

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659511

研究課題名(和文) 早期産児におけるグルココルチコイドレセプター遺伝子メチル化の解析

研究課題名(英文) Postnatal epigenetic modification of glucocorticoid receptor gene in preterm infants

研究代表者

寒竹 正人 (Kantake, Masato)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80327791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：NICUに入院した新生児(早産・低出生体重児)において、グルココルチコイドレセプターという物質の遺伝子が出生後4日間にメチル化という修飾を受けることが判明した。これはその遺伝子の発現が抑制されることを意味しており、グルココルチコイドすなわちステロイドの効果が出にくくなることになる。これは虐待を受けた子のDNAにみられる変化と同じで、将来的な認知能力との関連も示唆されている。今回の研究で解析した症例においてはこの遺伝子変化と入院中のステロイド使用との間に関連がみられており、ステロイド抵抗性との関連が証明された。

研究成果の概要(英文)：Early life experiences influence the physiological and mental health of an individual through epigenetic modification of DNA, which is thought to be highly stable across the lifespan. We calculated the methylation rates in the glucocorticoid receptor (GR) gene promoter in peripheral blood cells which were obtained from a cohort of 40 (20 term and 20 preterm) infants at birth and on postnatal day 4.

The methylation rate increased significantly between postnatal days 0 and 4 in preterm infants, but remained stable in term infants. Thus, the methylation rate was significantly higher in preterm than in term infants at postnatal day 4. Methylation rates at postnatal day 4 predicted the occurrence of later complications during the neonatal period. Our data show that the postnatal environment influences the epigenetic programming of GR expression through methylation of the GR gene promoter in premature infants, which may result in prolonged inflammation in the postnatal period.

研究分野：新生児学

キーワード：エピジェネティクス グルココルチコイドレセプター ステロイド抵抗性

1. 研究開始当初の背景

ストレス反応性の制御においてヒト・ラットで最も研究が進んでいるのがグルココルチコイドレセプター (GR) 遺伝子で、出生後の環境によりプロモーター領域のメチル化が変化しストレス反応性を制御していることが知られている。研究開始前に研究代表者が行った予備実験で、NICU 入院中の早期産児 (在胎 32 週) の末梢血 DNA の GR プロモーターメチル化の解析を行ったところ正常ではメチル化がみられない領域に高いメチル化を示す領域が発見された。この領域は愛情を受けなかったラットや虐待を受けた児で高いメチル化が観察された領域に一致していた。これは NICU に入院するという環境によって児の DNA が変化する可能性を示すものであり、さらに研究を推進することにより環境によるヒトの遺伝子変化を解析するシステムの構築することができ、とさらにその過程に介入することによりストレスに対する病的反応性に対する治療の開発につながるものと考えられた。NICU 入院児においてエピジェネティクスの観点から行った研究はなく、世界初の研究になるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は周産期のストレスによりヒトの将来的な性格 (ストレスに対する反応性) が形成される過程をエピジェネティクスの観点から明らかにし、現在大きな社会問題となっている小児の性格・行動上の問題に対する道標とすることにある。早期産児は出生後に様々な侵襲的医療行為を受ける事や長期間の母子分離に伴い将来的に性格・行動上の問題を呈することが多いことはよく知られている。研究代表者は出生時にすでに DNA 上にその徴候が出現している可能性があることを見出し、胎児期 (羊水) 出生時 (臍帯血) 出生後 (末梢血) にわたる経時的な観察と、出生後の環境設定 (母子接触やディベロップメンタルケア) により性格形成に関する重要な知見が得られるものと期待できる。

3. 研究の方法

対象は NICU に入院した早産・低出生体重児 20 名と正常新生児 20 名で、正常新生児は通常 4 日間の入院ののち母子ともに退院する。その間はなるべく母子接触の時間を長くとり、出生当日から母子の皮膚接触を行い、1 日目は母による授乳を 1 日 4 回、2 日目から母児同室としている。帝王切開のときはやや遅めに母子接触を進めるが、それでも 4 日目には母児同室とし 7 日目に退院としている。生後 4 日目に全員先天代謝異常スクリーニングの採血を施行するため、正常新生児からの検体は日齢 0 の臍帯血と日齢 4 の末梢血とした。この正常新生児の検体をコントロールとして NICU に入院した 37 週未満で出生

した早産・低出生体重児も同様に臍帯血、日齢 4 に末梢血を採取し -80 に保存した。早産児群は少なくとも 4 日間は母子接触は行われておらず、また黄疸や感染症のチェックや血糖値の測定のため 1 日 1~6 回に及ぶ足底からの採血や点滴針の挿入、さらに気管内挿管などの侵襲的処置も行われていた。

具体的な DNA メチル化の解析方法は、凍結保存した末梢血を、ZYMO RESEARCH 社製 EZ DNA Methylation Direct Kit を用いて DNA 抽出と同時に DNA のバイサルファイト処理を行う。バイサルファイト処理とは、DNA 上のシトシンをチミンに変換させる反応で、シトシンがメチル化されているとこの反応がブロックされることから、シトシンのメチル化率を定量化するのに用いられる方法である。今回用いた解析方法は Mquant 法と呼ばれるもので、バイサルファイト処理したのちに目的のプロモーター領域を PCR 法により増幅、増幅した DNA 断片をそのままダイレクトシークエンスを行い、シークエンス波形のピークの高さを計測し、CpG サイトの T の高さの周囲の T の高さに対する比率の逆数をメチル化率として算出した。

4. 研究成果

| | Preterm (n=19) | Term (n=20) | p value (preterm vs term) |
|--------------------------------------|-------------------|----------------|---------------------------------|
| Gestational age (weeks) (Mean ± SD) | 30.8 ± 3.2 | 39.8 ± 1.3 | <0.001 |
| Birth weight (g) (Mean ± SD) | 1431 ± 605 | 3076 ± 271 | <0.001 |
| Intrauterine growth retardation (n) | 7 | 1 | 0.014 |
| Caesarean section delivery (n) | 15 | 3 | <0.001 |
| Apgar score at 1 min (Mean ± SD) | 6.3 ± 2.6 | 9 ± 0 | <0.001 |
| Apgar score at 5 min (Mean ± SD) | 8.4 ± 1.2 | 10 ± 0 | <0.001 |
| Respiratory distress (n) | 10 | 0 | <0.001 |
| Mechanical ventilation (n) | 10 | 0 | <0.001 |
| Intracranial hemorrhage (n) | 0 | 0 | 1 |
| Bacterial infection (n) | 0 | 0 | 1 |
| Antenatal steroid administration (n) | 10 | 0 | <0.001 |

表 1; Participant characteristics

表 1 は対象となった患者のプロフィールである。早産・低出生であることと、出生前にステロイドを投与されている比率が早産児群で高かった。

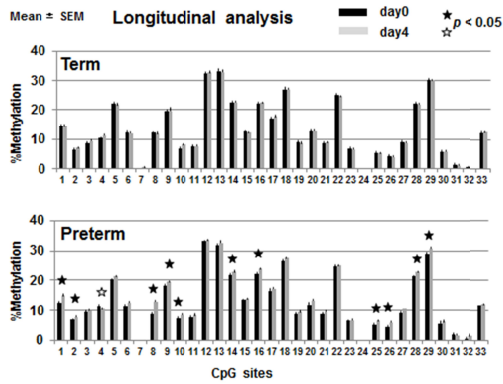


図 1

メチル化率の解析結果を図 1 に示す。図 1 は縦断的解析で横軸の番号はメチル化を受ける 33 か所の CpG サイトの番号で縦軸がメチル化率である。上段の正常新生児では生後 4 日間でメチル化率の変化はみられなかったが、下段の NICU 入院児では のついた 11 か所でメチル化率の有意な上昇が観察された。 のついた 1 か所ではメチル化率が低下していた。

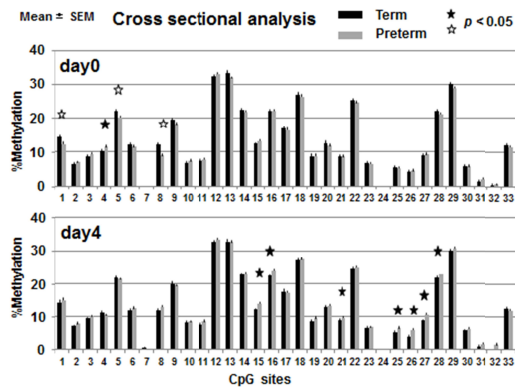


図 2

横断的な解析結果を図 2 に示す。上段の日齢 0 の時点では の 3 か所で早産児の方がメチル化率が低く、 の 1 か所で早産児の方がメチル化率が高かったが、生後 4 日たつと逆転し の 7 か所で早産児の方が高いメチル化を示していた。これは予想通りの結果で、NICU 入院児はわずか生後 4 日間で GR 遺伝子にメチル化が誘導されることが判明した。この変化は将来的にはストレス反応性を制御している可能性があり、早産児とくに 500g 以下で出生するような超低出生体重児が将来発達遅滞を呈し、多動傾向を示すこととの関連が示唆される。今回の検討では将来的な影響まで検索することはできなかったため、入院中の症状との関連を検索した。GR はグルココルチコイド反応性を制御しており、末梢血におけるそれはステロイド抵抗性、慢性炎症として発現してくるであろうことは十分に予想される。実際早産低出生体重児は気管支喘息を発症するリスクが高く、鼻腔のサイトカインなども、成熟児に比して高い状態で推移

することが知られている。NICU 入院中にも実はこういった病態を示すことはよく知られており、代表的なものに慢性肺疾患といわれるものがある。これは未熟な肺が人工呼吸による圧や酸素毒性などで損傷を受け線維化を中心とした慢性炎症が起こり呼吸障害が遷延するものである。治療としてステロイドが著効することが知られている。また同様にステロイド治療が著効する病態として晚期循環不全が知られている。これは一旦安定した超低出生体重児が突然のショック様症状を呈しやはりステロイドが著効し相対的副腎不全と言われている。今回解析した 20 例の早産低出生体重児のなかに、この 2 つの病態のどちらかあるいは両方を発症した例が 4 例あった。この 4 例において特異的にメチル化が高い領域が 1 か所(CpG16)判明した。

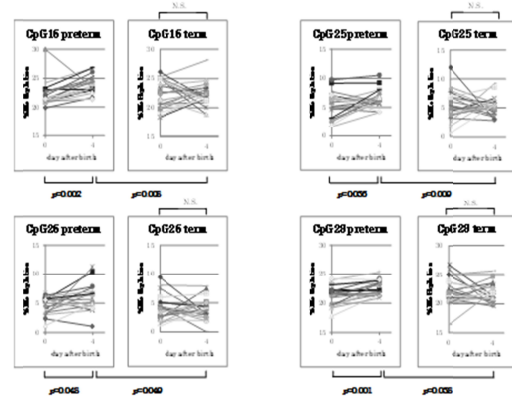


図 3

この CpG16 以外にも出生後 4 日間に有意にメチル化率が上昇し、生後 4 日目に成熟児に対し早産児で高いメチル化がみられた領域が合計 4 か所あった。その変化を図 3 に示すが、このなかで CpG16 だけが炎症に伴って誘導される核内タンパク nerve growth factor inducible protein 1 の結合部位として知られており炎症を収束させる作用に重要な部位である。この部位が特異的にメチル化されることはまさに臨床所見に合致し大変興味深い。

今回の研究により NICU 入院児は入院中に DNA に変化をきたすことが初めて判明し、さらにそれがステロイド抵抗性につながっており今後の新生児医療に対する貢献は計り知れない。新生児医療のみならず、被虐待児などにおいて診断や治療効果の指標になるなど小児医療、さらには社会医学に対するインパクトも多大であると考えられる。今後の課題としてはさらに症例数を増やして解析すること、長期的な臨床所見との関係を解析すること、さらに入院中の環境、特に痛みを伴う処置との関連を検索することでさらなる発展が期待されるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kantake M, Yoshitake H, Ishikawa H, Araki Y, Shimizu T. Postnatal epigenetic modification of glucocorticoid receptor gene in preterm infants: a prospective cohort study. *BMJ Open* 2014; 4: e005318

〔学会発表〕(計4件)

寒竹 正人、大槻 将弘、中村 明日香、中澤友幸、松原 知代、大日方 薫、清水 俊明：早産・低出生体重児におけるグルココルチコイドレセプター遺伝子メチル化の解析。日本小児科学会雑誌 117; 378, 2013.

寒竹正人：新生児末梢血を用いてグルココルチコイドレセプター遺伝子プロモーター領域のメチル化を簡便かつ詳細に解析する方法の確立。日本未熟児新生児学会雑誌 24; 554, 2012.

Kantake M. Perinatal modification of glucocorticoid receptor gene promoter in preterm infants. 11th World Congress of Perinatal Medicine. June19-22, 2013, Moscow, Russia.

寒竹正人：早産・低出生体重児におけるグルココルチコイドレセプター遺伝子メチル化の解析。順天堂医学 58; 459-460, 2012.

〔図書〕(計1件)

寒竹正人 出生後4日間の環境によるヒト新生児のエピジェネティクス - 早産児がグルココルチコイド抵抗性を示すケース - 日本環境ホルモン学会ニュースレター 2014; 17-2: page7

6. 研究組織

(1)研究代表者

寒竹 正人 (KANTAKE, Masato)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80327791

(2)研究分担者

大槻 将弘 (OHTSUKI Masahiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50465051