されている脂質代謝関連遺伝子 (carnitine palmitoyltransferase 1A; *CPT1A* または sterol regulatory element binding transcription factor 1; *SREBF1*) のイントロン部位における DNA メチル化を解析し、妊娠中の生理学的変化や形質データ (非妊娠時および妊娠中の身体計測値・血液生化学指標) との関連について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 調査研究

本研究は、大学附属病院で出産予定の母児を対象とした前向きコホート研究「周産期における母児エピゲノムの体系的解析 (Birth Cohort - Gene and Environment Interaction Study of TMDU: BC-GENIST)」として実施した。妊娠前から産後2年間を調査期間として、初回妊婦健診においてリクルートし、食生活状況調査、食事記録調査、社会経済状況調査、メンタルヘルス調査、睡眠調査等の情報を収集・追跡した。さらに、妊婦健診情報から母児の身体情報等を取得した。また、妊娠中期および後期の血液を母親から採取し、出産時には児検体として臍帯および臍帯血、生後5日目には新生児濾紙血を取得した。これらの生体試料をもとに、DNA メチル化解析等を行った。産後の成育調査は、母子手帳に記載された情報を郵送形式で調査した。これらの情報をもとに、同一母児に対する妊娠期から出生後までの統合的なデータベースを作成した。

(2) 実験方法

対象者

上記コホート研究において、妊娠中期および後期の母体血がともに収集できた研究参加者のうち、妊婦健診における身体形質情報やアンケート調査に欠損がない52名を対象とした。また母体血の白血球組成を推定するため、コホート研究参加者とは別の非妊娠女性7名から末梢血サンプルを収集した。

母体血サンプルの保存および測定

回収した母体血は、血清とDNAに分けて保存した。母体血血清を用いてLDL-コレステロー

ル濃度を測定した。DNA メチル化解析は、回収した血液 DNA 500ng をバイサルファイト変換し PCR で増幅した後、MassARRAY EpiTYPER により *CPT1A* イントロン 1 および *SREBF1* イントロン 1 における DNA メチル化レベルを定量的に測定した。

母体血中の白血球組成の推定

白血球に含まれる好中球、リンパ球、単球などの細胞組成の割合は、通常の妊婦健診において測定されないため、これを推定するための式を作成した。まず、コホート研究参加者とは別に非妊娠女性から末梢血を収集し、採血後直ちに好中球・リンパ球・単球を分画した。分画サンプルおよび全血のサイトスピン標本および血液塗抹標本を作製して、それぞれのサンプルにおける好中球・リンパ球・単球の割合をカウントした（各細胞の分画純度はすべて 95%以上）。また、細胞カウントと同じ分画サンプルおよび全血を用い、好中球あるいはリンパ球に特異的なメチル化様式（特定の血球細胞にのみ高発現あるいは低発現）を示すマーカー遺伝子（好中球；*STK24*, cg23954655、リンパ球；*LTA*, *RASSF5*）の DNA メチル化レベルを測定した。サンプルに含まれる細胞種類の割合を x 軸、メチル化レベルを y 軸として、細胞割合を推量する検量線を作成した。次いで、母体血を用いてマーカー遺伝子の DNA メチル化を測定し、検量線にあてはめることにより、母体血中の各血球細胞の割合を推定した。

統計解析

統計解析は SPSS statistical software version 24 を使用した。

4. 研究成果

(1) 調査研究の実施成果

本研究は、妊娠初期のリクルートから産後 2 年間にわたり母児を追跡する長期的なコホート研究であったが、研究協力者の先生方のご指導のもと、122 名の研究参加者を集めることができた。またアンケート調査内容や収集する検体の種類も豊富であったが、専門的知識を有する多くの研究協力者との研究遂行のためのミーティングにより、研究を推進するにあたっての課題を適宜解決することができ、追跡調査を円滑に進めることができた。妊娠という不測の事象が予想される状況において参加していただいた研究参加者をはじめ、産婦人科の先生方の協力により、生体試料についても最大限収集することができた。

(2) DNA メチル化解析における研究成果

妊娠期の母体は、胎児の成長に最適な体内環境を整えるため、短期間に劇的に変化する。特に母体の脂質代謝に関しては、妊娠中期ではエネルギーを蓄積させ、胎児成長に備える同化が優位であるのに対し、妊娠後期では胎児の成長のためにエネルギーを産生する異化状態へと変化する。妊娠期間では一般的に、体重の増加や血中脂質濃度上昇といった肥満に類似した形質をもたらすが、脂質代謝の変化については妊娠期に特異的であるといえる。これらをふまえ、本研究では、以前に成人の末梢血白血球を用いた EWAS によって BMI や血中脂質濃度と関連することが報告されている脂質代謝関連遺伝子 *CPT1A* イントロン 1 (CpG2, CpG8) および *SREBF1* イントロン 1 (CpG4) の DNA メチル化レベルを解析し、妊娠経過に伴う DNA メチル化状態と BMI および血清 LDL-C 濃度との関連について調べたところ、以下のことが明らかとなった。

肥満形質 (BMI および血清 LDL-C 濃度) と DNA メチル化レベルとの関連

妊娠中期または後期における *CPT1A* イントロン 1 および *SREBF1* イントロン 1 の DNA メチル化レベルと、同時期に測定した BMI (図 1) あるいは血清 LDL-C 濃度との関連を調べたところ、妊娠中期においてはこれら肥満形質と DNA メチル化レベルとの関連は、EWAS で報告された関連性 (*CPT1A* では負に関連、*SREBF1* では正に関連) と一致した。一方、妊娠後期においては、*SREBF1* の DNA メチル化レベルと肥満形質との関連性は弱まった。これは、妊娠期の脂質代謝が同化状態から異化状態にシフトすることと一致しており、*SREBF1* の DNA メチル化は妊娠期の代謝状態を反映しているといえた。しかしながら対照的に、*CPT1A* イントロン 1 の DNA メチル化レベルと肥満形質との関連性は、かえって妊娠後期には強まる傾向がみられた。

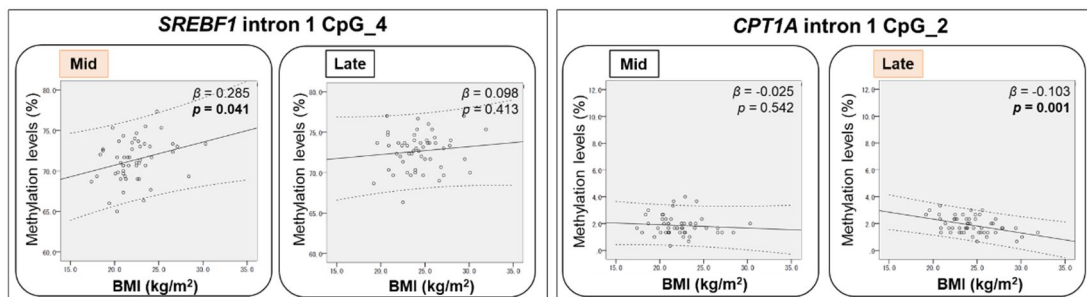


図 1 BMI と *CPT1A* および *SREBF1* の DNA メチル化レベルとの関連

CPT1A イントロン 1 の DNA メチル化に影響する要因

非妊娠女性から採取した白血球分画サンプルにおいて、CPT1A の DNA メチル化を測定したところ、この部位の DNA メチル化は白血球の中でもリンパ球において高メチル化を示し、好中球・単球ではほとんどメチル化されていなかった。すなわち個人の血液中の白血球の割合が、CPT1A の DNA メチル化レベルに影響することがわかった。そこで、母体血に含まれる好中球・リンパ球・単球の割合を推定したところ、母体血の白血球組成は、妊娠中期から後期にかけて個人内で変化が生じていた。特に、CPT1A の DNA メチル化レベルに影響するリンパ球の個人内変動は、妊娠の経過によって一律ではなく、個人によって増加あるいは減少と個人差があることが分かった（図 2 左）。さらに興味深いことに、リンパ球割合の個人内変動に関連する要因を調査したところ、リンパ球割合の妊娠経過に伴う変化は、妊娠前の体格（BMI）と関連していることがわかった（図 2 右）。

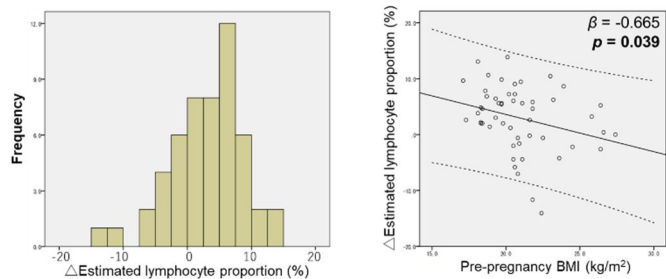


図2 妊娠中期から後期にかけてのリンパ球割合の個人内変動のヒストグラム（左）およびリンパ球割合の個人内変動と妊娠前BMIとの関連（右）

妊娠中期から後期にかけての代謝および免疫学的変化は CPT1A および SREBF1 の母体血 DNA メチル化に影響を及ぼす

妊娠中期から後期にかけての代謝および免疫学的変化は CPT1A および SREBF1 の母体血 DNA メチル化に影響を及ぼす

上記に示すように、リンパ球の割合は妊娠中期から後期にかけて個人内で変化したが、この変化の方向と大きさは個人間で異なった。興味深いのは、リンパ球割合の変化量が妊娠前の BMI と負に関連していたことである。CPT1A のメチル化はリンパ球割合が増加するにつれて高くなる。妊娠前 BMI と CPT1A のメチル化との関連を調べたところ、その関連性は妊娠中期と後期では異なり、後期においてのみ負の関連性が認められた。すなわち、妊娠後期における CPT1A イントロン 1 の DNA メチル化と BMI との関連は、妊娠前 BMI に依存したリンパ球割合の変化によって仲介されていることが明らかとなった（図 3）。

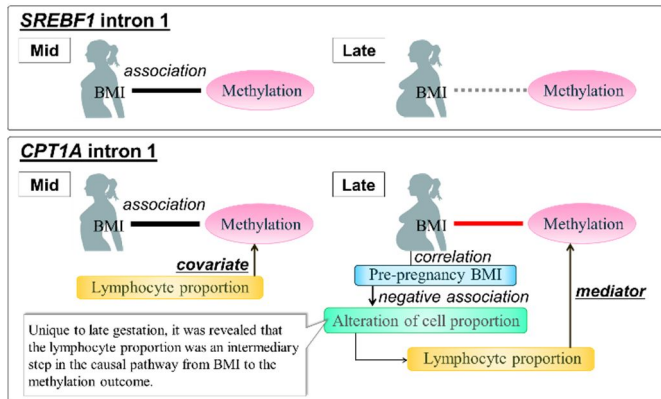


図3 脂質関連遺伝子のDNAメチル化に関連する要因

以上の結果をまとめると、末梢血における脂質代謝関連遺伝子 CPT1A および SREBF1 の DNA メチル化状態の妊娠経過に伴う変化は、妊娠によって起こる脂質代謝の同化から異化への変化という生理的現象、および免疫学的変化によって説明できることが明らかとなった。また本研究では、末梢血白血球における DNA メチル化解析においては、白血球の細胞組成を考慮することが重要であると考え、マーカー遺伝子の DNA メチル化から白血球組成を推定し、細胞組成の違いによる見かけ上の DNA メチル化変化を除いて解析する方法を確立した。この方法は、新生児臍帯血の細胞組成推定にも有用であることを確認しており、今後は、他の候補遺伝子の DNA メチル化解析を行う際にも用いることができる。現在は、母親の食事が児のエピゲノムに与える影響を調べるため、食事調査の結果をもとにして食事の質の評価指標と臍帯血エピゲノムとの関連を調査している。妊婦の食事の質との関連が明らかになれば、適切な食事介入などによって将来的に起こるかもしれない負の要因を予防することができる可能性もある。本コホート研究で収集された貴重な生体試料および母児の包括的な情報をもとに、さらに解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Pavethynath Shilpa, Imai Chihiro, Jin Xin, Hichiwa Naomi, Takimoto Hidemi, Okamitsu Motoko, Tarui Iori, Aoyama Tomoko, Yago Satoshi, Fudono Ayako, Muramatsu Masaaki, Miyasaka Naoyuki, Sato Noriko	4. 巻 20
2. 論文標題 Metabolic and Immunological Shifts during Mid-to-Late Gestation Influence Maternal Blood Methylation of CPT1A and SREBF1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1066 ~ 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20051066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 Okamitsu Motoko, Takimoto Hidemi, Sato Noriko, Yago Satoshi, Imai Chihiro, Tay Zar Ktaw, Nay Chi Htun, Aoyama Tomoko, Fudono Ayako, Miyasaka Naoyuki
2. 発表標題 Associations between maternal mental health, nutrition, and neonatal outcomes in Japanese birth cohort.
3. 学会等名 16th WAIMH WORLD CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金昕、今井千裕、Shilpa Pavethynath、飛知和尚美、瀧本秀美、岡光基子、Nay Chi Thun、青山友子、矢郷哲志、不殿絢子、宮坂尚幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第7回日本DOHaD学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飛知和尚美、今井千裕、Shilpa Pavethynath、金昕、瀧本秀美、岡光基子、Nay Chi Thun、青山友子、矢郷哲志、不殿絢子、宮坂尚幸、佐藤憲子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Pavethynath Shilpa、今井千裕、JIN Xin、飛知和尚美、瀧本秀美、岡光基子、樽井依織、青山友子、矢郷哲志、不殿絢子、宮坂尚幸、佐藤憲子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imai Chihiro, Pavethynath Shilpa, Jin Xin, Hichiwa Naomi, Takimoto Hidemi, Okamitsu Motoko, Tarui Iori, Aoyama Tomoko, Yago Satoshi, Fudono Ayako, Muramatsu Masaaki, Miyasaka Naoyuki, Sato Noriko
2. 発表標題 Intra- and Inter- individual Differences in CPT1A and SREBF1 Methylation of Maternal Leukocytes During Mid-to-Late Gestation
3. 学会等名 DOHaD 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 千裕、Shilpa Pavethynath、瀧本 秀美、岡光 基子、Tay Zar Kyaw、Nay Chi Thun、五十嵐 麻子、青山 友子、矢郷 哲志、不殿 絢子、宮坂 尚幸、佐藤 憲子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第6回日本DOHaD学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井千裕、飛知和尚美、中田ありさ、瀧本秀美、岡光基子、樽井依織、青山友子、矢郷哲志、不殿絢子、宮坂尚幸、佐藤憲子
2. 発表標題 妊婦のたんぱく質エネルギー比率と新生児DNAメチル化 - 疾患関連メチル化部位の解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	佐藤 憲子 (SATO Noriko)		
研究協力者	宮坂 尚幸 (MIYASAKA Naoyuki)		
研究協力者	瀧本 秀美 (TAKIMOTO Hidemi)		
研究協力者	岡光 基子 (OKAMITSU Motoko)		
研究協力者	不殿 絢子 (FUDONO Ayako)		
研究協力者	青山 友子 (AOYAMA Tomoko)		
研究協力者	矢郷 哲志 (YAGO Satoshi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	樽井 依織 (TARUI Iori)		