

## 分担課題:周産期異常の統計解析

研究分担者 田嶋 敦 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授

### 研究要旨

周産期異常を伴う疾患の多くは、その発症に複数の環境要因や遺伝的要因が関わる多因子性を示すことから、その病因病態解明には、詳細で正確な臨床経過情報と、多数の遺伝情報とを同時分析することが可能であるゲノム網羅的アプローチが有効であると考えられる。周産期関連疾患の症例対照研究体制の構築のために、本研究計画では、統計学的観点からの検体収集サポート、ならびに遺伝疫学的解析に必要な統計学的基盤整備を目的とする。本年度は、早産のゲノム全域症例対照関連分析のための研究デザインについて検討し、必要症例数を推定した。

### A. 研究目的

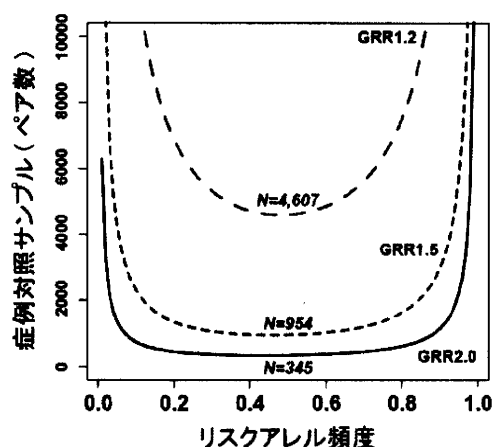
周産期異常を伴う疾患の多くは、その発症に複数の環境要因や遺伝的要因が関わる多因子性を示すと考えられている。従って、その要因解明に向けては、多数要因の同時分析が可能であるゲノム網羅的アプローチが有効であると期待されている。一方、発症に関わると推測されている種々の相互作用(遺伝子-遺伝子、遺伝子-環境)を体系的に分析するための枠組みは十分ではなく、統計学的な観点からの基盤整備も重要な課題となる。本研究では、周産期疾患の病因解明に資する症例収集、ならびに、それら収集サンプルに基づく試験的解析を可能ならしめるための統計学的基盤の整備を目的とする。

### B. 研究方法

ゲノム全域症例対照関連研究における有意水準値を  $10^{-7}$  に設定し、様々な要因寄与率(遺伝子型相対リスク GRR)を仮定し、検出力 80%以上となる症例対照数(ペア数)を統計学的に推定した。

### C. 研究結果

初年度は、アレル頻度が比較的高い(頻度 5%以上)一塩基多型の遺伝子型情報に基づくゲノム全域症例対照関連研究デザインについて検討した。推定結果の一例を右図に示すが、遺伝子型相対リスク GRR 1.5 の疾患関連多型を同定するためには症例対照ともに 1000 例程度以上必要であると推定された。



### D. 考察

周産期異常を伴う疾患に関わる遺伝的要因の網羅的な同定を可能とするために、今後は、より低頻度(1-5%)の関連多型を同定するための研究デザイン、ならびにデータ分析手法について検討を加える。

### E. 結論

正確な臨床情報を伴った高品質の臨床検体を周産期の疾患解析に活用するためには、遺伝子-環境相互作用により発症に関わる因子を体系的に見いだすための統計手法を導入することが重要である。比較的寄与率が高いと推定される周産期関連疾患をモデルケースとし、理論研究だけではなく実践的な研究も進めていく。

### F. 健康危険情報

該当せず。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Low SK, Krischek B, Auburger G, Simon M, Krex D, Arlier Z, Nayak N, Ruigrok YM, Niemelä M, Tajima A, von und zu Fraunberg M, Dóczy T, Wirjatijasa F, Hata A, Blasco J, Oszvald A, Kasuya H, Zilani G, Schoch B, Singh P, Stüer C, Risselada R, Beck J, Sola T, Ricciardi F, Aromaa A, Illig T, Schreiber S, van Duijn CM, van den Berg LH, Perret C, Proust C, Roder C, Ozturk AK, Gaál E, Berg D, Geisen C, Friedrich CM, Summers P, Frangi AF, State MW, Wichmann HE, Breteler MM, Wijmenga C, Mane S, Peltonen L, Elio V, Sturkenboom MC, Lawford P, Byrne J, Macho J, Sandalcioğlu EI, Meyer B, Raabe A, Steinmetz H, Rüfenacht D, Jääskeläinen JE, Hernesniemi J, Rinkel GJ, Zembutsu H, Inoue I, Palotie A, Cambien F, Nakamura Y, Lifton RP, Günel M. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet* 42(5), 420–425, 2010.
- 2) Krischek B, Tajima A, Akagawa H, Narita A, Ruigrok Y, Rinkel G, Wijmenga C, Feigl GC, Kim CJ, Hori T, Tatagiba M, Kasuya H, Inoue I. Association of the Jun dimerization protein 2 gene with intracranial aneurysms in Japanese and Korean cohorts as compared to a Dutch cohort. *Neuroscience* 169(1), 339–343, 2010.
- 3) Nakaoka H, Takahashi T, Akiyama K, Cui T, Tajima A, Krischek B, Kasuya H, Hata A, Inoue I. Differential effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: site distribution. *Stroke* 41(8), 1593–1598, 2010.
- 4) Akiyama K, Narita A, Nakaoka H, Cui T, Takahashi T, Yasuno K, Tajima A, Krischek B, Yamamoto K, Kasuya H, Hata A, Inoue I. Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J Hum Genet* 55(10), 656–661, 2010.
- 5) Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A, Mizuki N, Ohono S, Inoue I, Inoko H. *TRIM39* and *RNF39* are associated with Behçet's disease independently of *HLA-B\*51* and *-A\*26*. *Biochem Biophys Res Commun* 401(4), 533–537, 2010.
- 6) Tabara Y, Kohara K, Kita Y, Hirawa N, Katsuya T, Ohkubo T, Hiura Y, Tajima A, Morisaki T, Miyata T, Nakayama T, Takashima N, Nakura J, Kawamoto R, Takahashi N, Hata A, Soma M, Imai Y, Kokubo Y, Okamura T, Tomoike H, Iwai N, Ogihara T, Inoue I, Tokunaga K, Johnson T, Caulfield M, Munroe P; Global Blood Pressure Genetics Consortium, Umemura S, Ueshima H, Miki T. Common variants in the *ATP2B1* gene are associated with susceptibility to hypertension: the Japanese Millennium Genome Project. *Hypertension* 56(5), 973–980, 2010.
- 7) Adachi S, Tajima A, Quan J, Haino K, Yoshihara K, Masuzaki H, Katabuchi H, Ikuma K, Suginami H, Nishida N, Kuwano R, Okazaki Y, Kawamura Y, Sasaki T, Tokunaga K, Inoue I, Tanaka K. Meta-analysis of genome-wide association scans for genetic susceptibility to endometriosis in Japanese population. *J Hum Genet* 55(12), 816–821, 2010.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 分担課題:胎児炎症反応症候群の解析

研究分担者 柳原 格 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 部長

### 研究要旨

疫学的に *Ureaplasma* spp.と流早産の関連や、その病原因子の同定を行った。*Ureaplasma parvum* のリポ蛋白質、あるいはその一部合成リポペプチドは培養細胞においては炎症反応を惹起し、また妊娠マウスへの投与では胎仔死亡が引起された。

日本人習慣流産患者に多く認められるアネキシン A5 遺伝子の SNP を同定した。このことにより、あらたな治療戦略の可能性が示唆された。

### A. 研究目的

①一般に低病原性細菌の証明は困難である。ヒトの *Ureaplasma* spp.は、分離、培養や血清学的診断が難しく、また健康成人生殖器内より高率に(40-80%)分離されることから、正常細菌叢を形成する細菌の一種と認識されていることも多い。従って、その病原性については長らく議論が続いてきた。本研究では、*Ureaplasma* spp.と絨毛膜羊膜炎(CAM)との関連を疫学的に解析し、病原因子の探索を行い、流早産起因菌であるか否かを示す。

②これまで胎児炎症反応症候群(FIRS)患者では臍帯血中 IgM が高いこと、そしてこの IgM の主要な標的の一つはアネキシン A2 であることを報告してきた(Namba F, Ped Res, 2006)。今回は、アネキシンファミリーの一つであるアネキシン A5 遺伝子の SNP がわが国の原因不明の習慣流産患と関連するか否かを解析する。

### B. 研究方法

①改良型ウレアプラズマ培地を作製し、前方視的に流早産胎盤(151例) *Ureaplasma* spp.の培養を行い疫学的に CAM と *Ureaplasma* spp.の関連性を解析した。*Ureaplasma* spp 感染胎盤の病理的な解析を行った(Namba & Hasegawa, Ped. Res. 2010)。

以前よりマイコプラズマのリポ蛋白質は TLR2, TLR6 に結合し、炎症反応シグナルを細胞内に伝えていることが知られている。そこで、

*Ureaplasma parvum* 培養液より、TritonX-114 二層分離法によりリポ蛋白質を精製した。また、リポ蛋白質の N 末端アミノ酸をジアシル化したりリポペプチドを合成した。TLR2 を導入した HeLa 細胞をリポ蛋白質及び、合成リポペプチドで刺激し、NF- $\kappa$ B 活性を測定した。次にリポ蛋白質及び、合成リポペプチドを妊娠 15 日目のマウスの子宮内に投与し、妊娠 18 日目における胎仔・胎盤への影響を調べた。

②アネキシン A5 の転写量を規定すると考えられるアネキシン A5 遺伝子のプロモーター領域の SNP 解析をおこなった。(藤田保健衛生大、倉橋教授らとの共同研究)

### 倫理面への配慮

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針を遵守する。本研究内容は、大阪府立母子保健総合医療センターの承認を受けた(承認番号 204, 214-2)。

### C. 研究結果

① *Ureaplasma* spp. や *Mycoplasma hominis* の分離を行ってきた。前方視的に行った流早産胎盤(151例)の *Ureaplasma* spp.の培養では 42%が培養陽性であった。疫学的に CAM と *Ureaplasma* spp. 培養陽性の関連性を示した。また、*Ureaplasma* spp.感染胎盤において特徴的な二層性の好中球浸潤像を見出した(Namba & Hasega-

wa, Ped. Res. 2010)。

リポ蛋白質は NF- $\kappa$ B を対照群に比べ 8 倍活性化した ( $P < 0.0001$ )。一方、合成リポペプチドは対照群に比べ 24.9 倍 NF- $\kappa$ B を活性化した ( $P = 0.0122$ )。しかしながら、LPS と異なり、加熱したリポペプチドは NF- $\kappa$ B の活性化能は半分程度に減じた。妊娠マウスへのリポ蛋白質の子宮内投与では、38.5% (20/52) の胎仔死亡が確認され、対照群の 14.0% (7/50) を有意に上回った ( $P = 0.005$ )。合成リポペプチドにおいても、57.9% (11/19) の胎仔死亡が確認され、対照群の 18.1% (4/22) を有意に上回った ( $P = 0.009$ )。病的には、螺旋動脈の虚血、迷路部の絨毛萎縮や虚血などの所見が認められ、胎仔死亡を引起したものと考えられた。

②アネキシン A5 の SNP 解析の結果、習慣流産の女性患者の 10-20% が高リスク型を持っていた。この、高リスク型 SNP は習慣流産のリスクを約 2 倍増加させた。

#### D. 考察

*Ureaplasma* spp. の病原因子を同定し、病原性を証明した。疫学的なデータとあわせて考えると、*Ureaplasma* spp. が胎児炎症反応症候群を引起す(感染性流産)には、腔内から分離されることよりも、*Ureaplasma* spp. が子宮内に到達して胎盤において分離されることが重要であると考えられた。

さて、Kaandrop SP らは、原因不明の不育症に抗凝固療法は効果がなかったと報告した (NEJM, 362, 1586-96, 2010)。しかしながら、我々の研究は、これまで原因不明されてきた習慣流産患者においてアネキシン A5 の遺伝子多型を調べて、高リスク型を持つ患者に対して抗凝固療法をおこなう治療の可能性を示した。アネキシン A5 は胎盤の胎児側表面をおおって、母体血が胎盤の表面で凝固することから保護する作用を持つ。あるいは、アネキシン A5 プロモーター領域の SNP を持つ女性は、通常型の女性よりもアネキシン A5 産生量が低く、胎盤内で血液が凝固しやすくなり、胎児の発育が阻害され、流産の回数が増えるのかも知れない。今後の解析が必要である。

#### E. 結論

*Ureaplasma* spp. の病原因子を同定し、長らく議論されてきた病原性を証明した。

習慣流産の女性に対して、アネキシン A5 遺伝子の SNP を利用して治療法を選択するという、いわゆる「習慣性流産のパーソナライズド医療」への第一歩として期待される結果となった。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y., Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, **Yanagihara I**, Saito S, Tsutsumi Y : Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. Nature Nanotechnology, in press.
- 2) Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kato T, Pryor-Loishi K, Nakanishi I, Fujita T, Imayoshi Y, Markoff A, **Yanagihara I**, Udagawa Y, Kurahashi H. Polymorphism in *annexin A5* gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. Molecular Human Reproduction, in press.
- 3) Nozaki M, Wakae K, Tamaki N, Sakamoto S, Ohnishi K, Uejima T, Minato N, **Yanagihara I\***, Agata Y. Regulation of T cell receptor V $\gamma$ 2 gene rearrangement by the Helix-Loop-Helix protein, E2A. International Immunology, in press
- 4) Ohnishi K, Nakahira K, Unzai S, Mayanagi K, Hashimoto H, Honda T, **Yanagihara I\*** Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiology letters, in press
- 5) **Yanagihara I\***, Nakahira K, Yamane T, Kaieda S, Mayanagi K, Hamada D, Fukui T, Ohnishi K,

- Kajiyama S, Shimizu T, Sato M, Ikegami T, Ikeguchi M, Honda T, Hashimoto H. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin. The Journal of Biological Chemistry, 285(21), pp16267-74, 2010
- 6) Nishihara M, Sonoda M, Matsunami K, Yanagihara K, Yonemoto N, Ida S, Namba F, Shimomura I, **Yanagihara I\***, Waguri M. Birth length is a predictor of adiponectin levels in Japanese young children. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 23, pp913-920, 2010
  - 7) Nishihara M, Yamada M, Nozaki M, Nakahira K, **Yanagihara I\***. Transcriptional regulation of the human *establishment of cohesion 1 homolog 2* gene. Biochemical and Biophysical Research Communications, 393(1), pp111-7, 2010
  - 8) Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, **Yanagihara I\***. Placental features of chorioamnionitis colonized with *Ureaplasma* species in preterm delivery. Pediatric Research, 67(2), pp166-72, 2010
  - 9) Hamada D, Hamaguchi M, Suzuki KN, Sakata I, **Yanagihara I**. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a case for EspB as an intrinsically less-ordered effector. FEBS J, 277(11), pp2409-15, Review, 2010
  - 10) 橋本博、山根努、池口満徳、中平久美子、**柳原格**. 「腸炎ビブリオが産生する耐熱性溶血毒 TDH の構造と機能」. 日本結晶学会誌、52, 285-289, 2010
- ## 2. 学会発表
- 1) 太田小百合、宮村浩徳、西澤春紀、稲垣文香、江草悠美、藤田富雄、**柳原格**、宇田川康博、倉橋浩樹. 「習慣流産におけるアネキシン A5 遺伝子多型の検討」、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010.12.7 - 10、神戸、ポスター
  - 2) **柳原格**、中平久美子、大西紀陽久、本田武司. 「腸炎ビブリオの産生する TDH の構造学的解析」、第 83 回日本細菌学会総会、2010.3.27-29、横浜、ワークショップ口演&ポスター
  - 3) **柳原格**、中平久美子、大西紀陽久、真柳浩太、橋本博、本田武司. 「腸炎ビブリオの産生する thermostable direct hemolysin (TDH) の構造学的解析」、第 57 回トキシシンポジウム、2010. 7. 14-16、大津、オーラル
  - 4) **柳原格**. 「ウレアプラズマ感染 一流早産そして次世代への影響—」、第 37 回日本マイコプラズマ学会 2010.6.10-11、東京、シンポジスト
  - 5) 北島博之、**柳原格**. 「ウレアプラズマ感染早産胎盤における絨毛膜羊膜炎の病理像」、近畿腸管微生物研究会、2010.6.5、大阪、口演
  - 6) **柳原格**. 「LPS 誘導性早産モデルマウスに対するチオレドキシンの有効性」、京都大学ウイルス研究所ミニシンポジウムレドックス生命医学の展望 (ATL Allergy TRX)、2010.3.15、京都、招待講演
  - 7) 内田薫、清水隆、**柳原格**. 「妊娠マウスを用いた *Ureaplasma parvum* 由来 multiple banded antigen (MBA) による胎内炎症惹起機構の解明」、第 37 回日本マイコプラズマ学会、2010.6.10-11、東京、オーラル
  - 8) 内田薫、野崎昌俊、**柳原格**. 「妊娠マウスを用いた *Ureaplasma parvum* による胎内炎症惹起機構の解明を目指して」、第 46 回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、オーラル&ポスター
  - 9) 味村和哉、藤田富雄、中山雅弘、光田信明、**柳原格**. 「当センターの原因不明不育症患者における 1st trimester 流産検体の病理学的所見の分類」、第 46 回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、オーラル&ポスター
  - 10) 奥山宏臣、清水義之、佐々木隆士、内田薫、**柳原格**、稲村昇. 「胎児消化管におけるサーフ アクタント蛋白質 A と D の局在と産生に関する検討」、第 46 回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、オーラル&ポスター
  - 11) 野崎昌俊、難波文彦、内田薫、西原正泰、**柳原格**. 「Lipopolysaccharide(LPS)誘発早産モデルマウスにおけるチオレドキシシン (TRX) の早産抑制効果」、第 46 回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、ポスター

- 12) 野崎昌俊、柳原格、縣保年「bHLH 転写因子 E2A による Vγ2 遺伝子再構成の制御機構」、第 20 回 Kyoto T cell Conference、2010.6.4-5、京都、オーラル
- 13) 宮村浩徳、西澤春紀、稲垣文香、江草悠美、藤田富雄、柳原格、宇田川康博、倉橋浩樹。「アネキシン A5 遺伝子多型と習慣流産の関連」、第 55 回日本人類遺伝学会総会、2010.10.28-30、大宮、ポスター
- 14) Hiroshi Hashimoto, Kumiko Nakahira, Tsutomu Yamane, Takashi Fukui, Kiyohisa Ohnishi, Toshiyuki Shimizu, Takeshi Honda, Mitsunori Ikeguchi, Mamoru Sato, Itaru Yanagihara. 「Structural study of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*」、日本生物物理学会総会、2010. 9-20-22、仙台、ポスター
- 15) Masatoshi Nozaki, Nobuyuki Tamaki, Shuji Sakamoto, Itaru Yanagihara, Yasutoshi Agata. 「Regulation of Vγ2 gene rearrangement by the helix-loop-helix protein, E2A」14<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2010.8.22-17、神戸、ポスター
- 16) Itaru Yanagihara. 「The pathological findings and molecular mechanisms of *Ureaplasma* spp. infection in preterm delivery」7<sup>th</sup> European Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynaecology (ESIDOG), 2010.10.2-5, Trieste, Italy, Invited Speaker
- 17) Mitsuhide Hamaguchi, Yoshinori Muraio, Masahiro Tanaka, Noriko Tsuda, Toshihumi Uejima, Katsuyuki Maruyama, Itaru Yanagihara, Ikuhiro Sakata. 「The mRNA expression of fatty acid amide hydrolase in human whole blood may correlate with recovery in patients with sepsis」第 38 回日本救急医学会学術集会、2010. 10. 9-11、東京、ポスター

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許公開 2010-90055、淀井淳司、三浦美樹子、柳原格、難波文彦、中平久美子。母体投与用薬実用新案登録
  2. その他
- (1)「習慣流産の遺伝子発見」2011.2.2.

(新聞報道)

毎日朝刊、中日朝刊、朝日朝刊

(web page)

日本経済、朝日、毎日、中日、47NEWS(共同通信)、東京、大阪日日、京都、その他

#### (2)細菌毒素の研究

1. 加熱しても消えない、食中毒原因菌・腸炎ビブリオの毒性に迫れ！！  
SPring-8 NEWS「研究成果・トピックス欄」  
2011年3月55号掲載予定
2. 「加熱で再び毒性」の謎解明、  
朝日新聞科学欄、2010.5.25
3. 「食中毒原因菌の腸炎ビブリオの毒性は加熱してもなぜ消えないのか？ - 腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒 (TDH) の構造解明」SPring-8 ホームページ、プレスリリーストピックス、2010.5.21  
[http://www.spring8.or.jp/ja/news\\_publication/s/press\\_release/2010/100521](http://www.spring8.or.jp/ja/news_publication/s/press_release/2010/100521)
4. 「食中毒の原因、腸炎ビブリオ～加熱しても毒が消えない理由～」、播磨科学公園都市・研究最前線 28、バンカル(神戸新聞)、77 秋号、pp74-77、2010
5. 「加熱すると毒性が戻る不思議な菌：感染症と災害(2)」、アピタル、エマージェンシー・コール、朝日新聞ホームページ  
asPara クラブ、2010.6.26

## 分担課題:周産期異常のコホート研究体制の確立

研究分担者 齋藤滋 富山大学大学院医学薬学研究部産婦人科学 教授

### 研究要旨

周産期の疾患は、多彩な病因病態を背景に持ち、疫学的な研究体制による要因の分析と対策の構築は、今後の周産期医療の発展に必要不可欠である。本研究班では、前向きコホート研究デザインにより、妊産婦の細菌性膣症・頸管炎等の「感染症要因」、喫煙・ダイエット等の「ストレス要因」、不妊治療等の「医原性要因」、そして「遺伝的要因」について全国規模の調査を行ってデータベースを構築し、前方視的に周産期における疾患(早産や低出生体重児等)のリスク因子を抽出した後に、これらの予知・予防対策の立案を最終目的とする。

### A. 研究目的

日本における早産・低出生体重児の「感染症要因」「ストレス要因」「医原性要因」等の諸要因を前方視的な全国調査により早産・低出生体重児と最も関連する因子を抽出し、早産、低出生体重児予防に向けた具体的な対応策を提言することを目的とする。併せて、日本各地におけるデータベースを構築して 10 年後、20 年後の状況と比較できる基礎資料を作成する。

### B. 研究方法

#### 1. 研究デザイン

前向きコホート研究を行い、妊婦初期に妊産婦を登録し種々の要因を調査した上で、早産・低出生体重児と関連する因子を抽出し、併せてデータベースを構築する。

#### 2. 研究対象

以下の選択基準を全て満たす妊産婦を対象とする

- (1) 妊娠 13 週 0 日未満に受診した妊産婦
- (2) 本試験の参加にあたり、詳細な説明をけた後、その主旨を十分に理解し、自筆による同意文書が得られた妊産婦(20 歳未満の場合は配偶者(20 歳以上の)または親権者の文書同意が得られた者)

#### 除外基準

- (1) 妊娠 22 週 0 日までに流産に至った症例
- (2) 担当医師が不適切と判断した場合  
中止・脱落基準

(1) 本研究から離脱するとの申し入れがあった場合

(2) 妊娠経過中連絡が取れない、もしくは受診しなくなった場合

### 3. 研究のアウトライン

#### 1) 問診表による背景因子の調査

外来担当医が研究の説明を行なった後に、研究に同意していただいた参加者に同意書を手渡し、記載していただく。担当医は登録番号を記載し、データをインターネット経由で入力する。問診表は第 3 者への開示はせず電子カルテにも記載しない。参加施設代表者は責任を持って問診表を管理し、情報の漏洩がないようにする。

#### 2) 観察スケジュール

初診時(妊娠 12 週 6 日まで)

問診表を参加者に手渡し、担当医師が情報を記載する。

- ① 身長
- ② 体重(非妊時)
- ③ 妊娠歴(流・早産歴、死産歴、FGR 歴、妊娠高血圧既往歴)
- ④ 円錐切除術歴の有無
- ⑤ 嗜好(喫煙、飲酒)
- ⑥ 不妊治療の有無
- ⑦ 子宮内妊娠の確認
- ⑧ 母体基礎疾患の有無
- ⑨ 収入、教育歴、労働環境、服薬歴の確認

#### 妊娠 8～12 週

- ① 頸管分泌物 Gram 染色(タッチスメア)  
(Nugent score、ラクトバチルスの消失、好中球増加)「三菱化学メディエンス(株)」
- ② 超音波断層法による妊娠週数の確定
- ③ 感染症のチェック

#### 妊娠 20～24 週

- ① 頸管分泌物 Gram 染色「三菱化学メディエンス(株)」
- ② 頸管粘液の採取(IL-8, IL-6, sIL-6R, Cp, fFN, IGF-BPI, Lf 測定、GE 測定、プロテオミクス解析)
- ③ 子宮頸管長の測定

#### 妊娠全期間

- ① 妊娠合併症の有無

#### 分娩後

- ① 分娩週日(早産の際は人工早産か自然早産か)
- ② 分娩時母体年齢
- ③ 分娩時母体体重、体重増加
- ④ PROM の有無
- ⑤ 単胎妊娠か多胎妊娠か
- ⑥ 分娩様式
- ⑦ 陣痛促進剤の有無
- ⑧ 早産例、低出生体重児には、卵膜、胎盤(脱落膜、絨毛膜、羊膜を含む)、臍帯の病理を提出する。絨毛膜羊膜炎の評価は Blanc の分類で、臍帯炎の評価は中山の分類(中山雅弘他 産婦治療 56: 410-413, 1988)で行なう。
- ⑨ 臍帯血 2ml
- ⑩ 母体末梢血 2ml

#### 新生児

- ① 胎数
- ② 性別
- ③ 身長
- ④ 体重
- ⑤ 頭周囲径
- ⑥ 胸囲
- ⑦ Apgar 値
- ⑧ 胎盤重量
- ⑨ LFD(SGA), AFD(AGA), HFD(LGA)の有無

- ⑩ 児の転帰
- ⑪ 児の NICU 管理有無
- ⑫ 児の合併症
- ⑬ 新生児の転帰

#### 4. 倫理面への配慮

倫理面においてはヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する指針を遵守する。本研究内容は、富山大学臨床・疫学研究等に関する倫理審査委員会の承認を受けた(富山大学臨床・疫学研究等に関する倫理審査委員会 承認番号 臨認22-31号)。

#### C. 研究結果

初年度は、主に検体収集体制の構築を行った。研究協力機関7箇所、すでに本研究を行うための倫理申請承認を終了し、検体の収集が開始されている。また、研究告知の為のパフレット等を作成した。

#### D. 考察

従来に疫学的解析に加え、ヒトゲノム・遺伝子解析を行う為、各協力医療機関で慎重な倫理的な取り扱いが求められ、その対応準備に多くの時間が割かれた。

#### E. 結論

周産期の前向きコホート研究は、国内で類似の研究が少なく、さらに遺伝的な解析を併せて行う研究は類例がない。本研究の遂行によって質の高いデータベースを構築し、リスク因子の抽出により周産期医療への応用展開を目指す。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shiozaki A., Matsuda Y., Hayashi K., Satoh S., Saito S.: Comparison of risk factors for major obstetric complications between Western countries and Japan: A case-cohort study. J Obstet Gynecol. Res. in press.
- 2) Saito S., Nakashima A., Shima T.:



- Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies. *J Reprod Immunol.* in press.
- 3) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y. : Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice., *Nature Nanotechnology (Nat. Nanotechnol.)*, in press.
  - 4) Molvarec A, Blois M S, Stenczer B, Toldi G, Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vásárhelyi B, Rigó J., Saito S. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin. Immunol* in press.
  - 5) Matsuda M., Kawamichi Y., Shiozaki A., Saito S., Hayashi H.: Comparison of risk factors for placental abruption and placenta previa : case-cohort study. *J Obstet Gynecol. Res.* in press.
  - 6) Hayashi K., Matsuda Y., Kawamichi Y., Shiozaki A., Saito S.: Smoking during pregnancy increases risks of various obstetric complications: A case-cohort study of the Japan Perinatal Registry Network Database. *J Epidemiol.* 2011; 21:61-66.
  - 7) Yoneda S., Shiozaki A., Shima T., Ito M., Yamanaka M., Hidaka T., Sumi S., Saito S.: Prediction of exact delivery time in patients with preterm labor and intact membranes at admission by amniotic fluid interleukin-8 level and preterm labor index. *J Obstet Gynecol. Res.* in press.
  - 8) Lin Y., Li C., Shan B., Wang W., Saito S., Xu J., Di J., Zhong Y., Li D.J.: Reduced stathmin-1 expression in NK cells associated with spontaneous abortion. *Am J Pathol.* 178:506-514,2011.
  - 9) Saito S., Shima T., Nakashima A., Lin Y.: Immune surveillance during pregnancy. *Ind. J. Physiol. Pharmacol.* 54:60-63, 2010.
  - 10) Molvarec A., Ito M., Shima T., Yoneda S., Toldi G., Stenczer B., Vásárhelyi B., Rigó J. Jr, Saito S.: Decreased proportion of peripheral blood vascular endothelial growth factor-expressing T and natural killer cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 203: 567.e1-567.e8, 2010.
  - 11) Saito S.: Th17 cells and regulatory T cells: New light on pathophysiology of preeclampsia. *Immunology and Cell Biology. News and Commentary.* 88:615-617, 2010.
  - 12) Shiozaki A., Yoneda S., Soeda Y., Saito S.: Antenatal diagnosis of Breus' mole by ultrasonography. *Jpn. J. Obstet. Gynecol. Neonatal Hematol.* 19:43-50, 2010.
  - 13) Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M.: Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 63:601-610, 2010.
  - 14) Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., Ishii N., Sugamura K., Saito S.: Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice. *J. Reprod Immunol* 85:121-129,2010.
  - 15) Nakashima A., Ito M., Shima T., Bac N.D., Hidaka T., Saito S.: Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am J Reprod Immunol.* 2010: 64:4-11.
  - 16) Nakashima A., Ito M., Yoneda S., Shiozaki A., Hidaka T., Saito S.: Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am J*

- Reprod. Immunol.* 63:104-109, 2010.
- 17) Ito M., Nakashima A., Hidaka T., Okabe M., Bac N.D., Ina S., Yoneda S., Shiozaki A., Sumi S., Tsuneyama K., Nikaido T., Saito S.: A role for IL-17 in induction of an inflammation at fetomaternal interface in preterm labour. *J.Reprod Immunol.* 84:75-85, 2010.
  - 18) 齋藤 滋: わが国における早産の現状と将来. 産婦人科治療, 100 : 23-27, 2010.
  - 19) 齋藤 滋, 島 友子, 中島彰俊: 着床、妊娠維持における制御性(regulatory)T細胞の重要性. 医学のあゆみ, 233 : 129-134, 2010.
  - 20) 齋藤 滋: A: 予知・予防の進歩 2.早産の予防 (2) 細菌性陰症: わが国の現状と対策. 「母子保健情報第 61 号」12-16, 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課恩賜財団母子愛育会, 東京, 2010.
  - 21) 塩崎有宏, 伊藤実香, 米田徳子, 山中美樹子, 米田 哲, 齋藤 滋: 細菌性陰症と切迫早産. 産婦人科の実際, 59: 875-881, 2010.
  - 22) 島 友子, 中島彰俊, 齋藤 滋: 凝固系と炎症反応. 産科と婦人科, 77:956-962, 2010.
  - 23) 齋藤 滋: 免疫機構からみた妊娠高血圧症候群. 産婦人科の実際, 59:1013-1018, 2010
  - 24) 島 友子, 中島彰俊, 齋藤 滋: 胎盤と免疫. 周産期医学, 40:1037-1042, 2010.
  - 25) 塩崎有宏, 齋藤 滋: 抗嫌気性菌抗生物質(フラジール・クリンダマイシン)による細菌性陰症治療効果. 産婦人科の実際, 59: 1345-1351, 2010.
  - 26) 米田 哲, 米田徳子, 齋藤 滋: 頸管無力症既往妊婦の管理方針について. 産婦人科の実際, 59:1793-1796, 2010.
  - 27) 齋藤 滋, 中島彰俊, 島 友子: 妊娠と免疫. 周産期医学, 40:1569-1573, 2010.
2. 学会発表
- 1) Saito S. Prevention of Preterm Birth and Treatment for Women in Preterm Labor. 2010 Vietnam Immunology meeting, Hanoi, 2010, 3, 4-5. (Invited)
  - 2) Saito S. Regulatory T and NK cells during pregnancy. 2010 Vietnam Immunology meeting, Hanoi, 2010, 3, 4-5. (Invited)
  - 3) Saito S. What is the role of immune system in the pathogenesis of pre-eclampsia? 2010 Vietnam Immunology meeting, Hanoi, 2010, 3, 4-5. (Invited)
  - 4) Saito S.: Prevention of preterm birth and treatment for women in preterm labor. 2010, Lecture at Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, 2010, 4, 8-11, Shanghai. (Invited)
  - 5) Saito S.: Regulatory T and NK cells during pregnancy. Lecture at Fudan University, 2010, 4, 8-11, Shanghai. (Invited)
  - 6) Saito S.: Immunoregulation in human and mouse pregnancy. *Immunologie van de voortplanting* 2010, 2010, 5, 26, Netherlands. (Invited)
  - 7) Saito S.: The role of NK cells and T cells in the pathogenesis of preeclampsia. 7th International Workshop on Immunology of Pregnancy/Preeclampsia, 2010, 8, 8-12, Tioman Island, Malasia. (Invited)
  - 8) Saito S.: The role of regulatory NK cells and regulatory T cells in the maintenance of pregnancy. XI International Congress of Reproductive Immunology, 2010, 8, 15-19, Queensland, Australia. (Invited)
  - 9) Saito S., Nakashima A., Shima T., Molvarec A.: What is the role of immune system in the pathogenesis of preeclampsia? Int. Symp. for Immunol. of Reprod (ISIR-Osaka 2010) 25th Annual Meeting of Japan Soc. for Immunol of Reprod., 2010, 8, 28-29, Osaka. (Invited)
  - 10) Saito S., Shima T., Nakashima A.: Beyond

Th1/Th2 - Leucocyte polarization in pregnancy. 8th European Congress on Reproductive Immunology, 2010, 11, 11-14, Munich. (Invited)

- 11) Saito S: Paternal antigen specific Treg cells proliferate in uterine draining lymph nodes before the implantation and in the uterus after the implantation. 2010.11.29-12.2, Shanghai (Invited)
- 12) 齋藤 滋: 早産について考える. 前期山梨県産婦人科集談会, 2010, 6, 4, 山梨. (招待講演)
- 13) 齋藤 滋: 早産について考える. 広島県南部地区産婦人科医会学術講演会, 2010, 6, 18, 広島. (招待講演)
- 14) 齋藤 滋: 早産について考える. 第23回福井県母性衛生学会, 2010, 6, 27, 福井. (招待講演)
- 15) 齋藤 滋: 日本における早産の実態と早産予防対策. 京都産婦人科医会, 2010, 7, 17, 京都. (招待講演)
- 16) 齋藤 滋, 中島彰俊: The role of autophagy on the invasion of extravillous trophoblast -絨毛外栄養膜細胞浸潤におけるオートファジーの役割-. 第69回日本癌学会学術集会, 2010, 9, 9, 23, 大阪.
- 17) 齋藤 滋: 不育症と免疫. 大阪府産婦人科懇話会, 2010, 9, 25, 大阪. (招待講演)
- 18) 齋藤 滋: 腫瘍免疫と妊娠免疫の類似性. 関西臨床腫瘍研究会, 2010, 10, 29, 京都. (招待講演)
- 19) 齋藤 滋: 本邦における早産・低出生体重児の急激な増加についていかに対応すべきか. 第55回日本未熟児新生児学会学術集会, 2010, 11, 5, 神戸. (招待講演)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 分担課題:周産期異常症例の大規模検体収集体制の確立

研究分担者 和氣徳夫 九州大学大学院生殖病態生理学 教授  
田中守 慶應義塾大学医学部産婦人科 講師

### 研究要旨

周産期の異常の多くは、複数の環境要因や遺伝要因の関与する多因子疾患であり、コホート研究で得られるような詳細で正確な臨床経過情報が重要である。その一方で、多因子疾患で同定される関連因子の多くは寄与率が低く、関連解析で十分な検出力を期待するには、多数(多くは千例規模)の疾患集団の解析が必要とされる場合が多いため、コホート研究では十分な症例を得られない場合が多い。そこで本研究計画では、症例対照研究の体制を基軸に、多数かつ多彩な症例を収集する。検体収集に当たっては、正確な臨床情報と共に、将来の遺伝子解析に供する事が可能な倫理的手続きを踏み、様々な疫学解析手法に供する事の出来るよう対応する。このような大規模検体収集体制を確立し、未知の病因病態の解明に資するリソースを整備する事を目的とする。

### A. 研究目的

周産期の異常の多くは、複数の環境要因や遺伝要因が関与していることが示唆されている、いわゆる多因子疾患であり、分子生物学的な解析で明確な結論を得る事が困難である。近年、いわゆるポストゲノムシーケンス技術の著しい進歩に伴い、多数の症例に対し、網羅的な発現解析や全ゲノム領域の一塩基多型解析が可能となり、多因子疾患の病因病態解明に画期的成功を収めつつある。多因子疾患の解析では、コホート研究で得られるような詳細で正確な臨床経過情報が重要である。その一方で、多因子疾患で同定される関連因子の多くは寄与率が低く、関連解析で十分な検出力を期待するには、相当多数(多くは千例規模)の疾患集団が必要とされる場合が多い。そこで本研究計画は、症例対照研究の体制を基軸に、多数かつ多彩な症例を、正確な臨床情報と共に、将来の遺伝子解析に供する事が可能な状態で収集する体制を確立し、周産期に関連する疾患の未知の病因病態の解明に資する症例収集と試験的解析を目的とする。

### B. 研究方法

#### 【対象症例】

- 1) 妊娠 37 週未満で分娩に至った症例
- 2) その他の異常を伴う周産期症例
- 3) 正常産例(対照群)

#### 【対象予定人数】

- 1) 早産症例:年間 500 症例、本研究終了までに計 2,000 例以上。
- 2) 正常産例(対照群)年間 500 例、本研究終了までに計 2,000 例。
- 3) その他の症例  
症例数の根拠  
オッズ比 1.4、頻度 5%の関連多型を検出力 80%で同定するのに 1,000 例必要。

#### 【収集する臨床情報】

##### 分娩前

- ① 身長
- ② 体重(非妊時)
- ③ 妊娠歴(流・早産歴、死産歴、FGR 歴、妊娠高血圧既往歴)
- ④ 円錐切除術歴の有無
- ⑤ 嗜好(喫煙、飲酒)
- ⑥ 不妊治療の有無
- ⑦ 母体基礎疾患の有無
- ⑧ 妊娠合併症の有無

##### 分娩後

- ① 分娩週日(早産の際は人工早産か自然早産か)
- ② 分娩時母体年齢
- ③ 分娩時母体体重、体重増加
- ④ PROM の有無

- ⑤ 単胎妊娠か多胎妊娠か
- ⑥ 分娩様式
- ⑦ 陣痛促進剤の有無
- ⑧ 臍帯血 2ml
- ⑨ 母体末梢血 2ml

#### 新生児

- ① 胎数
- ② 性別
- ③ 身長
- ④ 体重
- ⑤ 頭周囲径
- ⑥ 胸囲
- ⑦ Apgar 値
- ⑧ 胎盤重量
- ⑨ LFD (SGA), AFD (AGA), HFD (LGA)の有無
- ⑩ 児の転帰
- ⑪ 児の NICU 管理有無
- ⑫ 児の合併症

#### 【収集する試料】

- 分娩後の臍帯血 2ml
- 母末梢血 2ml
- 父末梢血 2ml

#### 【解析対象遺伝子・ゲノム領域】

- 1) 約 100 万箇所の大規模なゲノム網羅的塩基多型解析
- 2) 網羅的 DNA メチル化解析 (計約 2 万 6 千箇所の遺伝子プロモーター領域、インプリンティング遺伝子調節領域を中心とした DNA メチル化解析)

#### 4. 倫理面への配慮

ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針を遵守し、各医療機関の定める倫理申請手続きを行い、承認を得て行う。

#### C. 研究結果

初年度は、特に遺伝子解析に対する倫理申請に十分な準備を行った後、検体収集体制の構築を行ない、倫理申請承認後の 2010 年 11 月より、実際に周産期の異常症例の回収を進めている。

#### D. 考察

今後、関連病院とも連携し、比較的頻度の高い周産期の疾患 (早産、妊娠糖尿病等) にとどまらず、稀少疾患も含めた検体収集を進めていく。

#### E. 結論

正確な臨床情報を伴った高品質の臨床検体を、厳密な倫理的手続きを経て多数集める事は、今後の大規模網羅的な周産期の疾患解析に必須のバイオリソースである。また、正常分娩を経た女性のゲノム DNA という観点からも、世界に類を見ないリソースとして貴重である。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Miyakoshi K, Tanaka M, Saisho Y, Shimada A, Minegishi K, Kim SH, Asai S, Itoh H, Yoshimura Y., Pancreatic beta-cell function and fetal growth in gestational impaired glucose tolerance. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 89, 769-75, 2010
2. Miyakoshi K, Saisho Y, Tanaka M, Shimada A, Itoh H, Yoshimura Y, Pancreatic  $\beta$ -cell function in women with gestational diabetes mellitus defined by new consensus criteria., *Diabetes Care.*, 34, E8, 2011
3. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine immunostaining in placenta is associated with maternal serum uric acid levels in early-onset preeclampsia. Fukushima K, Murata M, Tsukimori K, Kaneki E, Wake N, Am J Hypertens. In press.
4. Congenital Abdominal Aortic Aneurysm with Porencephaly: A Case Report. Tsunematsu R, Shinozaki T, Fukushima K, Yumoto Y, Hidaka N, Morokuma S, Fujita Y, Hojo S, Wake N. *Fetal Diagn Ther.* 2010 [Epub ahead of print]
5. Three cases of acute fatty liver of pregnancy: postpartum clinical course depends on interval between onset of symptoms and termination of pregnancy. Aso K, Hojo S, Yumoto Y, Fukushima K, Miyazaki M, Kotoh K, Wake N. *J Matern Fetal Neo-*

natal Med. 2010;23(9):1047-9.

6. Abnormal fetal movements, micrognathia and pulmonary hypoplasia: a case report. Abnormal fetal movements. Morokuma S, Anami A, Tsukimori K, Fukushima K, Wake N. BMC Pregnancy Childbirth. 2010 ;17;10:46.

## 2. 学会発表

1. 宮越敬、田中守、税所芳史、他 新診断基準による妊娠糖尿病合併妊婦における膵β細胞機能に関する検討 第26回日本糖尿病・妊娠学会学術集会 2010、11月、さいたま
2. 臍帯ヘルニアに合併した先天性静脈管欠損の子宮内診断例 日高庸博, 和氣徳夫ほか、第46回日本周産期・新生児医学会学術集会 平成22年7月、神戸市

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 分担課題: 新生児のエピゲノム多様性の解析

研究分担者 秦健一郎

### 研究要旨

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、ヒトの発生と生存に必須の機構である。その代表例である DNA メチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御は、環境によって変化し、細胞分裂を経て安定に長期にわたり遺残する。このような現象は、胎内環境が胎児や出生児に長期にわたり与える影響を説明するモデルとなり得る。本研究では、出生児のエピゲノム異常を解析する基盤を整備し、特異症例のエピゲノム異常検出を試みる。

### A. 研究目的

胎内環境や養育環境が、出生児の将来の生活習慣病の発症等に関与する可能性が提唱されている。実際に動物では生殖補助医療技術や母体の食餌が、児の遺伝子発現を変化させる事が知られている。ヒトでも同様の変化(異常)が起こる可能性が懸念されるが、系統的な解析は未だになされておらず、本研究で得られる基盤的情報の医学的意義は高い。

### B. 研究方法

平成 22 年度

分娩後に、胎盤の異なる部位 4 箇所から胎盤組織片(径 1cm 程度)と、臍帯血を 2ml 以上採血する。EDTA あるいはヘパリン等の抗凝固剤入りの採血管を用い、精製処理まで凍結保存する。母体血は、いずれの時期に採血したものでも利用可能であり、CBC 検査用の EDTA 採血管で 2ml を採取し、同様に凍結保存する。胎盤組織片からは、ゲノム DNA と RNA を回収する。血液からは、ゲノム DNA を精製回収する。回収には、

平成 23 年度

初年度に続き、検体の収集を続ける。解析対象症例(正常症例)を抽出し、対象症例のゲノム DNA をバイサルファイト PCR 法により処理し、非メチル化シトシンをチミンに変換する。バイサルファイト PCR 法によって変換された塩基配列の一塩基多型を利用して、任意

の領域の DNA メチル化状態を、一塩基レベルの解像度で、かつ定量的に解析する。これらの解析から、正常例におけるエピゲノム多様性(エピジェネティックな修飾状態の揺らぎ、正常範囲)を検証し、異常症例の検出に必要な基準値を設定する。

平成 24 年度

特に、絨毛細胞の分化異常が疑われる症例を抽出し、バイサルファイト PCR 法による DNA メチル化状態の定量初解析を行う。次年度までの解析で得られた、正常新生児のエピゲノム多様性の基準値を参考に、逸脱する領域、症例群の有無を検討する。

### 倫理面への配慮

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針を遵守する。本研究に関わる症例検体収集及び解析の詳細は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を受けた(承認番号 234、406)

### C. 研究結果

初年度は、主に検体収集体制の構築を行った。研究協力機関で、我々の倫理申請を基に、本研究を行うための倫理申請を行った。高品質の血液検体および胎盤組織を、安全かつ効率的に、研究協力機関から収集する体制を整えた。

### D. 考察

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、正

常なヒトの発生と生存に必須であると同時に、様々な疾患との関連も明らかになりつつある。特に、がんにおけるエピジェネティックな異常を網羅的に調べる大規模なプロジェクト(エピゲノムプロジェクト)が進行中であるが、本邦は欧米諸国を中心としたグループの後塵を拝している。

エピジェネティックな情報は、ジェネティックな情報(遺伝子配列)と異なり、発生時期や臓器によって異なる可能性がある。本研究では、エピゲノム多様性の指標として、主にDNAメチル化状態を解析する。DNAメチル化状態は、ゲノムインプリンティングなどの主要な制御機構であり、胎児と胎盤の発生発育に重要な役割を担う。がん細胞などを中心とした既知の疾患に対し、既知の原因遺伝子プロモーター領域を標的に、局所的解析が盛んに行われているが、正常分娩例におけるDNAメチル化状態の多様性(個人差、基準値)は明らかでない。

## E. 結論

本研究で行われる新生児のエピゲノム多様性解析により、極めて先駆的な知見が得られる。類似の研究は存在せず、周産期疾患の病因病態解明のみならず、成長・加齢に伴い生じるエピゲノム多様性の解析にも必要な基盤的知見となる。

## F. 健康危険情報

該当せず。

## G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H. Development. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. 2011 Jan 19. [Epub ahead of print]
  - 2) Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Masubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T. J Hum Genet. Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and

upd(14)pat-like phenotypes. 2010 Nov 11. [Epub ahead of print]

- 3) Yamazawa K#, Nakabayashi K#, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T. (2010) Parthenogenetic chimerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like phenotype. J. Med. Genet. (in press) (#equal contribution)
- 4) 秦健一郎 (2010)「胎児発育とゲノムインプリンティング」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 17, 43-48.
2. 学会発表
  - 1) 秦健一郎「生殖に関わるエピジェネティクスとその異常」教育講演、日本生殖医学会、徳島、11月12日、2010.

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

分担研究報告書

母子コホート研究による成育疾患等の病態解明に関する研究

分担研究項目：SGA の免疫学的機序に基づく病型分類と、アレルギー疾患の発症に関わる胎内因子の検索

分担研究者：松本 健治 独立行政法人 国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部 アレルギー研究室 室長

研究協力者：森田 英明（独）国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部 医師 共同研究員

研究要旨：近年、small-for-gestational-age (SGA)一部に、胎盤に対する母胎の免疫学的な反応の異常が原因と考えられる症例が存在する事が報告され注目されている。また、アレルギー疾患の発症は遺伝的要因と環境要因が複雑に相互作用して制御されていると考えられているが、乳幼児期早期に発症するアレルギー疾患児の子宮内環境や子宮内感作に関しては不明な点が多く残されている。以上から、本研究では①SGA の発症要因としての免疫学的異常の関与の検討、および②子宮内環境が子宮内感作や乳幼児期早期のアレルギー疾患発症に与える影響について検討する。片年度は、上記研究のための予備検討および倫理申請などの準備を進めた。

#### A. A. 研究目的

small-for-gestational-age (SGA)には明らかな基礎疾患や栄養障害などに起因する症例と、原因不明な症例が存在する。近年、原因不明のSGAの一部に、胎盤に対する母胎の免疫学的な反応の異常が原因と考えられる症例が存在する事が報告され注目されている。本研究ではSGA症例の胎盤および臍帯血の病理学的・免疫学的検索を行い、実際にどの程度の頻度でどのような変化が生じているのかを検討する

また、アレルギー疾患の発症は遺伝的要因と環境要因が複雑に相互作用して制御されていると考えられているが、乳幼児期早期に発症するアレルギー疾患児の子宮内環境や子宮内感作に関しては不明な点が多く残されている。

以上から、本研究では①SGA の発症要因としての免疫学的異常の関与の検討

②子宮内環境が子宮内感作や乳幼児期早期のアレルギー疾患発症に与える影響について検討する。

#### B. 方法

①SGA 症例および正常産の胎盤の病理学的解析、特に免疫学的抑制機構に関与する分子群の発現状況（免疫組織染色、mRNA 発現解析）や臍帯血の拒絶反応マーカーの発現を比較検討し、SGA 症例における免疫異常の有無について検討する

②妊娠中の各種要因、特に食事やつわり、不正

出血などの因子と臍帯血の好酸球数、児のアレルギー疾患の発症の相関について疫学的に検討する

### C. 結果

研究計画が完成し、倫理申請審議中である。

### E. 結論

本年度中に倫理審査を終了し、平成 23 年度から本格的なサンプリングを始める予定である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, **Matsumoto K**. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011; Accepted.

Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, Ohtsuka Y, Shoda T, Terada A, Takamasu T, Arai K, Ito Y, Ohya Y, Saito H, **Matsumoto K**. Four distinct subtypes of non-ige-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:685-688.

**Matsumoto K**, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011; Accepted.

Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, **Matsumoto K**, Saito H, Taniguchi T, Matsumoto M, Seya T. Identification of a

polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med*. 2010; 207: 2675-2687.

Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, **Matsumoto K**, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 18581-18586.

Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, **Matsumoto K**, Saito H, Matsuda A. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol*. 2010; 185: 5743-5750.

Yamada Y, **Matsumoto K**, Hashimoto N, Saikusa M, Homma T, Yoshihara S, Saito H. Effect of Th1/Th2 cytokine pretreatment on RSV-induced gene expression in airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 154: 184-194.

Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, **Matsumoto K**, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP Promoter Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Bronchial Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Jul 23. [Epub ahead of print].

Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, **Matsumoto K**,

Ogawa Y, Futamura K, Kaminuma O, Hashimoto N, Shimoyama Y, Saito H, Tomita Y. Overexpression of LEDGF/DFS70 Induces IL-6 via p38 Activation in HaCaT Cells, Similar to that Seen in the Psoriatic Condition. *J Invest Dermatol.* 2010; 130: 2760-2767.

Fukuie T, Nomura I, Horimukai K, Futamura M, Narita M, Ohzeki T, **Matsumoto K**, Saito H, Ohya Y. Proactive treatment appears to decrease serum IgE levels in patients with severe atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2010;163: 1127-1129.

**Matsumoto K**, Terakawa M, Fukuda S, Saito H. Analysis of signal transduction pathways involved in anti-CD30 mAb-induced human eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;152 Suppl 1: 2-8.

Futamura K, Orihara K, Hashimoto N, Morita H, Fukuda S, Sagara H, **Matsumoto K**, Tomita Y, Saito H, Matsuda A. beta2-Adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152: 353-361.

Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, **Matsumoto K**, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol.* 2010; 223: 695-702.

Tsubota A, **Matsumoto K**, Mogushi K, Nariai K, Namiki Y, Hoshina S, Hano H, Tanaka H, Saito H, Tada N. IQGAP1 and vimentin are key regulator genes in naturally occurring hepatotumorigenesis induced by oxidative stress. *Carcinogenesis.* 2010; 31: 504-511.

2. 学会発表  
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

WO03/000286 好酸球増多性疾患治療薬

特許公開 2010-207200 アトピー素因判定マーカー、アレルギー性皮膚疾患素因判定マーカー及びそれらの使用方法

特許公開 2009-014524 アレルギー疾患推定マーカー及び治療効果判定マーカー、並びに、それらの利用方法

特許公開 2007-143544 乳酸菌のスクリーニング方法

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

## マウス肝臓における遺伝子発現と DNA メチル化の網羅的解析

分担研究者 小川 佳宏 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野 教授

**研究要旨** 多くの疫学調査により、胎生期の栄養環境が成人期に発症する肥満や生活習慣病に関連する可能性が指摘されている (Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD)。一方、胎生期のみならず個体の成長が著しい新生児期も全身臓器の可塑性が高い時期であり、新生児期の栄養環境が成人期の肥満や生活習慣病の疾患感受性に影響を与える可能性がある。本研究は、従来知見のなかった新生児期の肝臓における *de novo* 脂肪合成のエピジェネティクス制御の分子機構の解明を目指す新しい試みである。種々の栄養状態において雄性 C57BL/6 マウスの肝臓における脂肪合成遺伝子の DNA メチル化状態を検討したところ、肝脂肪合成の律速酵素グリセロール3リン酸アシル基転移酵素 (GPAT1) 遺伝子プロモーターにおける DNA メチル化の程度が遺伝子発現と逆相関することが判明した。DNA メチル化の変化は GPAT1 遺伝子プロモーターに特異的であり、他の脂肪合成遺伝子には認められなかった。培養細胞を用いた検討により、DNA メチル化により GPAT1 遺伝子プロモーター転写活性が抑制されることが明らかになった。以上より、DNA メチル化により GPAT1 遺伝子はエピジェネティクス制御を受けることが示唆された。本研究により、DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法 (Oncogene 25: 3059-3064, 2006) の導入を完了し、胎仔期～新生仔期～成獣期のマウスの肝臓における DNA メチル化状態の網羅的な解析が可能になった。

### 研究目的

生活習慣病の発症には塩基配列の変化による遺伝素因のみならず栄養環境を含む環境因子が関与することが知られており、分子基盤の一つとしてエピジェネティクスによる遺伝子発現制御が指摘されている。しかしながら、栄養環境によりエピジェネティクス制御を受ける標的遺伝子は同定されていない。本研究は、生活習慣病の病態に密接に関連する肝臓において胎仔期～授乳期の遺伝子発現変化および DNA メチル化変化を網羅的に解析し、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにするものである。

### 研究方法

1. 授乳期～離乳期における肝臓脂肪合成遺伝子の発現変化  
新生仔から離乳後のマウス肝臓における脂

肪合成酵素 (GPAT1, FAS, SCD1) およびこれら脂肪合成酵素の発現を正に制御する転写因子 SREBP1c の遺伝子発現を検討した。

2. 脂肪合成酵素遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化についての検討

バイサルファイト法により、種々の栄養状態において雄性 C57BL/6 マウスの肝臓における脂肪合成遺伝子の DNA メチル化状態を検討した。特に、*de novo* 脂質合成の律速酵素である glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 (GPAT1) 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化を解析した。

3. DNA メチル化によるプロモーター活性抑制  
*In vitro* で DNA メチル化した GPAT1 プロモーター領域を用いて、SREBP1c によるルシフェラーゼレポーターの活性化に及ぼす作用を検討した。