

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16309

研究課題名(和文) 子宮内発育不全によるIGF-Iメチル化異常が成長発達予後に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of IGF-I gene methylation abnormality on preterm infants with intrauterine growth restriction for development

研究代表者

池田 奈帆 (IKEDA, naho)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：20773881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：早産児における子宮内発育不全児は生命予後や成長発達予後だけでなく、将来のメタボリックシンドローム発症にまで影響があるとされる。出生前の胎内環境やストレスがDNAメチル化異常などエピジェネティクス変化をきたすことがその一因とされている。今回、子宮内発育不全を伴う早産児におけるIGF-I関連遺伝子メチル化異常と成長発達予後との関連を究明することを目的とし、臨床研究を計画した。方法は出生時の全血より採取したゲノムDNAからIGF-IのP2promoter領域のメチル化率を算出した。子宮内発育不全児は非子宮内発育不全児に対し、IGF-Iメチル化率が有意に低かった。今後更なる検討を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果から子宮内発育不全とIGF-Iのメチル化率の関連が示唆された。今後更なる検討を続け、IUGRを伴う早産児におけるIGF-I関連遺伝子のメチル化率と成長、発達予後との関連を証明することができれば、ハイリスク児に対する早期介入による予後改善が期待ができるため、学術的意義は高い。さらに、次の研究段階として、子宮内発育不全の発生時期と分娩までの期間によりIGF-I関連遺伝子のメチル化率が異なり、神経発達予後に影響することを証明できれば、IUGRに対する適切な娩出時期の設定に関する重要な基礎データとなる。

研究成果の概要(英文)：Preterm infants with intrauterine growth restriction are at an increased risk of developing neurological disorders and cognitive delays in childhood as well as metabolic and cardiovascular diseases in adulthood. Recent studies have demonstrated that prenatal intrauterine environment and stress cause epigenetic changes including the DNA methylation abnormality. The aim of our study was to investigate the relationship between IGF-I gene methylation abnormality on preterm infants with intrauterine growth restriction and development. The methods were to calculate methylation levels of the P2 promoter domain on the IGF-I gene from blood of preterm infants at birth. IGF-I gene methylation levels of the intrauterine growth restriction infants were significantly lower than controls. We will need to perform further examination in future.

研究分野：小児科学、新生児学

キーワード：IGF-I 子宮内発育不全 メチル化 早産児

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

1. 研究開始当初の背景

近年の周産期医療の進歩により、我が国における新生児死亡率は低下しているが、平均出生体重が年々低下していることが社会問題となっている。出生時の低体重は 早産 子宮内発育不全(intrauterine growth restriction: IUGR)という2つの因子もしくは双方により規定される。IUGRの主な発生病因として母体の低栄養や胎盤から胎児への血流もしくは栄養の供給が十分でないことが挙げられ、出生した児の多くはSGA(small for gestational age)児となる。さらに早産児では、胎児として妊娠後期に母体から受けるはずであったものとは異なる栄養・代謝環境に曝されるだけでなく、出生後に人工呼吸管理や感染など様々なストレスを受けるため、子宮外(出生後)発育不全(extrauterine growth restriction: EUGR)に陥り易い。

一方、胎児期から乳児期における栄養・代謝環境、ストレスなどがDNAメチル化異常などエピジェネティクス変化をきたし、成人期のメタボリックシンドロームの発症に影響を及ぼすという概念がdevelopmental origins of health and disease (DOHaD)として広く知られるようになった。申請者らは過去に、生体のストレス応答に重要な役割を担っているグルココルチコイドレセプター(GR)遺伝子のメチル化について早産児を対象とした検討を行い、NICU入院4日目で正期産児では変化がみられないGR遺伝子プロモーター領域のメチル化率が増加し、グルココルチコイド抵抗性と関連していることを報告した。

インスリン様成長因子I(insulin-like growth factor I: IGF-I)は胎児期から乳児期にかけての主要な成長調節因子として知られている。我々は過去に出生体重1,500g未満の極低出生体重(very low birth weight: VLBW)児を対象とした検討を行い、SGA児ではAGA(appropriate for gestational age)児に比べ出生時の血清IGF-Iが低値であること、SGA児におけるcatch-up growthには生後の血清IGF-I値が関連することを報告し、さらに母体子宮動脈結紮によるIUGRモデルラットにおいて血清IGF-Iだけでなく、肝臓のIGF-I受容体(IGF-IR)遺伝子発現が低下していることを報告した。IGF-Iは中枢神経系の発達にも不可欠で、早産児の脳容量や発達予後との関連が報告されている。また、生後のIGF-I持続低値が早産児の未熟児網膜症発症や、将来のメタボリックシンドロームにも影響することが報告されている。更に最近では、IUGRがヒト胎盤やラット肝臓のIGF-IおよびIGF関連遺伝子にメチル化をきたすことが報告された。

IUGRによるIGF-I遺伝子メチル化異常と児の成長発達予後との関連について詳細に検討された報告が少ない。

成長ホルモン分泌不全性低身長症は多因子によることが多いとされている。一方で、治療として成長ホルモン(GH)の補充が行われるが、効果は一定ではなく、エピジェネティクスが関与していると言われている。IGF-I遺伝子のP2promotor領域のCGsサイトのうち、CG-137のメチル化がGHの作用効果に関与していると法報告されている。

そこで、今回、先行研究の方法を用いて、子宮内発育不全を伴う早産児におけるIGF-I関連遺伝子メチル化異常と成長発達予後との関連を究明することを目的とし、臨床研究を計画した。

2. 研究の目的

IGF-Iは胎児期から生後早期の主要な成長因子というだけでなく、近年は中枢神経発達やインスリン抵抗性に影響を及ぼすことが注目されている。本研究では子宮内発育不全を伴う早産児におけるIGF-I関連遺伝子メチル化異常と成長発達予後との関連を究明することを目的としている。

3 . 研究の方法

【対象】

2016年1月から2018年3月までに順天堂大学附属静岡病院で出生し、新生児センターに入院した在胎週数32週未満の児を対象とする。先天奇形や胎内感染などを認めた児は除外する。同意を得られた73名を対象症例とした。

【方法】

対象症例の周産期情報をカルテより収集し、在胎期間別出生体重標準値をもとに、児の出生体重 < 標準体重 -10%tile を子宮内発育不全児、IUGR 群 (n=13)、また、出生体重 標準体重 -10%tile を CONTROL 群 (n=60) とした。

出生時の全血より採取したゲノム DNA から、IGF-1 の P2promoter 領域を分離し、バイサルファイト処理、次世代シーケンサー(静岡病院災害医学研究センター)によるシーケンス解析を行い、1塩基レベルでのメチル化率を算出した。

IGF-1 の P2promoter 領域のメチル化を IUGR 群・CONTROL 群の両群間で比較検討を行った。統計解析方法は Mann-Whiney U 検定を用いた。

【メチル化解析】

平成 27 年度より順天堂大学附属静岡病院に導入される最新型次世代シーケンサー Next Seq 500 (イルミナ社製)を使用する。最も網羅的に全ゲノムを解析する全ゲノムバイサルファイトシーケンス法はコストが高いうえにバイサルファイト処理による DNA の損傷のためシーケンス効率が非常に悪いため、今回の解析では全ゲノムをバイサルファイト処理したのちに目的領域を PCR 増幅したのちにメチル化率を算出する BiSulfite Amplicon Sequencing (BSAS)法を用いる。

【精神運動発達予後評価】

精神運動発達評価は Bayley 式乳幼児発達検査 (The Bayley Scales of Infant Development; BSID-III)を用いる。Bayley 検査は乳幼児を対象にした全般的発達検査法の中で最もグローバルスタンダードな検査方法とされ、知覚、記憶、認知能力を評価する cognitive scale, 表出性言語、理解言語を評価する language scale, 微細運動、粗大運動、協調運動を評価する motor scale、また社会適応能力を評価する social emotional scale , 身辺自立スキルや家庭環境などを評価する adaptive behavior scale の5項目から成り、定量的な発達評価が可能である。

4 . 研究成果

IUGR 群 (n=13): 平均出生時体重 1,210 ± 347g、平均出生時身長 36.7 ± 4.1cm、平均出生時在胎週数 28 ± 2 週

CONTROL 群 (n=60): 平均出生時体重 787 ± 248g、平均出生時身長 32.5 ± 4.1cm、平均出生時在胎週数 28 ± 2 週

上記の2群間で IGF-1 の P2promoter 領域のメチル化の比較検討を行った。

IGF-1 メチル化率は IUGR 群が CONTROL 群に対してメチル化率が有意に低かった。(p<0.05) 今回の検討では出生時のメチル化しか検討できてないが、今後データを蓄積して、経時的な IGF-1 メチル化率の測定、IUGR 群の中で3歳時の体重身長のキャッチアップ群と非キャッチア

ップ群とのメチル化率の比較、及び3歳児の発達検査とメチル化率の関連について引き続き検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

前述の通り、現段階で対象例は3歳に到達しておらず、今後3歳児の身長・体重、発達検査の結果が出た後、考察を行い、論文化を行っていく予定であり、結果が未回収のため、現時点では本研究の最終的な発表にいたっていない。来年度以降、論文化を目指していく。

〔雑誌論文〕(計3件)

Suganuma H, Ikeda N, Ohkawa N, et al. (2名省略,2番目) Influence of i.v. lipid emulsion on lipoprotein subclass in preterm infants. *Pediatr Int*, 60(9):839-843, 2018 (査読有)

Kantake M, Ikeda N, Shimizu T, et al. (5名省略,4番目) Postnatal relative adrenal insufficiency results in methylation of the glucocorticoid receptor gene in preterm infants: a retrospective cohort study. *Clin Epigenetics*, 18:10:66, 2018 (査読有)

Ikeda N, Shoji H, Shimizu T, et al. (5名省略,1番目) Effects of IGF-I during early postnatal period in intrauterine growth-restricted rats. *Pediatr Int*, 58(5):353-8, 2016 (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

IKEDA, naho, Incidence and risk factors of postnatal cytomegalovirus infection in very low birth weight infants. 13th World Congress of Perinatal Medicine, 2017

池田奈帆, 母体末梢血からの胎児赤芽球分離の試み、第1回新生児科基礎トランスレーションリサーチ、2018

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：粟田 健太郎

ローマ字氏名：AWATA, kentaro

研究協力者氏名：大川 夏紀

ローマ字氏名：OHKAWA, natsuki

研究協力者氏名：東海林 宏道

ローマ字氏名：SHOJI, hiromichi

研究協力者氏名：寒竹 正人

ローマ字氏名：KANTAKE, masato

研究協力者氏名：清水 俊明

ローマ字氏名：SHIMIZU, toshiaki

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。