

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390144

研究課題名(和文) 胎児プログラミングのエピゲノミクスを中心としたオミックス解析による探索的研究

研究課題名(英文) Exploratory Research for Fetal Programming Effects by Using Omics Analysis including Epigenomics

研究代表者

前川 真人(MAEKAWA, Masato)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20190291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：低出生体重児群(LBW)36例と正常出生体重児群120例の2群に分け、グリコブロットング法により糖鎖発現プロファイルを網羅的に比較することで、低出生体重児の特徴を検討した。全部で35種のN-グリカンが検出された。これらのうち、G3414はロジスティック回帰でLBWとSGAの両方と相関していた。G1915、G2744、G3049、G3719はLBWと関連していた。前向きな追跡調査で、これら5種の全てが生後6ヶ月と18ヶ月での速い体重増加と関連しており、構造的に2つの異なるカテゴリーに入るものであった。劣悪な胎児環境や生後の急峻な体重増加の予測因子として有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate which cord blood N-glycans are associated with poor fetal environment indicators including LBW and SGA, or rapid weight gain in early infancy. From a regional prospective birth cohort, 36 LBW neonates and 120 normal-birth-weight neonates were recruited. A comprehensive glycoblotting using MALDI-TOF-MS-based N-glycan analysis in cord blood from these neonates were conducted. A total of 35 N-glycans were detected (m/z 1362.481-3865.407). Of these, G3414 were correlated with both LBW and SGA in logistic regression. G1915, G2744, G3049 and G3719 were associated with LBW. In the prospective follow-up analysis, these 5 N-glycans were all associated with 6 and 18-months rapid weight gain after birth. These identified candidate N-glycans are structurally categorized into two different categories. These N-glycans were suggestive of potential predictors of poor fetal environment or rapid weight gain after birth.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：グライコミクス グリコブロットング 胎児プログラミング 低出生体重児 不当軽量児 N-グリカン

## 1. 研究開始当初の背景

昨今、新生児の重点的ケアは劇的に向上してきており、低出生体重児の生存率はどんどん高まっている。実際、低出生体重児の頻度は世界的にも増加してきており、日本でも低出生体重児の割合は10%に近づいている。これら低出生体重児で生まれた子供たちも20歳代から30歳代にさしかかっている。

Barkerらは1986年、低出生体重児が成人に達した後に冠動脈疾患による死亡率が高かったことを発端に、胎児期の栄養不良が成人病の素因をつくるというBarker仮説(成人病胎児期発症仮説、“fetal origins” hypothesis)を提唱した(Barker and Osmond, Lancet 1986)。その後、低出生体重児の体重と2型糖尿病や心血管疾患との関連性が疫学的に研究されてきた。母体の妊娠時の低栄養は子宮内での胎児の発育を障害し、俟約遺伝子を発動させると考えられている。そして、この表現型は将来のメタボリック症候群の発現を促し、2型糖尿病の発症にもつなげる危険性が高まる。もしこの危険性を評価し発症の予知が可能であるならば、生活習慣を制御することで糖尿病の発症予防につながるかもしれない。一方、胎児期のみならず出生後の栄養もその後のさまざまな疾病発症に関与している可能性が示され、発達期の環境の変化による不可逆的な反応が生じたときに、発達が完了した時期の環境と一致すれば健康であるが、一致しなければ成人期の発症の根源となるというDevelopmental origins of health and disease (DOHaD)仮説も立てられている(Gluckman and Hanson, Science 2004)。このように胎生期の低栄養は、生活習慣病の増加だけでなく、小児期の発達障害の増加にも関与していると考えられており、それを明らかにするためには出生から前向きに研究するコホート研究が必要とされる。

この理由として細胞機能不全との関連性が考えられており、遺伝子の関与(Freathy et al. Diabetes 2009; Freathy et al. Nature Genet 2010)やDNAのメチル化などのエピジェネティックな変化(胎児プログラミング)(Drake and Walker, J Endocrinol 2004)の可能性が示されている。エピジェネティクスの異常はいわゆる獲得形質とされるが、世代を越えて遺伝していくのか、その答えはまだ証明されたとは言えず、今後の大きなテーマである。そして、これら形質による発症メカニズムが明らかになれば、原因に応じた対処・管理による予防も期待できると考える。

## 2. 研究の目的

低出生体重(LBW)やsmall for gestational age (SGA)は子宮内環境を反映する臨床指標であり、後年の糖尿病・心血管

疾患リスク因子として知られている(胎児プログラミング仮説)。これにはエピジェネティックな機構によって遺伝子発現がダイナミックに変化して、トランスクリプトーム、プロテオーム、グライコーム、メタボロームなどの変化を生じると考えられる。グライコームは近年、タンパク質の翻訳後修飾において重要性が認識され、分析手法の進歩に伴い種々の疾患と血液中の糖蛋白や糖脂質などが注目されるようになってきた。特に、N-結合型糖鎖は主な生物学的プロセス、たとえば細胞と基質の相互作用、タンパク質の折れ曲がり、受容体との結合、タンパク質の代謝などにおいて重要な役割を演じていることがわかってきた。従って、N-結合型糖鎖プロファイルをみることで、種々の病態の診断にも活用できる可能性がある。そこで、我々は出生体重などで分別した胎児の臍帯血の網羅的グライコーム分析を行い、LBWやSGAなど既知の糖尿病・心血管疾患予測因子と血中糖鎖との関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 対象

静岡県浜松市の出生コホート(Hamamatsu Birth Cohort for Mothers and Children; HBC study)(Tsuchiya KJ, et al. J Dev Origins Health Dis 2010)に登録された中から、多胎妊娠は除いてLBW児(2500g未満)36例及び通常出生体重児120例(2750g~3250g)を無作為抽出した。

### 2) 臍帯血のN-グリカン測定

出産後すぐに集められた臍帯血から血清を分離し、分析まで-80℃に保存した。N-グリカンの分析はスイートプロット法によって行った(14)。内部標準40 pmolを加えた10 µLの血清を還元アルキル化し、トリプシン処理、熱処理を行った。室温まで冷却後、N-グリカナーゼFによってN-グリカンを切断した。37℃で6時間保温後、グリコプロッティングにかけた。MALDI-TOF MSを用いた網羅的解析法(Angew Chem Int Ed. 2005, 44, 91-6)によってN-グリカンを検出し、構造を決定した。

### 3) 脂質プロファイルの解析

臍帯血の総コレステロール、LDL、HDL、トリグリセライドをHPLCを用いた高感度リポ蛋白解析を行った。レプチンとアディポネクチンはELISAで測定した。

### 4) アウトカムと統計解析

各アウトカムと糖鎖プロファイルの関連性を評価した。また出生後早期の急速な体重増加も後年の糖尿病・心血管リスクであるため、出生後18ヶ月までの体重増加(> 0.67 SD score)と臍帯血糖鎖の関連についてprospectiveに評価した。

#### 4. 研究成果

2群における臨床的特徴としては、LBW群で帝王切開、早期産・SGAの割合が多く、妊娠週数は低かった(表1)。

**表1. LBW, NBW 2群の性状**

	LBW N=36	NBW N=120	P
<b>母体側変数</b>			
Age (yr)	31.5 (5.03)	31.9 (4.93)	0.682
Advanced maternal age ( $\geq 35$ yrs)	8 (22.2)	38 (31.7)	0.276
Paternal age (yr)	33.4 (5.22)	33.8 (6.01)	0.685
Assisted reproductive technology	4 (11.1)	13 (10.8)	0.963
Smoking during pregnancy	2 (5.56)	10 (8.33)	0.583
First childbirth	19 (52.8)	56 (46.7)	0.520
Caesarean section	13 (36.1)	22 (18.3)	0.025
Emergency cesarean section	6 (16.7)	5 (4.17)	0.010
<b>児側変数</b>			
Gender (Female)	23 (63.9)	79 (65.8)	0.830
Gestational age (wk)	37.6 (1.45)	39.2 (1.06)	<0.001
Preterm	10 (27.8)	2 (16.7)	<0.001
Birth weight (g)	2275.2 (194)	2992 (131)	<0.001
Birth weight SD score	-1.81 (0.49)	-0.01 (0.32)	<0.001
Small for gestational age	17 (47.2)	0 (0.0)	<0.001
<b>臍帯血変数</b>			
Cholesterol			
Total (mg/dl)	69.1 (19.2)	64.8 (14.9)	0.266
LDL (mg/dl)	26.2 (11.1)	23.6 (8.09)	0.330
HDL (mg/dl)	33.6 (9.67)	33.9 (8.67)	0.847
Triglycerides (mg/dl)	29.5 (11.7)	29.0 (14.8)	0.873
Leptin (ng/ml)	1.62 (1.38)	4.18 (3.12)	<0.001
Adiponectin ( $\mu$ g/ml)	26.6 (10.6)	31.2 (12.3)	0.038

平均(標準偏差)で表した。

LBW, low birth weight; NBW, normal birth weight.

母親父親の年齢や母親の喫煙、子供の性別などは有意差はみられなかった。また、脂質プロファイルもほとんど2群間で差はみられなかったが、SGAでは脂質プロファイルのレベルは低い傾向にあった。レプチンとアディポネクチンはLBW群、SGAで顕著に低かった。

MALDI-TOF-MSによるグリコプロテオミクス解析の結果、35種類のN-結合型糖鎖( $m/z$  1362.481-3865.407)が同定された。そのうち $m/z$  1915, 2744, 3049, 3414, 3719の臍帯血中濃度がLBW群にて低値であった(表2、3)。

**表2. N-グリカンの構造**

N-グリカン		
Code	$m/z$	Structure
G1915	1914.698	
G1956	1955.724	
G2220	2219.809	
G2525	2524.920	
G2744	2743.994	
G3049	3049.105	
G3414	3414.238	
G3719	3719.349	

**表3. 2群の臍帯血のN-グリカン濃度**

N-グリカン		発現量 (pmol/ $\mu$ l)		
Code	$m/z$	LBW	NBW	P
G1915	1914.698	3.53 (0.86)	3.89 (0.93)	0.039
G1956	1955.724	1.71 (0.46)	1.86 (0.39)	0.053
G2220	2219.809	2.24 (0.56)	2.40 (0.52)	0.093
G2525	2524.920	0.78 (0.12)	0.74 (0.14)	0.042
G2744	2743.994	0.32 (0.04)	0.34 (0.06)	0.008
G3049	3049.105	0.21 (0.06)	0.28 (0.12)	<0.001
G3414	3414.238	0.05 (0.14)	0.16 (0.22)	0.006
G3719	3719.349	0.08 (0.13)	0.20 (0.19)	0.001
Total	-	31.5(5.59)	32.8 (5.97)	0.210

G1956とG2220もLBW群で低い傾向を示したが、平均値は有意差を認めなかった。一方、G2525の平均値はLBW群で有意に高かった。N-グリカン全体の量は2群間で有意差はみられなかった。

多変量解析にてこれら糖鎖はLBWと負の相関を認め、うち $m/z$  3414はLBW及びSGAの両者と負の相関を認めた。

臍帯血におけるglycosylationはレプチン・アディポネクチンと強い正の相関を示し、特にG1680, G1753, G1915, G1956, G2220, G2744, G3049, G3414, G3719は有意な正の

相関を認めた。

LBW との関連が認められた G1915, G2744, G3049, G3414 and G3719 の 5 種類の N-結合型糖鎖は、プロスペクティブな解析においても出生後 18 ヶ月までの急速な体重増加と負の相関を認めた。また、G2220 は生後 6 ヶ月の体重の急激な増加と負の相関を認めた。G1956 と G2074 は生後 18 ヶ月の体重増加と負の相関を示した。逆に、G2439 は生後 18 ヶ月での体重増加と正の相関を認めた (表 4)。

**表 4 . 出生後 18 ヶ月における体重の追跡調査**

	n	LBW	n	NBW	P
<b>Actual data (kg)</b>					
1 mo	30	3.49 (0.39)	42	4.19 (0.37)	<0.001
4 mo	30	6.03 (0.60)	40	6.63 (0.65)	<0.001
6 mo	13	7.08 (0.91)	21	7.51 (0.86)	0.176
10 mo	28	7.86 (0.75)	39	8.49 (0.84)	0.002
18 mo	28	9.50 (0.85)	37	10.0 (1.02)	0.040
<b>SD score</b>					
1 mo	30	-1.28 (0.74)	42	0.07 (0.66)	<0.001
4 mo	30	-0.90 (0.74)	40	-0.11 (0.73)	<0.001
6 mo	13	-0.77 (1.07)	21	-0.08 (0.99)	0.067
10 mo	28	-0.98 (0.79)	39	-0.18 (0.96)	<0.001
18 mo	28	-0.59 (0.79)	37	-0.01 (1.00)	0.015
<b>Rapid weight gain<sup>1</sup></b>					
Birth-6 mo	30	23 (76.7)	40	8 (20.0)	<0.001
Birth-18 mo	31	22 (71.0)	38	9 (23.7)	<0.001

<sup>1</sup> 出生からの体重増加の SD スコア > 0.67 をいう

構造分析の結果、これらの糖鎖は、フコースの有無及び分枝数の観点から 2 種類の系統に分類されることが示された。

MALDI-TOF MS による臍帯血の網羅的糖鎖分析の結果、子宮内低栄養を反映しうる複数の N-結合型糖鎖が見出され、構造上これらは 2 系統に分類された。本研究成果は、子宮内低栄養およびそれに続く後年の心血管代謝疾患リスクの予知、潜在的メカニズムの同定につながる新たな知見を提供するものと期待される。

## 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 12 件)

1. Ito T, Maekawa M, et al. (計 9 人、8 番目) : Pustular psoriasis-like lesions associated with hereditary lactate dehydrogenase M subunit deficiency without interleukin-36 receptor antagonist mutation: long-term follow-up of two cases. *Br J Dermatol*. [Epub ahead of print] 2015. 査読有 doi: 10.1111/bjd.13590.
2. Watanabe Y, Shibata K, Maekawa M : Cell line differences in replication timing of human glutamate receptor genes and other large genes associated with neural disease. *Epigenetics*. 9 (10) ; 1350-1359, 2014. 査読有 doi:10.416/ 15592294.2014.967585
3. Kono M, Maekawa M, et al. (計 10 人、7 番目) : Usual interstitial pneumonia preceding collagen vascular disease: a retrospective case control study of patients initially diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLOS ONE*. 9; e94775, 2014. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0094775.
4. Kato M, Maekawa M, et al. (計 12 人、11 番目) : Plasma connective tissue growth factor levels as potential biomarkers of airway obstruction in patients with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 113(3) ; 295-300, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.anai.2014.05.026.
5. Tokura Y, Maekawa M, et al. (計 8 人、7 番目) : IgG4-related skin disease. *Br J Dermatol*. 171 ; 959-967, 2014. 査読有 doi: 10.1111/bjd.13296.
6. Sato R, Maekawa M, Genma R, Shirai K, Ohki S, Morita H, Suda T, Watanabe H: Final height and cardiometabolic outcomes in young adults with very low birth weight (< 1500 g). *PLOS ONE* 9(11) ; 1-9, 2014. . 査読有 doi: 10.1371/ journal.pone.0112286.
7. Kusagaya H, Maekawa M, et al.(計 12 人、10 番目) : Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*.50(1) ;30-39,2014 査読有 doi: 10.1165/rcmb.2013-0130OC
8. Kosanam H, Maekawa M, et al. (計 13 人、11 番目) LAMC2: A promising new

pancreatic cancer biomarker identified by proteomic analysis of pancreatic adenocarcinoma tissues. Mol Cell Proteomics 12(10) : 2820-2832, 2013.

査読有 doi:10.1074/mcp.M112.023507.

9. Watanabe Y, Maekawa M: R/G-band boundaries: genomic instability and human disease. Clin Chim Acta 419:108-112, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.cca.2013.02.011.
10. Ohba K, Maekawa M et al. (計 12 人、12 項目) : A sudden onset and the spontaneous remission of severe hypo-high density lipoprotein cholesterolemia without serious underlying disease: A case report Clinica Chimica Acta 426 ; 91-94, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.cca.2013.09.003.
11. Watanabe Y, Maekawa M : Methods and Strategies to Determine Epigenetic Variation in Human Disease. Epigenetics in Human Disease : 7-12, 2012. 査読有 doi:10.1016/B978-0-12-388415-2.00002-0
12. Sato R, Watanabe H, Genma R, Takeuchi M, Maekawa M, Nakamura H : Future perspective on pharmacogenomics of severe hypoglycemia associated with sulfonylureas : reply from the authors. Pharmacogenomics 13(1) : 9-10, 2012. 査読有 doi:10.2217/pgs.11.163

[学会発表](計 6 件)

1. Hamada E, Takayama T, Ozono S, Maekawa M : A case of prostate cancer producing granulocyte colony- stimulating factor. IFCC Worldlab Istanbul 2014 June 22-26, 2014, Istanbul Congress Center, Istanbul Turkey
2. Hamada E, Maekawa M : Analytical evaluation of third-generation allergen-specific IgE assay “3gAllergy™” Measurement by Automated Immunoassey System “IMMULITE 2000XPi”. AACC 2014 Annual Meeting& Clinical Lab Expo July 27-31, 2014, McCormic Place Convention Center, Chicago USA
3. Iino K, Oki Y, Hamada E, Yamashita M, Yogo K, Shibata S, Ohishi T, Kakizawa K, Maekawa M, Risk reductions of arteriosclerosis by normalization of hyperaldosteronism state. -Evaluation with the use of both intima-media thickness (IMT) of carotid artery and biochemical markers-. 2013 ENDO Annual Meetings,

June 15 -18, 2013, San Francisco, USA

4. Maekawa M: Laboratory automation system in molecular diagnostic testing. The 8<sup>th</sup> International Conference of Clinical Laboratory Automation April 12, 2012, Seoul, Korea
5. Maekawa M: Standardization for Laboratory Medicine and National EQA Survey Program in Japan. Korean Association of Quality Assurance for Clinical Laboratory’s 2012 autumn symposium September 14, 2012, Seoul, Korea
6. 佐藤亮介、渡邊裕司、前川真人 他 : 極低出生体重児( Very Low birth weight infant ;VLBW(1500g)の若年成人期における耐糖能。日本糖尿病学会、2012年5月17日、横浜市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

1. 名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

1. 名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
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  
前川 真人(MAEKAWA MASATO)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 20190291
- (2)研究分担者  
渡邊 裕司(WATANABE HIROSHI)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 50262803