

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791224

研究課題名(和文) 子宮内胎児発育遅延児における長寿遺伝子発現に関する研究

研究課題名(英文) A study regarding gene expressions of Sirt1 in human placentas of newborns with intrauterine growth restriction

研究代表者

森岡 一郎 (MORIOKA, ICHIRO)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：80437467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、長寿遺伝子であるSirt1の発現がヒトの子宮内胎児発育遅延(IUGR)と関連があるかを明らかにすることであった。結果、IUGR児と子宮内で正常発育した新生児では、胎盤Sirt1遺伝子発現量に違いはなかった。しかし、我々は遺伝子解析の結果、血管内皮増殖因子遺伝子とレニン・アンジオテンシン系遺伝子多型が日本人のIUGRの発症に関連があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A purpose of this study was to investigate expressions of Sirt1 gene in human placentas of newborns with intrauterine growth restriction (IUGR). No different expressions of Sirt1 gene were found between IUGR and appropriate-for-gestational age newborns. However, we found that the vascular endothelial growth factor and renin-angiotensin system gene polymorphisms are at risk for developing IUGR in Japanese newborns.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：子宮内胎児発育不全 遺伝子 血管内皮増殖因子 レニン・アンジオテンシン系 多型 脂質

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群は、虚血性心疾患や2型糖尿病などの成人期生活習慣病の発症と直結するため、その克服が、現在の我が国の公衆衛生上の大きな課題となっている。特に、子宮内胎児発育不全児(Intrauterine growth restriction: IUGR)のように胎児期に低栄養状態となった児は、胎内で十分発育した児に比して、将来のメタボリック症候群を発症するリスクが高いとの疫学調査の報告が相次いでいる。それゆえ、IUGR 児におけるメタボリック症候群の発症機序の解明とその予防法の開発が緊急の課題である。

動物実験で、長寿遺伝子である *Sirt1* がメタボリック症候群の発症と密接な関係があることが報告された。ヒト IUGR 児において、この *Sirt1* 発現を検討した報告はなかったため、出生時に得られる胎盤や臍帯血の *Sirt1* 遺伝子発現とバースコホート調査から、IUGR 児におけるメタボリック症候群の発症機序の解明を試みることであった。

2. 研究の目的

(1) 胎盤における *Sirt1* 遺伝子発現に関する実験系を確立し、IUGR 児(日本人の在胎週数別平均体重の 10 パーセント未満)と子宮内で正常発育した新生児(AFD 児)で *Sirt1* 遺伝子発現に差があるか検討する。

(2) IUGR 児(日本人の在胎週数別平均体重の 10 パーセント未満)を出生時から前方視的に追跡し、乳児期早期のメタボリック症候群関連血液検査値(血清脂質等)が AFD 児と異なるか明らかにする。

(3) *Sirt1* 遺伝子以外の遺伝子について、特に、胎生期の血管形成や胎盤血管形成において重要な役割を果たしている *血管内皮増殖因子(VEGF)* 遺伝子と冠動脈疾患発症のリスク因子として広く知られている *レニン・アンジオテンシン系(RAS)* 遺伝子の多型が IUGR と関連があるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) IUGR 児の胎盤における *Sirt1* 遺伝子発

現に関する検討

胎盤から RNA の抽出

通常の RNA 抽出キット以外に、ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐために、High Pure RNA Isolation キットを用いて、抽出した。

Sirt1 遺伝子発現の検討

Takayama らの報告(Arthritis Rheum 2009)に基づき、SIRT1 のプライマーセット(5-CCTGACTTCAGATCAAGAGACGGTA-3(sense)、5-CTGATTAATAATGTCTCCACGAACAG-3(antisense))を作成した。論文の条件を参考に、PCR(93 度×30 秒, 58 度×60 秒, 72 度×45 秒: 40 サイクル)を行った。目的のバンドを半定量的に IUGR 児と AFD 児で比較した。

(2) IUGR 児における乳児期早期のメタボリック症候群関連血液検査値に関する検討

IUGR 児を前方視的に、追跡調査を行い、生後 4-6 か月時、7-9 か月時、10-12 か月時に、IUGR 児のメタボリック症候群関連血液検査値(総コレステロール [Tcho]、遊離型コレステロール [Fcho]、HDL・LDL コレステロール [HDL, LDL]、HDL/LDL 比、中性脂肪 [TG]、遊離脂肪酸 [FFA])を AFD 児と比較した。

(3) *Sirt1* 遺伝子以外の遺伝子と IUGR との関連に関する検討

VEGF 遺伝子

対象：神戸大学医学部附属病院周産母子センターに入院した初産の新生児のうち、出生体重が在胎週数の平均の発育より -1.5 SD を下回った IUGR 児 41 例(中央値：在胎 32 週、出生体重 1,234g)を IUGR 群、在胎週数通りの発育を遂げた AFD 児 44 例(中央値：在胎 32 週、出生体重 1,956g)を対照群とした。

方法：二群間において、*VEGF* 遺伝子型を比較検討した。遺伝子解析は倫理委員会の承認のもと、児の臍帯、臍帯血、頬粘膜から DNA を抽出し、疾患関連 *VEGF* 多型として過去に報告のある -1498T/C、-634C/G、936C/T、1612G/A を PCR 法、直接シーケンス法を用いて決定した。

RAS遺伝子

対象：神戸大学医学部附属病院周産母子センターに入院した新生児のうち、出生体重が在胎週数の平均の発育より-1.5 SDを下回った IUGR 児 92 例（中央値：在胎 32 週、出生体重 1,174g）を IUGR 群、在胎週数通りの発育を遂げた児 101 例（31 週、1,670g）を対照群とした。

方法：二群間において、RAS 遺伝子多型を周産期背景因子と共に比較検討した。遺伝子解析は倫理委員会の承認のもと、児の臍帯・臍帯血・頬粘膜から DNA を抽出し、ACE rs4340(I/D)、AGT rs699(C>T)、AGTR1 rs5186(A>C)を PCR 法・RFLP 法・直接シーケンシング法を用いて決定した。

4. 研究成果

(1) IUGR 児の胎盤における *Sirt1* 遺伝子発現に関する検討

図 1 のように目的の産物と思われる約 340bp のバンドが得られた。しかしながら、そのバンドを半定量的に IUGR 児と AFD 児を比較したが、明らかな差は見いだせなかった(図 1)。

(2) IUGR 児における乳児期早期のメタボリック症候群関連血液検査値に関する検討

IUGR 児および AFD 児で生後 4~6 か月時、生後 7~9 か月、生後 10~12 か月時の脂質検査値を比較した。生後 4~6 か月、生後 7~9 か月、生後 10~12 か月時では、脂質検査値 (T-cho, F-cho, HDL, LDL, HDL/LDL, TG, FFA) に有意な差はなく、どちらの群も正常値を呈していた(表 1~3)。IUGR 児は、生後 12 か月現在では脂質異常を呈さない可能性が考えられた。

図1 胎盤由来cDNAにおける*Sirt1*のPCR解析

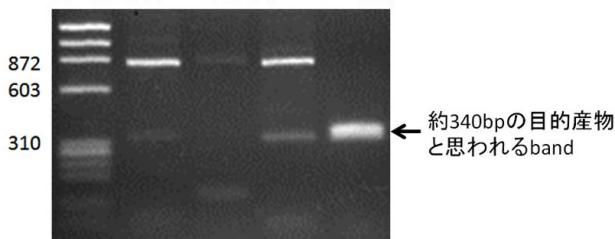


表 1. 生後 4-6 か月時

	IUGR 児 n=7	AFD 児 n=15
Tcho, mg/dL	151 (131-189)	159 (110-282)
Fcho, mg/dL	49 (39-59)	52 (35-87)
HDL, mg/dL	51 (40-74)	50 (29-120)
LDL, mg/dL	76 (50-121)	82 (38-155)
HDL/LDL	1.90 (0.68-2.81)	1.59 (0.72-4.69)
TG, mg/dL	130 (55-404)	99 (49-352)
FFA, mg/dL	530 (231-974)	315 (94-724)

表 2. 生後 7-9 か月時

	IUGR 児 n=7	AFD 児 n=19
Tcho, mg/dL	164 (141-212)	157 (119-251)
Fcho, mg/dL	50 (46-65)	48 (38-77)
HDL, mg/dL	44 (35-68)	46 (28-80)
LDL, mg/dL	95 (77-141)	94 (45-165)
HDL/LDL	1.98 (1.67-3.77)	2.13 (0.71-3.61)
TG, mg/dL	165 (76-323)	124 (53-325)
FFA, mg/dL	466 (332-778)	468 (118-868)

表 3. 生後 10-12 か月時

	IUGR 児 n=3	AFD 児 n=7
Tcho, mg/dL	177 (151-210)	160 (127-199)
Fcho, mg/dL	54 (48-64)	45 (38-63)
HDL, mg/dL	53 (43-58)	44 (37-61)
LDL, mg/dL	95 (87-133)	97 (61-138)
HDL/LDL	2.02 (1.64-2.51)	2.25 (1.54-3.36)
TG, mg/dL	182 (169-194)	150 (69-261)
FFA, mg/dL	265 (254-562)	309 (132-482)

データは中央値 (範囲) で示す

(3) *Sirt1* 遺伝子以外の遺伝子と IUGR との関連に関する検討

VEGF 遺伝子

VEGF 遺伝子型のアリル頻度は、936C/T、1612G/A は、二群間で有意差はなかったが、-1498T/C の T アリル頻度 (IUGR 群: 82.9%、対照群: 68.2%、 $p=0.03$)、-634C/G の C アリル頻度 (IUGR 群: 52.4%、対照群: 35.2%、 $p=0.02$) が IUGR 群で有意に高かった。

genotype 頻度は、-1498T/C の CC genotype が IUGR 群で有意に少なく (IUGR 群: 2.4%、

対照群：15.9%、 $p=0.03$ ）、-634C/G の CC genotype が IUGR 群で有意に多かった（IUGR 群：34.1%、対照群：13.6%、 $p=0.03$ ）

以上より、VEGF-1498T/C 多型と-634C/G 多型は、IUGR と関連している可能性があることが明らかになった。

RAS 遺伝子

周産期背景因子については、出生体重が IUGR 群で有意に低く、妊娠高血圧症候群、帝王切開率、母体年齢が IUGR 群で有意に高かった。

RAS 遺伝子多型の変異アリル頻度は、ACE rs4340（IUGR 群：32.6%、対照群：33.7%）、AGT rs699（19.0%、19.3%）、AGTR1 rs5186（8.2%、6.9%）で二群間に有意な差はなかった。

genotype 頻度では、ACE rs4340、AGTR1 rs5186 で二群間に有意差はなかったが、AGT rs699 TT genotype が IUGR 群で有意に高く（IUGR 群：4.4%、対照群：0%、 $p=0.03$ ）、TT genotype を有する児は全例 IUGR 児であった。

有意差を認めた周産期背景因子に、AGT rs699 TT genotype を加えて多変量解析を行った結果、日本人の新生児において AGT rs699 TT genotype は IUGR 発症の独立した危険因子であった。

以上より、日本人において、RAS 遺伝子多型のうち AGT rs699 TT genotype は IUGR の発症と関連がある可能性があることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者には下線）

〔雑誌論文〕（計49件）

1. Fujioka K., Shibata A., Morioka I., et al. (全10人、10番目) Association of a vascular endothelial growth factor polymorphism with the development of bronchopulmonary dysplasia in Japanese premature newborns. *Sci Rep.* 4, 4459, doi: 10.1038/srep04459. 査読あり (2014)

2. 万代ツル工、森岡一朗、藤田花織、他(全6人、2番目): 新版K式発達検査2001による極低出生体重児の3歳時における精神発達の特徴、小児の精神と神経、印刷中、2014、査読あり
3. 藤岡一路、森岡一朗、長坂美和子、他(全9人、2番目): 日本人 Small-for-gestational age児におけるレニン・アンジオテンシン系遺伝子多型の関与の検討、日本未熟児新生児学会雑誌、26(1)、153-159、2014、査読あり
4. 藤岡一路、森岡一朗、長坂美和子、他(全11人、2番目): 日本人 Small-for-gestational age児における血管内皮増殖因子遺伝子多型の関与の検討、日本未熟児新生児学会雑誌、25(2)、105-110、2013、査読あり
5. 藤岡一路、森岡一朗、三輪明弘、他(全10人、2番目): 在胎週数相当の-2SD未満のSmall-for-Gestational Age児の臨床像の検討、神緑会学術誌 28、73-77、2012、査読なし

〔学会発表〕(計102件)

1. 森岡一朗、長坂美和子、藤田花織、他: シンポジウム「Pretermを考える～preterm児のCPとlate pretermの諸問題～」、Late preterm児の3歳時低身長発症頻度: 神戸市における population-based研究、第32回周産期学シンポジウム、福岡、2/7-8/2014
2. 万代ツル工、加藤神奈、森岡一朗、他: 極低出生体重児と自閉症スペクトラム障害児の発達特徴の比較 新版K式発達検査の下位項目による検討、第109回日本小児精神神経学会、埼玉、6/28-29/2013

3. Fujioka K, Morioka I, Nagasaka M, et al. Association between renin-angiotensin systems gene polymorphisms and intrauterine growth restriction in a Japanese population. The 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research Conference, Sarawak, Malaysia, May 9 to 12, 2013.
 4. Morioka I, Mandai T, Nagasaka M, et al. Extremely preterm severely small for gestational age newborns are at risk for motor developmental impairment at 3 years of age. The Society for Pediatric Research Conference, Washington, DC, USA, May 4 to 7, 2013.
 5. Nagasaka M, Morioka I, Koda T, et al. Incidence of short stature at 3 years of age in Japanese late-preterm infants. The Society for Pediatric Research Conference, Washington, DC, USA, May 4 to 7, 2013.
 6. 藤岡一路、森岡一朗、香田 翼、他：子宮内胎児発育遅延とレニン・アンジオテンシン系遺伝子多型の関連、第48回日本周産期新生児医学会、大宮、7/8-10/2012
 7. Fujioka K, Morioka I, Yagi M, et al. Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms in newborns with intrauterine growth restriction. The Society for Pediatric Research Conference, Boston, USA, April 28 to May 1, 2012
 8. 森岡一朗、万代ツルエ、香田 翼、他：母体及び胎盤臍帯要因で極低出生体重児として出生した重度胎児発育不全児の3歳時の精神運動発達、第30回周産期学シンポジウム、東京、2/3-4/2012
 9. 藤岡一路、森岡一朗、香田 翼、他：子宮内胎児発育遅延とVEGF遺伝子型の関連、第56回日本未熟児新生児学会、東京、11/13-15/2011
 10. 万代ツルエ、森岡一朗、北山真次、他：重症子宮内胎児発育不全を伴った超早産児の3歳時精神運動発達の検討、第105回日本小児精神神経学会、新潟、6/18-19/2011
- 〔図書〕(計29件)
1. 森岡一朗、長坂美和子、藤田花織、他：Late preterm児の3歳時低身長が発生頻度：神戸市におけるpopulation-based研究、周産期学シンポジウム、32、印刷中、2014
 2. 森岡一朗、万代ツルエ、香田 翼、他：母体及び胎盤臍帯要因で極低出生体重児として出生した重度胎児発育不全児の3歳時の精神運動発達、周産期学シンポジウム、30、53-59、2012
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)
- 〔その他〕
- なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 森岡 一朗(MORIOKA ICHIRO)
- 神戸大学・大学院医学研究科・特命教授
- 研究者番号：80437467