

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870032

研究課題名(和文)震災後の低出生体重児に關与する要因と胎盤のゲノムインプリンティング

研究課題名(英文)Low-birth-weight neonate at Great earthquake disaster and genomic imprinting in placenta

研究代表者

宮内 尚子(Miyauchi, Naoko)

東北大学・医学系研究科・研究支援者

研究者番号：60596162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低出生体重児は様々な障害の重要な要因で、生活習慣病の発症について懸念されている。本研究では、津波被災地の低出生体重児(172名)を対象に、身体的発育、発達などの観察研究と、子宮内環境について胎盤のエピゲノム変異を用いて評価することを目的とした。対照として正常体重児群(1352名)を登録した。質問票調査と医学的疾患情報を元に、出生体重とそれに関連する要因について検討した。次に、低出生体重児の胎盤細胞を用い、メチル化インプリントの解析を行った。その結果、低出生体重児の発症リスクとして、喫煙の影響が大きい事、胎盤では、およそ80%にメチル化インプリントの変異がある事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The low-birth-weight (LBW) baby have increases due to the in appropriate nourishment, lack of exercise and mental distress in pregnant women. It is thought that LBW baby has been developed to the adult disease; life-style disease, several cancers and mental depression. This finding could be an explanation of the epigenetic effect of the placenta. Firstly, we examined to what factors is associated with the LBW babies. Secondly, we performed genome-wide allelic DNA methylation analyses of purified trophoblast cells from human placentas. RNA sequencing-based allelic expression analyses revealed whether imprinted gene expression is correct or not. We found the LBW risk was associated with smoking and loss of imprinting in their placenta cells (80%).

研究分野：分子生物学

キーワード：産科学 母子保健 エピゲノム インプリンティング 胎盤

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災の被災地では、妊婦への長期にわたる栄養不足、運動不足、心因性ストレス等のマイナスの生活習慣が、妊娠予後や、児の発育に重大な影響を及ぼし、その結果、低出生体重児の増加と妊娠高血圧症の割合が増加していることが判明した。低体重は様々な障害の重要な要因で、将来生活習慣病の発症増加を強く懸念している。また、2割以上の女性が、産後うつ病の疑いがあり、復興を担う若い世代が大きなストレスや不安を抱えている実態が明らかになってきた。

本研究では、津波被災地（石巻医療圏）の低出生体重児を対象に、身体的発育、発達に加え、特に認知行動面をも考慮した徹底的な観察研究を子どもの成長のマイルストーンに照らし戦略的に把握するとともに、喫煙との関連性について調査する。また、低出生体重児の胎盤を用い、インプリント遺伝子のエピゲノム解析を追加して、環境適応の観点から実証的な調査研究を提案する。

2. 研究の目的

東日本大震災の被災地では、低出生体重児の増加が報告されている。低体重は様々な障害の重要な要因で、出生児が成人に達したのち、生活習慣病の発症を増加することが強く懸念されている。本研究では、津波被災地の低出生体重児を対象に、身体的発育、発達に加え、特に認知行動面をも考慮した徹底的な観察研究を子どもの成長のマイルストーンに照らし戦略的に把握すると同時に、子宮内環境について胎盤組織のエピゲノム変異を用いて評価可能か検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 低出生体重児群(172名)、正常体重児群(1352名)を登録した。質問票調査と医学的疾患情報を収集し、統計学的解析を行い、出生体重とそれに関連する要因について検討した。(2) ヒト胎盤特異的なインプリン

ト遺伝子は胎盤形成や胎児成長に関連していることが報告されている。ヒト正常胎盤の構成細胞を高純度に精製し、次世代シーケンサーによりメチローム解析を実施した。低出生体重児の胎盤構成細胞を用い、エピゲノム(メチル化インプリント)の比較解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 縦断的な観察研究：質問票調査、身体的発育及び神経行動学的調査による前向きコホート

対象者の登録：石巻市近辺の住民票を有する妊娠女性1524名を登録。

登録期間：2011年1月～2013年12月

児の登録基準：低出生体重児(2500g未満) 早産児(37週未満)

震災前後の周産期合併症の推移より、震災により一過性に低出生体重児が増加し、ストレスなどの環境変化が原因と考えられる妊娠高血圧症候群の発症頻度の増加が認められた(表1)。

表1 沿岸部の震災前後における周産期合併症

	H23(震災)	H24	H25
分娩数	1824	672	1993
分娩週数	38.8 ± 1.4	38.2 ± 3.2	38.3 ± 2.2
出生体重	3037.99 ± 394.15	2970.51 ± 591.87	3010.27 ± 522.15
SFD児における 正産期割合	65.2%(92) ↑	52.5%(31)	65.5%(95)
正産期における SFD児割合	5.2%	7.0% ↑	6.1%
帝王切開件数	19.3%(353)	20.5%(138)	18.5%(370)
妊娠高血圧 症候群	4.2%(78) ↑	4.0%(26) ↑	2.3%(47)
切迫早産	13.3%(244)	25.0%(168)	21.3%(426)
切迫流産	4.1%(76)	10.2%(69)	12.2%(244)
流産	8.0%(147)	1.6%(11)	0.6%(12)

震災前後の周産期合併症の推移より、震災により一過性に低出生体重児の発症頻度が増加し、ストレスなどの環境変化が原因と考えられる妊娠高血圧症候群の発症頻度の増加を認めた。

低出生体重児の発生リスクは、栄養、受動喫煙の影響が大きいことが推測された($P < 0.01$)。また、広域災害時には栄養学的な環境要因だけでなく、心理的要因も重要であると考えられた(表2)。しかし、震災前のデータがないため、正確には評価できない。今後、復興に向い中長期的に低出生体重児の頻度が改善することを確認していく計画である。

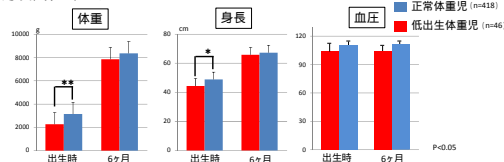
表2 低出生体重児のもたらす要因について(重回帰分析)

	低出生体重児群 (n = 172)	正常体重児群 (n = 1352)
出生体重	2136 ± 455 (1521 - 2498)	3133 ± 352 (2500 - 4602)
初産(経産)	74名(94名) 44%	509名(843名) 37.6%
妊娠前BMI (kg/m ²)	21.3 ± 3.67 (15.4 - 40.1)	21.8 ± 3.8 (14.9 - 44.7)
出産時年齢(歳)	30.7 ± 6.01 (17 - 44)	30.1 ± 5.21 (17 - 48)
妊娠期間中の 体重増(kg)	7.87 ± 4.35 (-6.6 - 25.9)	10.74 ± 4.25 (-9.9 - 32.7) P<0.01
在胎日数	254.3 ± 25.4 (165 - 287)	275.8 ± 8.09 (240 - 295)
学歴 大学以上 (高卒まで)	63名(96名) 39.6%	513名(839名) 37.9%
受動喫煙(Yes)	122名(66%)	703名(52%) P<0.01
本人喫煙(Yes)	20名(11.6%)	162名(12%)
分娩方法:経膈 (c/s)	101名(71名) 58.7%	797名(555名) 59.9%

・受動喫煙を二値化して解析すると、明らかに体重減
 ・出生体重に対して、在胎日数や母親体重増は関連
 ・本人の喫煙習慣との関連性はない
 ・受胎治療の有無や、年齢、分娩方法などは影響せず
 共変量: 母親飲酒習慣(Yes/Noで2値化)、パートナー喫煙
 習慣(「妊娠中も喫煙した」をYesとした)

身体的発育、神経行動学的調査: 出生した児の健康指標として、産科学的指標のみならず出生児の成長と発達を追跡を行うため、神経行動学的な評価として、新生児行動評価(生後3日目)および新版K式発達検査2001(7ヶ月)を実施した。新生児行動評価では、喫煙習慣(自律系の安定性)、アプガースコア(自律系の安定性)、出生体重(原始反射)、出産順位(原始反射)との関連性に加え、罹災状況と原始反射スコアの間に統計学的な関連性が観察されたものの、罹災状況から3群に分けて共分散分析を行うと有意な差は認められなかった。新版K式発達検査では全領域発達指数で出産順位および喫煙習慣との間に関連性が見られたものの、罹災状況との間に関連性は認められなかった。また、身体的発育に関しても、生後6ヶ月で有意差を認めなかった(図1)。

(1) 身長、体重、血圧



(2) 神経行動学的指標

	n	平均(SD)	最小値・最大値	出生体重との関連 r ²	p
新生児行動評価(生後3日目)					
方位反応	314	3.48 (1.21)	1.0-7.0	0.002	0.41
運動	453	3.35 (0.57)	2.0-5.2	0.000	0.91
状態の幅	452	3.35 (1.22)	1.0-5.25	0.001	0.86
状態の調節	451	3.20 (1.05)	1.0-9.0	0.005	0.017
自律系の安定性	449	7.28 (0.67)	3.0-8.5	0.001	0.60
原始反射	454	1.11 (0.28)	0.33-1.85	0.008	0.057
新版K式発達検査(6か月)					
C-A	454	108.9 (10.7)	64-132	0.001	0.45
L-S	453	102.6 (10.6)	62-141	0.002	0.24
P-A	452	97.9 (17.9)	58-161	0.010	0.035
全領域	455	105.0 (10.3)	63-135	0.004	0.16

図1 低出生体重児の身体的発育と精神神経学的発達調査

- 児の成長と発達: 身長、体重、血圧の測定を経時的に実施。生後6ヶ月で、身長、体重差は正常体重児よりも小さいが、有意差を認めなかった。
- 神経行動学的な発達検査: 新生児行動評価を生後3日目に実施開始。新版K式発達検査2001、生後6ヶ月(修正月齢)では、出生体重との関連性に発達指数の比較でも有意差を認めなかった。

(2) 低出生体重児の胎盤のエピゲノム解析

胎盤絨毛細胞の調整: 胎盤絨毛細胞は、3種類のトロフォブラストから構成される。細胞性栄養膜(CT)、絨毛膜外栄養膜(EVT)細胞は、免疫磁気細胞分離法(CD49f と HLA-G 抗体)により1検体につき、95%以上の純度で、10⁷以上の細胞を収集。

合胞体栄養膜(ST)細胞は特異的マーカーであるCD138に対する抗体を用いて免疫染色を行い、純度90%以上であることを確認。さらに、qRT-PCR法を用い、ST細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを示すことを確認した。

胎盤純化細胞の次世代シーケンスを用いた発現解析: 各細胞のGO解析の結果より、細胞の機能的役割を果たす生物学的プロセスを明らかにした。また、CT細胞では、多くのインプリント遺伝子が高発現しており、インプリント遺伝子が重要な役割を果たしている可能性が示唆された(図2)。

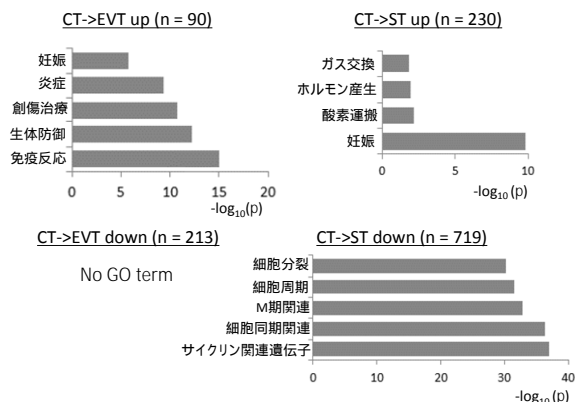


図2 胎盤純化細胞からの遺伝子オントロジー(GO)解析

CT細胞とEVT細胞、CT細胞とST細胞との間で発現が変動した遺伝子のGO解析結果を示す。CT細胞に比べEVT細胞で発現が上昇した遺伝子は、妊娠、炎症反応、創傷治療、生体防御、免疫反応の生物学的プロセスに関連する遺伝子が抽出された。CT細胞に比べST細胞で発現が上昇した遺伝子は、ガス交換、ホルモン産生、酸素運搬、妊娠の生物学的プロセスに関連する遺伝子が抽出された。CT細胞に比べST細胞で発現が減少した遺伝子群は、細胞分裂や細胞周期に関わる生物学的プロセスに関連する遺伝子が抽出された。

ヒト胎盤特異的インプリント遺伝子の網羅的探索: 特定の親由来の遺伝子のみ発現(機能)する現象を遺伝子刷り込み(ゲノムインプリンティング)という。母体血と胎盤CT細胞のDNA多型を利用し、アレル特異的発現解析によりヒト胎盤インプリント遺伝子を単離、同定した。その結果、既知の遺伝子28種類を含む110種類の新規インプリ

ント遺伝子(53種類の父由来アレル発現遺伝子、57種類の母由来アレル発現遺伝子)を同定した。また、一部の遺伝子はクラスターを形成していることを明らかにした。さらに、ヒト胎盤におけるX染色体不活化は、不完全なインプリント型制御(父由来アレル遺伝子の選択的不活化)を受けていることを明らかにした。加えて、X染色体上のインプリント遺伝子を世界で初めて同定した。

メチル化インプリントの網羅的探索:インプリント遺伝子は、生殖細胞形成過程で獲得されるDMRのメチル化によって制御される。本研究で単離したインプリント遺伝子の発現調節にDMRが関与するか全ゲノムDNAメチル化データを用いて解析を行った。その結果、18種類の父由来アレル発現遺伝子のうち、11種類がプロモーター領域に、3種類のgene body領域にDMRが存在することが判明した。一方、11種類の母由来アレル発現遺伝子では、1種類だけGene body領域にDMRが存在した。また興味深いことに、いくつかの母由来アレル発現遺伝子は、DMRを有する父由来アレル発現遺伝子の近傍に存在し、クラスターを形成することを見出した(S1PR2、PDK4およびPROSER2)。これらクラスター内の遺伝子については、1つのDMRが、近傍の複数のインプリント遺伝子を制御している可能性が考えられた。

低出生体重児の胎盤におけるインプリント遺伝子の変化:低出生体重児の胎盤では、環境ストレスの影響を受け、およそ80%のインプリント遺伝子について、児の発育を負にコントロールしていることが明らかとなった。また、遺伝子の発現制御に多くのインプリント領域のDMRのメチル化が関与していることも明らかとなった(図3)。

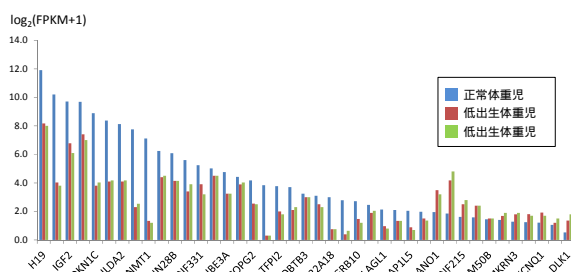


図3 胎盤異常とゲノムインプリンティング
インプリント遺伝子を110種類同定することに成功した。これらの遺伝子のうち88遺伝子が胎盤異常に関わることを明らかにした。

(倫理面への配慮)

本調査は、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得て行った(承認番号2014-1-463、2014-1-331)。調査の集計解析は連結不可能匿名化された状況下で行い、プライバシー保護に万全の配慮を施している。ゲノム解析では、担当医師あるいはGMRC(ゲノムリサーチコーディネーター)から説明、同意を得て行い、匿名化し、東北大学で解析した。結果は、担当医から、患者および家族に口頭で説明することとした。

考察

(1)縦断的な観察研究:

低出生体重児の発生リスクとしては、喫煙の影響が大きいことが推測された。また、広域災害時には栄養学的な環境要因だけでなく、心理的要因も重要であると考えられた。授乳量および授乳期間との関連性、母乳成分と児の身体的および神経行動学的な発達との関連性についても今後解析を進める。母親の食物摂取状況を把握し、予防医学的な知見、保健的介入に資する情報を収集する必要があると考えられた。その成果は、自治体で取り組む災害対策行政の有効性の検証ならびに改善策を提案する。障がいについては、認知行動面、特に最近問題提起されている自閉症またはADHD傾向との関連性について解析する必要がある。そのため新生児行動評価、発達検査、児の将来の知的能力を推定する新奇好性検査を継続する必要がある。

(2)低出生体重児の胎盤におけるエピゲノム異常:

ヒト胎盤におけるインプリント遺伝子は胎盤形成や胎児成長に関連していることが報告されている。本研究において、ヒト胎盤のインプリント遺伝子を網羅的に単離同定することに成功した。その結果、28種類の既知インプリント遺伝子に加え、110種類の新規インプリント遺伝子を同定した。我々のデータは、網羅的にインプリント解析し、どの領域が最も影響を受けるのか明らかにした。ヒト胎盤には、これまで考えられていた以上

に多数のインプリント遺伝子があり、ヒト多様性を示すものと示唆される。また、そのメカニズムの一端も明らかにした。将来は、子宮内環境評価の指標として応用していきたい。

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 3 件)

Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, Arima T. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. **Scientific Reports**. 10(7), 42336, 2016. doi: 10.1038/srep42336. (査読有)

Kitamura A, Miyauchi N, Hamada H, Hiura H, Chiba H, Okae H, Sato A, John RM, Arima T. DNA methylation errors in imprinting disorders and male infertility. **Congenit Anom (Kyoto)**. 55(3), 133-144, 2015. doi: 10.1111/cga.12113. (査読有)

Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. Imprinting methylation errors in ART. **Reproductive Medicine and Biology**. 13(4), 193-20, 2014. doi:10.1007/s12522-014-0183-3. (査読有)

[図書] (計 1 件)

有馬隆博、宮内尚子、北村茜、樋浦仁、岡江寛明、千葉初音、生殖補助医療とインプリンティング異常の予防、Pharma Medica、メディカルレビュー社 34 (4) 2016

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 尚子 (NAOKO, MIYAUCHI)

東北大学・大学院医学系研究科・研究支援者

研究者番号 : 60596162