

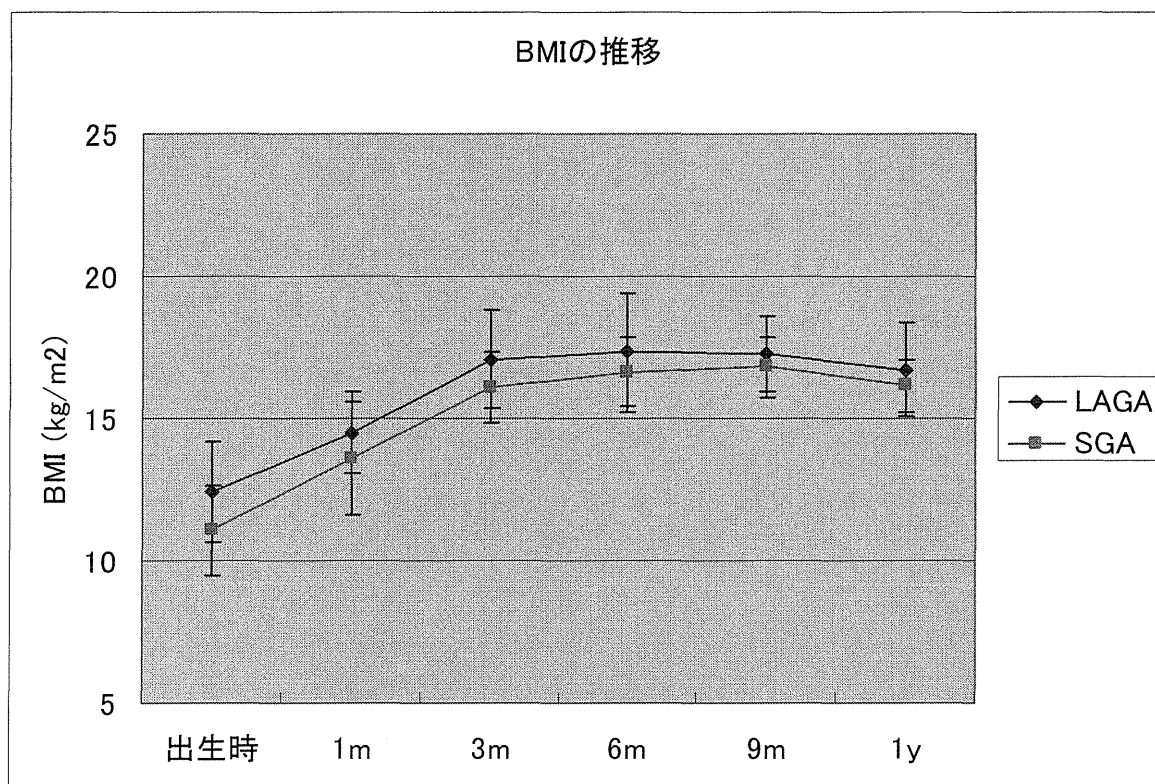
(表 1) SGA(light-for-date baby)に関連する因子 (単変量解析)

	OR	95% C. I.		p
母年齢	0.935	0.899	0.968	0.0002 *
初産	1.355	0.974	1.899	0.0745
児が女兒	1.552	1.124	2.151	0.0076 *
在胎週数	0.905	0.835	0.983	0.0155 *

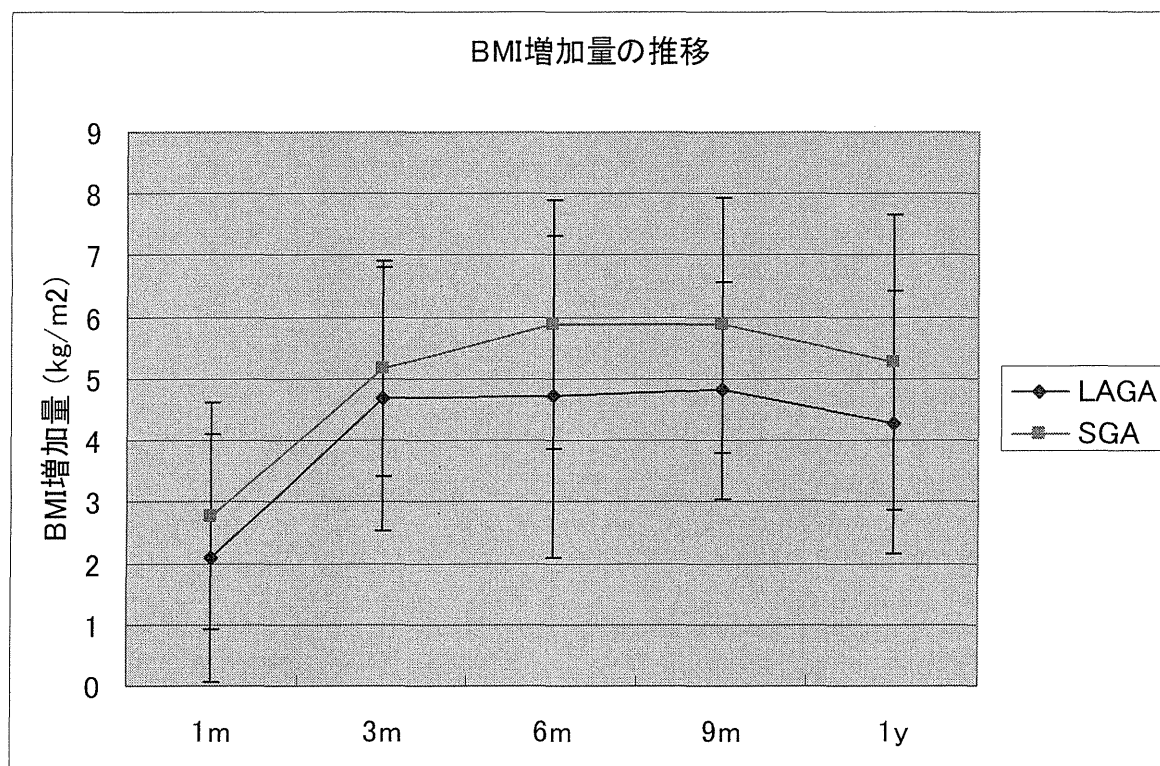
(表 2) SGA(light-for-date baby)に関連する因子 (多変量解析)

	OR	95% C. I.		p
母年齢	0.935	0.900	0.970	0.0004 *
初産	1.298	0.926	1.833	0.1302
児が女兒	1.606	1.1564	2.238	0.0046 *
在胎週数	0.898	0.828	0.977	0.0109 *

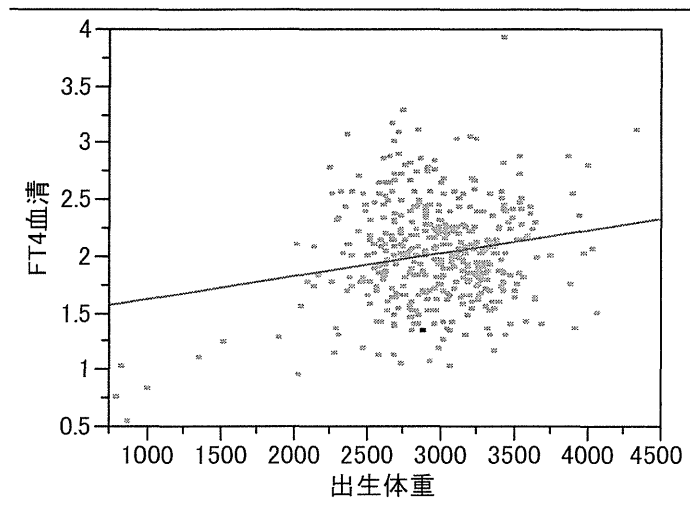
(図5) 生後1歳までのBMIの推移



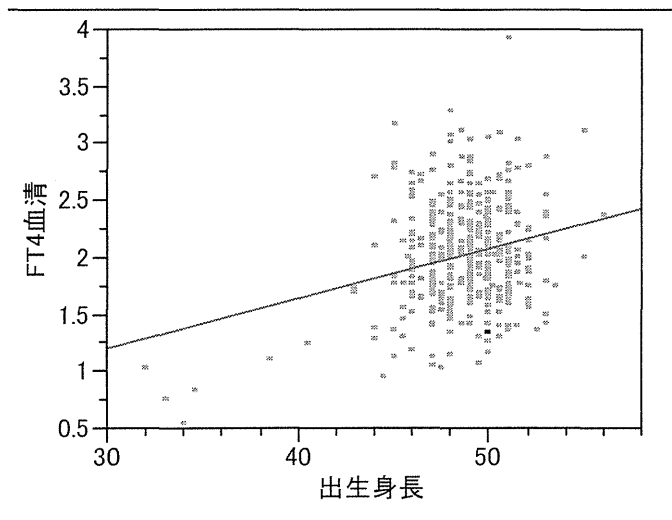
(図6) 生後1歳までのBMI増加量



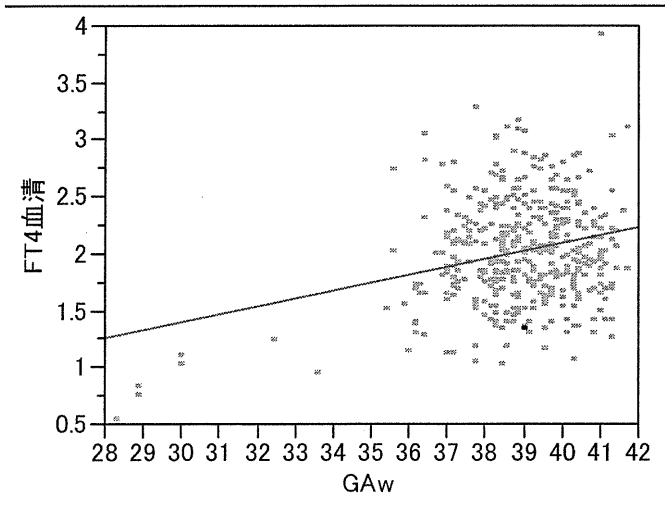
(図7) 出生体重と free T4 値との関係



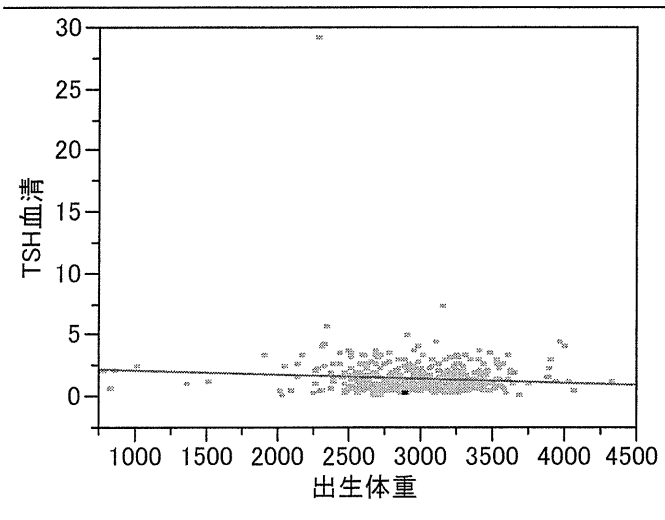
(図8) 出生時身長と free T4 値との関係



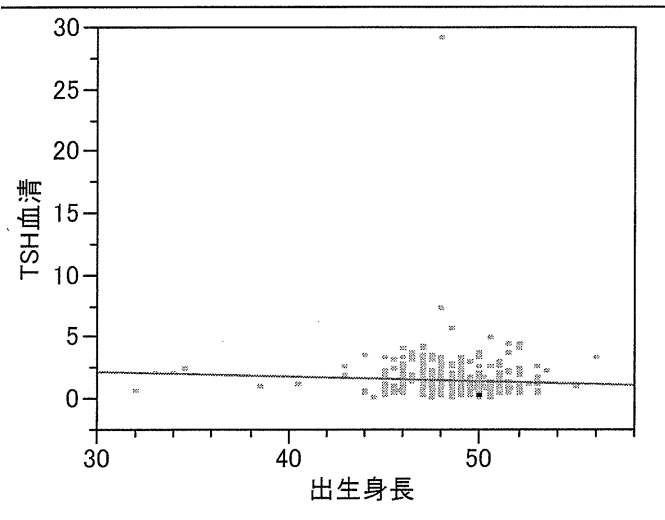
(図9) 在胎週数と free T4 値との関係



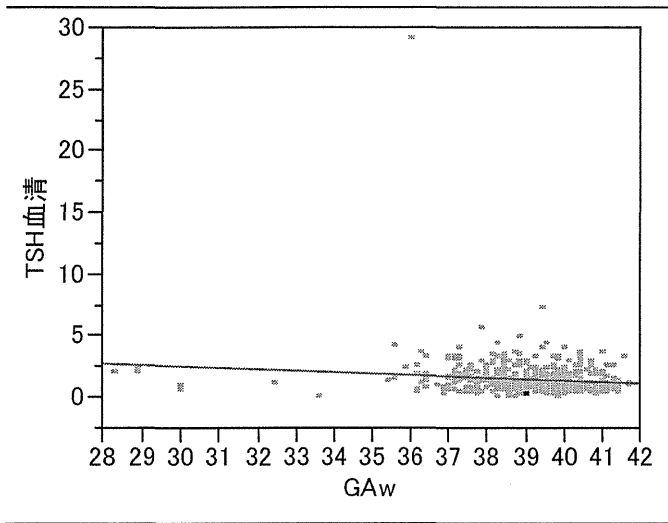
(図 10) 出生体重と TSH 値との関係



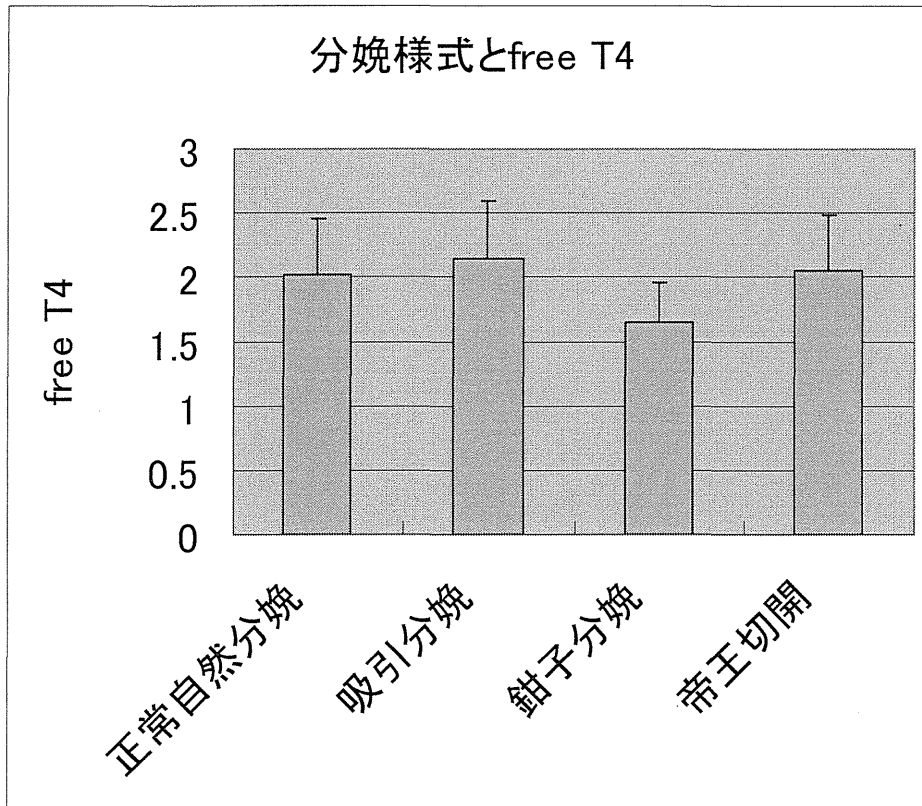
(図 11) 出生時身長と TSH 値との関係



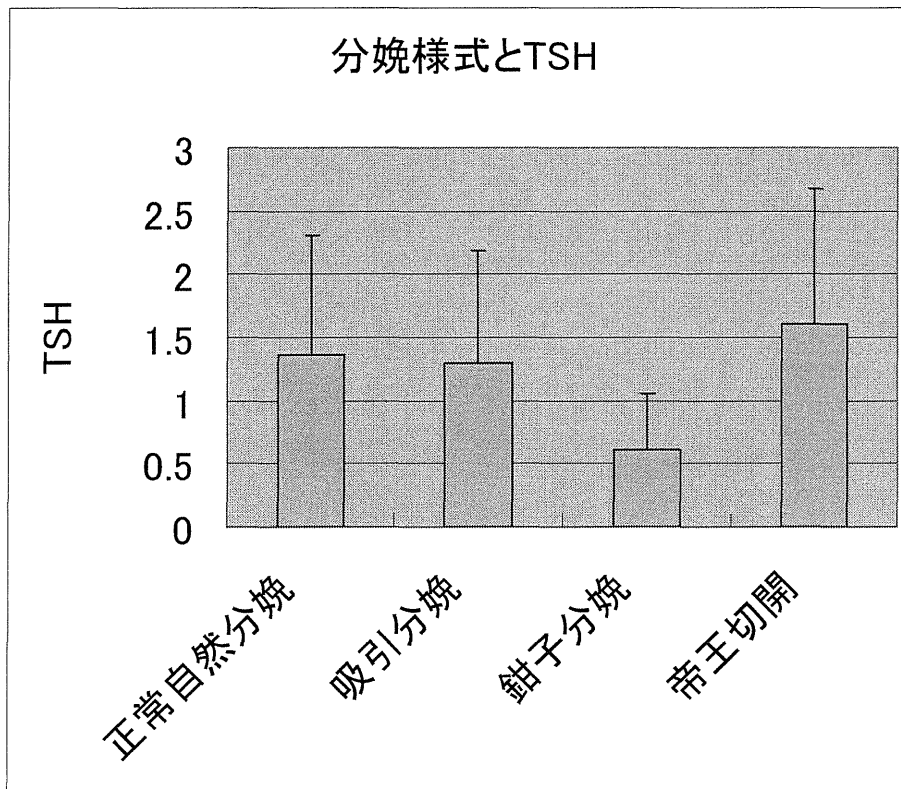
(図 12) 在胎週数と TSH 値との関係



(図 13) 分娩様式と free T4 値



(図 14) 分娩様式と TSH 値



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 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子内分泌代謝学分野 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。本研究では、出生後の栄養環境変化に応じて変化する肝臓脂肪合成の分子機構に着目し、肝臓の中性脂肪合成の律速酵素Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1（GPAT1; *Gpam*）遺伝子のDNAメチル化制御の可能性を検討した。マウス肝臓の*Gpam*のプロモーター領域は、成獣と比較して新生仔でDNAメチル化が高く、遺伝子発現と逆相関した。成獣の肝細胞（初代培養）において、*Gpam*プロモーターをDNAメチル化することにより転写因子SREBP-1cのプロモーターへのリクルートとGPAT1の遺伝子発現が減少し、中性脂肪合成が低下した。また、*Gpam*はDNAメチル化酵素Dnmt3bによりDNAメチル化された。さらに、胎仔期～新生仔期における母獣の過栄養の環境が新生仔の*Gpam*プロモーターのDNAメチル化を減少させた。以上より、肝臓の中性脂肪合成の律速酵素GPAT1は新生仔期にDNAメチル化によるエピジェネティックな制御を受けることが明らかとなった。さらに、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を開始している。

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
新生仔及び成獣の雄性 C57BL/6 マウス肝臓を用い、*Gpam* を含む複数の脂肪合成関連遺伝

- 子のDNAメチル化状態（メチル化感受性制限酵素活性）と遺伝子発現を解析した。
2. バイサルファイト法による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、*Gpam* のプロモーター領域におけるDNAメチル化を解析した。
3. 脂肪合成酵素遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造の解析
Gpam のプロモーター領域へのDNAメチル化酵素のリクルート及びヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法により解析した。
4. 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*Gpam*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。

5. 培養細胞を用いた DNA メチル化によるプロモーター活性抑制の解析
初代培養肝細胞を用い、*Gpam* プロモーターの DNA メチル化による、SREBP-1c のリクルートと中性脂肪合成の変化を解析した。
6. 母獣の栄養変化による仔マウスの遺伝子発現調節の検討
妊娠・授乳期間中の母マウスを高脂肪・高シヨ糖食により飼育して過栄養状態とし、出生仔の *Gpam* の DNA メチル化状態を解析した。
7. 肝臓における遺伝子発現と DNA メチル化パターンの網羅的解析
胎生期～新生仔期～成獣期のマウス肝臓における遺伝子発現とプロモーター領域の DNA メチル化を網羅的に解析するため、MIAMI 法 (Oncogene 25: 3059-3064, 2006) を導入した。

(倫理面への配慮)

実験に用いた動物に対しては、動物愛護上の配慮として、長時間にわたり強い苦痛をもたらす方法を適用する時には、しかるべき鎮痛、鎮痛剤、または麻酔剤を獣医学的に認められた方法を用い、あるいは適切な麻酔剤を用いて安楽死させた。

研究結果

1. マウスの肝臓における中性脂肪合成は、新生仔で低く、成獣で高かった。新生仔マウス肝臓において、脂肪合成のマスターレギュレーターの転写因子 SREBP1-c は発現しているにも関わらず、そのターゲットである律速酵素遺伝子 *Gpam* の発現は非常に低かった。SREBP1c の mRNA の発現は新生仔ではほとんど検出されないが、成獣では著しく増加した。出生後 5.5 日令ではある程度 (0.5 日齢の 10 倍程度) 発現が検出され、9.5 日齢では成獣の半分くらいまで発現が観察された。GPAT1 mRNA は新生仔 (0.5, 5.5, 9.5 日齢) ではほとんど発現しないが、成獣肝臓で著しく増加した。新生仔では、*Gpam* プロモーターの SREBP 応答配列 (SRE) (GPAT1-SRE) 周辺領域の DNA が高メチル化状態にあるのに

対して、成獣では、メチル化が低く、メチル化の程度が遺伝子発現と逆相関した。レポーターアッセイとクロマチン免疫沈降法により、GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化が SREBP-1c のリクルートを阻害することにより、SREBP-1c による転写活性化を直接抑制することが明らかとなった。

2. *Gpam* プロモーター領域には、SREBP1c 応答配列 (SRE) が 3 カ所あり、その SRE を含む約 0.5kb について bisulfite 法によりメチル化を検討した。新生仔では高い DNA メチル化が検出されたが、成獣ではほとんどメチル化が確認できず、*Gpam* プロモーター領域のメチル化と mRNA の発現は逆相関していた。DNA メチル化の変化は *Gpam* 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。
3. クロマチン免疫沈降法による解析の結果、新生仔マウスの肝臓では DNA メチル化酵素 Dnmt3b が GPAT1-SRE 周辺領域にリクルートされる一方、成獣期の肝臓ではリクルート量は著しく低下していた。更に、新生仔期には GPAT1-SRE 周辺領域は転写抑制型のヒストン修飾 (H3K9 メチル化) を受けるが、成獣期には転写活性型のヒストン修飾 (H3K4 メチル化、H3K9 アセチル化) を受けることが明らかになった。
4. *Gpam* プロモーター領域の DNA メチル化は SREBP1c による転写活性化 (ルシフェラーゼレポーター活性) を抑制することが明らかになった。
5. 初代培養肝細胞を用い、GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化と中性脂肪合成に与える、Dnmt3b 及び DNA メチル化の役割を解析した。Dnmt3b 過剰発現により GPAT1-SRE 周辺領域が DNA メチル化され、SREBP-1 のリクルート量と GPAT1 の遺伝子発現が減少し、さらに中性脂肪合成が低下した。
6. 妊娠～授乳期間中の母マウスを高脂肪・高シヨ糖食により飼育し、過栄養の栄養環境が、仔マウス肝臓の DNA メチル化に与える影響を解析した。過栄養群の仔マウスでは、新生仔期に GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化が低下しており、SREBP-1 のリクルート量と GPAT1 の遺伝子発現、肝臓中中性脂肪含量の

増加が認められた。

7. ゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素 *HpaII* およびメチル化非感受性制限酵素 *MspI* で処理後、PCR 法により 2 サンプル間で切断に差異のある領域を増幅し、DNA アレイにより検出する系を確立することができた。胎生期～新生仔期～成獣期のマウス肝臓のゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化の差異の有無に関して予備検討を開始した。

考察

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 *Gpam* プロモーターにおける DNA メチル化の程度は遺伝子発現と逆相関していた。DNA メチル化の変化は *Gpam* 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 *Gpam* 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 *Gpam* はエピジェネティクス制御を受けることが示唆された。

本研究の結果より、次のようなモデルが考えられる。新生仔期の肝臓では、*Dnmt3b* により GPAT1-SRE 周辺領域が DNA メチル化されることにより、SREBP-1c のリクルートが阻害され、GPAT1 の遺伝子発現が誘導されない。一方、離乳期には脱メチル化されて SREBP-1c がリクルートされるようになり、脂肪合成の律速酵素である GPAT1 の遺伝子発現が誘導され、脂肪合成が行われるというものである。DNA 脱メチル化の分子機構の解明は今後の課題であるが、過栄養にした母マウスより産まれた仔マウスを用いた検討により、少なくとも一部は栄養環境の影響を受けるものと考えられる。

本研究は、新生仔マウスの肝臓における脂肪合成遺伝子の DNA メチル化制御に関する最初の発見である。可塑性の高い胎児期・新生児期の代謝臓器において、栄養環境に応じて変化する代謝機能にエピジェネティクス制御が果たす役割を解明することにより、胎児期から新生児期の栄養環境の変化が成人後の生活習慣病の発症を左右する分子機構を知る手掛かりとなることが期待される。

結論

本研究により、*de novo* 脂質合成の律速酵素である GPAT1 遺伝子は DNA メチル化により発現制御を受けることが示唆された。今後、新生仔～成獣マウスの肝臓サンプルについて DNA メチル化と遺伝子発現の網羅的な解析を進める予定である。

*健康危険情報

なし

研究発表

論文発表

平成 22 年度

1. Y. Kamei, T. Ehara, T. Suganami, S. Kanai, K. Hayashi, Y. Yamamoto, S. Miura, O. Ezaki, M. Okano, Y. Ogawa. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. **Obesity** 18: 314-321, 2010.
2. T. Yamamoto, T. Suganami, M. Kiso-Narita, P. A. Scherle, Y. Kamei, M. Isobe, S. Higashiyama, Y. Ogawa. Insulin-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in adipocytes in vitro: role of a disintegrin and metalloproteinase 17. **Obesity** 18: 1888-1894, 2010.
3. Y. Yamazaki, Y. Kamei, S. Sugita, F. Akaike, S. Kanai, S. Miura, Y. Hirata, B.R. Troen, T. Kitamura, I. Nishino, T. Suganami, O. Ezaki, Y. Ogawa. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in the skeletal muscle. **Biochem. J.** 427: 171-178, 2010.
4. T. Suganami, Y. Ogawa. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J. Leukoc. Biol.** 88: 33-39, 2010.
5. K. Yamashiro, T. Sasano, K. Tojo, I. Namekata, J. Kurokawa, N. Sawada, T. Suganami, Y. Kamei, H. Tanaka, N. Tajima, K. Utsunomiya, Y. Ogawa, T. Furukawa. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 398: 284-289, 2010.
6. Y. Okazaki, N. Ohshima, I. Yoshizawa, Y. Kamei, S. Mariggio, K. Okamoto, M. Maeda, Y. Nogusa, Y. Fujioka, T. Izumi, Y. Ogawa, Y. Shiro, M. Wada, N. Kato, D. Corda, N. Yanaka. A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE5 controls skeletal muscle development via a

non-enzymatic mechanism. **J. Biol. Chem.** 285: 27652-27663, 2010.

7. A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes** 59: 2495-2504, 2010.
8. M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka, M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. **Diabetes** 2011 Jan 31. [Epub ahead of print]

平成 23 年度

1. M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka, M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. **Diabetes** 60: 819-826, 2011.
2. N. Satoh-Asahara, T. Suganami, T. Majima, K. Kotani, Y. Kato, R. Araki, K. Koyama, T. Okajima, M. Tanabe, M. Oishi, A. Himeno, S. Kono, A. Sugawara, M. Hattori, Y. Ogawa, A. Shimatsu; The Japan Obesity Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group. Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.** 6: 265-273, 2011.
3. M. Tanaka, T. Suganami, M. Kim-Saijo, C. Toda, M. Tsujii, K. Ochi, Y. Kamei, Y. Minokoshi, Y. Ogawa. Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B cell development. **J. Neurosci.** 31: 8373-8380, 2011.
4. S. Sugita, Y. Kamei, F. Akaike, T. Suganami, S. Kanai, M. Hattori, Y. Manabe, N. Fujii, T. Takai-Igarashi, J. Oka, H. Aburatani, T. Yamada, H. Katagiri, S. Takehi, Y. Tamura, S. Takasuga, T. Sasaki, H. Kubo, K. Nishida, S. Miura, O. Ezaki, Y. Ogawa. Metabolic analysis of transgenic mice

overexpressing RXR γ in skeletal muscle: increased glucose tolerance and suppression of obesity-induced fatty liver. **PLoS ONE** 6: e20467, 2011.

5. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, Y. Ogawa. Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. **Am. J. Pathol.** 179: 2454-2463, 2011.

平成 24 年度

1. Ehara T, Kamei Y, Takahashi M, Yuan X, Kanai S, Tamura E, Tanaka M, Yamazaki T, Miura S, Ezaki O, Suganami T, Okano M, Ogawa Y. Role of DNA methylation in the regulation of lipogenic glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene expression in the mouse neonatal liver. **Diabetes** 61: 2442-2450, 2012.
2. Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, Fujisaka S, Usui I, Tsuneyama K, Ichihara Y, Wada T, Hirata Y, Suganami T, Izaki H, Akira S, Miyake K, Kanayama HO, Shimabukuro M, Sata M, Sasaoka T, Ogawa Y, Tobe K, Takatsu K, Nagai Y. The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. **Diabetes** 61: 1199-1209, 2012.

学会発表

平成22年度

1. 亀井康富、江原達弥、菅波孝祥、金井沙綾香、三浦進司、江崎治、小川佳宏：「生活習慣病と DNA メチル化：DNA メチル化酵素遺伝子改変マウスと DNA メチル化促進飼料による検討」：第 64 回日本栄養食糧学会大会，2010.5.21-23，徳島
2. 江原達弥、亀井康富、金井沙綾香、高橋真由美、菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪合成遺伝子のエピジェネティクス制御：DNAメチル化に着目して」：第 31 回日本肥満学会，2010.10.1-2，群馬

3. 亀井康富、江原達弥、菅波孝祥、金井紗綾香、高橋真由美、畑田出穂、岡野正樹、小川佳宏：「肥満とDNAメチル化：DNAメチル化酵素遺伝子改変マウスによる検討」：第31回日本肥満学会，2010.10.1-2，群馬

平成23年度

1. Yoshihiro Ogawa : Epigenetic Regulation of Metabolic Diseases : THE ENDOCRINE SOCIETY'S 93RD ANNUAL MEETING & EXPO(ENDO2011), 2011.6.4-7, Boston
2. 江原達弥、亀井康富、金井紗綾香、高橋真由美、袁勲梅、菅波孝祥、小川佳宏：「グリセロール3リン酸アシル基転移酵素（GPAT1）遺伝子のDNAメチル化による発現制御」第32回日本肥満学会学術大会，2011.9.23-24，淡路

平成24年度

1. 亀井康富、江原達弥、高橋真由美、袁勲梅、金井紗綾香、山崎聖美、江崎治、菅波孝祥、岡野正樹、小川佳宏：「マウス新生仔肝臓の脂肪合成遺伝子のDNAメチル化制御」日本栄養食糧学会 2012年5月 仙台
2. 江原達弥、亀井康富、高橋真由美、袁勲梅、金井紗綾香、田村江梨奈、田中都、山崎聖美、三浦進司、江崎浩、菅波孝祥、岡野正樹、小川佳宏：「マウス新生仔の肝臓における脂肪合成酵素GPAT1のDNAメチル化による遺伝子発現制御」第33回日本肥満学会 2012年10月 京都

知的財産権の出願・登録状況

なし

研究課題 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

総合研究報告書

乳児の発達を睡眠-覚醒リズム、ロコモーション、および共同注意からみる

研究分担者 久保田 雅也 国立成育医療研究センター神経内科 医長

研究要旨

出生後1年の発達に関わる神経機構とその意味を解明することを目的に睡眠覚醒リズム、ロコモーション、視覚的共同注意の獲得の観察を行った。睡眠リズムの確立、ロコモーションの基礎としてのはいはいの完成、後方指さしの理解がいずれも生後9-12か月に完成していた。ロコモーションの発達による運動の自由度増加、昼間の覚醒時間の増加が身体の遠隔への空間的拡張をもたらし視覚的共同注意も遠隔化（三項関係獲得）がなされ発達していくと考えられた。これらはヒトの知性の基礎である「遠隔対象性の獲得」を示している。

分担研究者

久保田 雅也 国立成育医療研究センター神経内科 医長

A. 研究目的

乳児期には精神運動発達が眼に見える形で劇的に変化するがその神経学的な基盤は不明な部分が多い。乳児は大半を眠りに費やしているがその構造は一生のうちで最も大きな変化を示す。その変化は二足歩行までの運動発達、自他の認知発達と密接につながっている。今回は睡眠覚醒リズム、ロコモーション、視覚的共同注意の獲得の観察から出生後1年の発達に関わる神経機構とその意味を解明することを目的とする。

B. 研究方法

1. 睡眠覚醒リズムの調査（生後1, 3, 6, 9, 12か月の各10日間）、2. ロコモーション

（はいはい）観察を中心とした神経学的診察（生後9, 12か月）、3. 視覚的共同注意課題（交互凝視、後方指さし理解、図3）の観察（生後9, 12か月）を行った。対象はA/AC:妊娠合併症、生殖補助医療、その他による低出生体重児24名、B:コントロール23名。

（倫理面への配慮）

研究遂行に際し、個人情報には十分配慮し、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、倫理委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

- ・1か月の睡眠は1-3時間の分断された睡眠で昼夜の変化は乏しい（polyphasic）。(図1)
- ・3か月になると夜間睡眠割合が増加しサーカディアンリズムの基礎が出現する（mono-, bi-phasic）。(表1)
- ・3か月では持続の長い睡眠時間帯は夜間に集中し、最長睡眠時間帯の開始

時刻が、ほぼ一定の時刻になる。このことは昼間の睡眠が夜の入眠時刻に影響を与えなくなったことを意味する。1か月と3か月では昼間の睡眠の意味が異なってくる。

- ・6か月以降で夜間睡眠が連続性を持ち、割合が増加する。(図1)
- ・9-12か月で夜間睡眠がさらに強化され、2回の午睡リズムも確立され周期は24時間となる。(図2)
- ・生後12か月は昼夜の違い、特に昼間に覚醒することを覚える過程といえる。
- ・9か月ではロコモーションの基礎としてのはいはいは約半数は未完成であるが12か月ではほぼ全例で完成したはいはいを示す。
- ・9か月で全例が「交互凝視」が可能であった。(表2)
- ・9か月で約半数が「後方指さしの理解」可能であり、12か月ではほぼ全例がこの課題を通過した。(表2)
- ・睡眠リズムの確立、ロコモーションの基礎としてのはいはいの完成、後方指さしの理解がいずれも生後9-12か月に完成する。

D. 考察

生後3-4か月で「クビがすわる」ことの神経学的基盤として睡眠におけるREM(rapid eye movement)期の完成が挙げられる。REM期にはセロトニン、ノルアドレナリン系は活性が消失、コリン系が最大の活性を示すがこれら睡眠構造制御系は抗重力筋をも支配し前者は促通系、後者は抑制系として機能する。睡眠構造の変化とロコモーションは連動しており遺伝的な要素と環境(昼夜の変化、摂食など)により相互に規定される。またこの完成と並行して自他の区別、関係づけの基礎としての共同注意も9-12か月に動的な変化を示すことがわかった。他者の指さした方向を見ることだけをとればチンパンジーでも行いうるがただのjoint attentionであり、他者の興味や意

図をくみ取ったshared attentionではないとされる。ヒトの「後方指さしの理解」はオモチャへの興味を共有したshared attentionであり、その後のmind readingにつながる。

近親との愛着形成(二項関係)に加えて9か月からは姿勢維持やロコモーションの発達による運動の自由度増加、昼間の覚醒時間の増加が身体の遠隔への空間的拡張をもたらす視覚的共同注意も遠隔化(三項関係獲得)がなされ発達していくと考えられた。これらはヒトの知性の基礎である「遠隔対象性の獲得」を示している。それぞれの神経系の発達(脳幹歩行—REM期制御系や前頭前野)は重複し、認知と身体性は未分化で相互に関連していると考えられる。

E. 結論

生後9-12か月での視覚的共同注意としての「後方指さしの理解」は睡眠リズムの確立、ロコモーションの基礎としてのはいはいの完成と連動して確立されるshared attentionの初源と考えられヒトの知性の基礎である「遠隔対象性の獲得」を示している。

文献

- (1) 瀬川昌也 睡眠のメカニズム 小児内科
2008;40:14-17

F. 研究発表

1. 論文発表
発表予定
2. 学会発表
発表予定

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

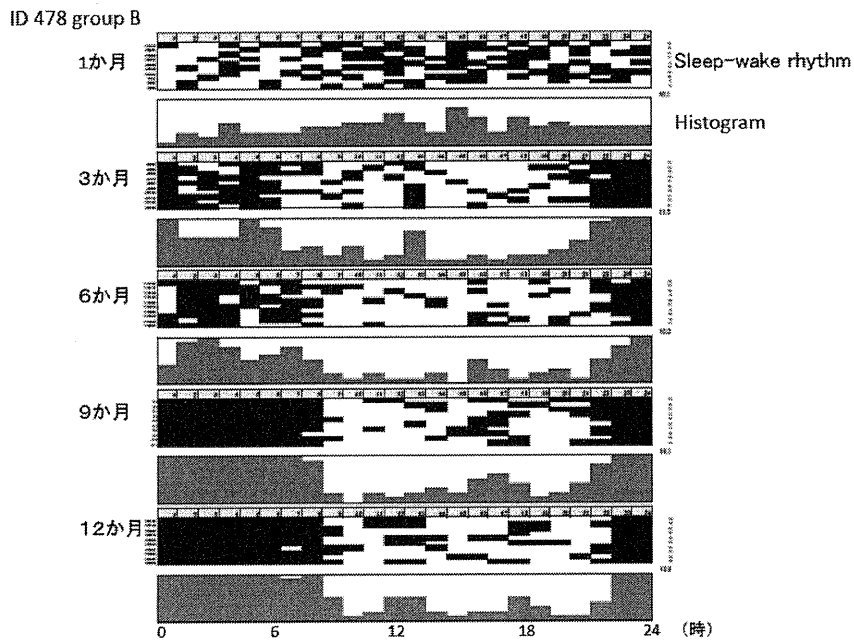


図1 代表的な各月齢の睡眠覚醒リズムとヒストグラム

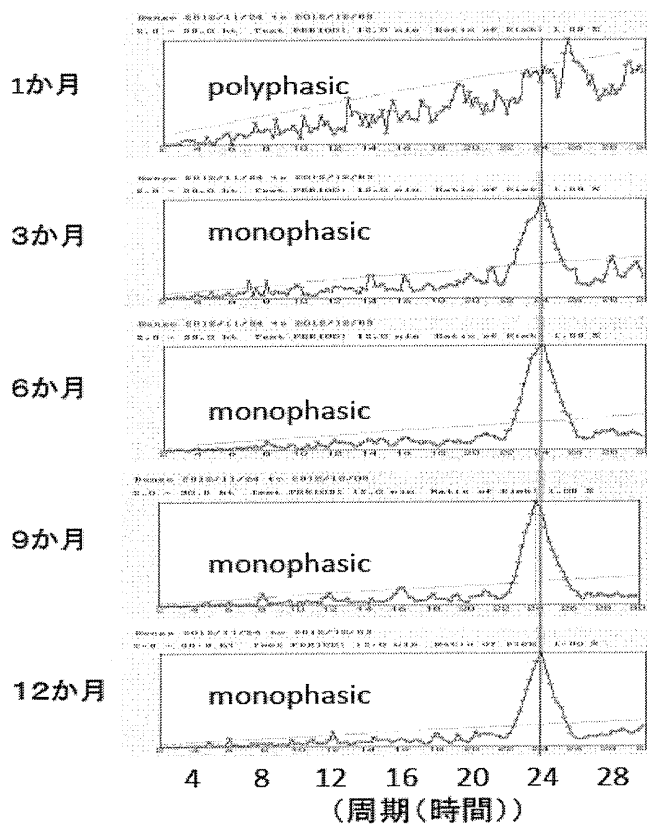


図2 代表的な各月齢の睡眠周期の変化

月齢による睡眠周期の変化 (B群とA/AC群での比較)

	Group	Sleep-wake rhythm			
		monophasic	biphasic	polyphasic	
1Mo	B (n=34)	5	8	21	* **
	A/AC (n=15)	3	4	8	
3Mo	B (n=27)	13	11	3	**
	A/AC (n=21)	11	6	3	
6Mo	B (n=30)	21	8	1	
	A/AC (n=17)	11	6	0	
9Mo	B (n=27)	13	14	2	
	A/AC (n=12)	9	3	0	
12Mo	B (n=28)	15	13	0	
	A/AC (n=8)	3	5	0	

* : 1MoB vs 3MoB P=0.0002, ** : 1MoA/AC vs 3MoA/AC P=0.03
 1MoB vs 1MoA/AC :NS 3MoB vs 3MoA/AC :NS

表1 B群とA/AC群での月齢別の睡眠周期の変化

乳児の視覚的共同注意の発達

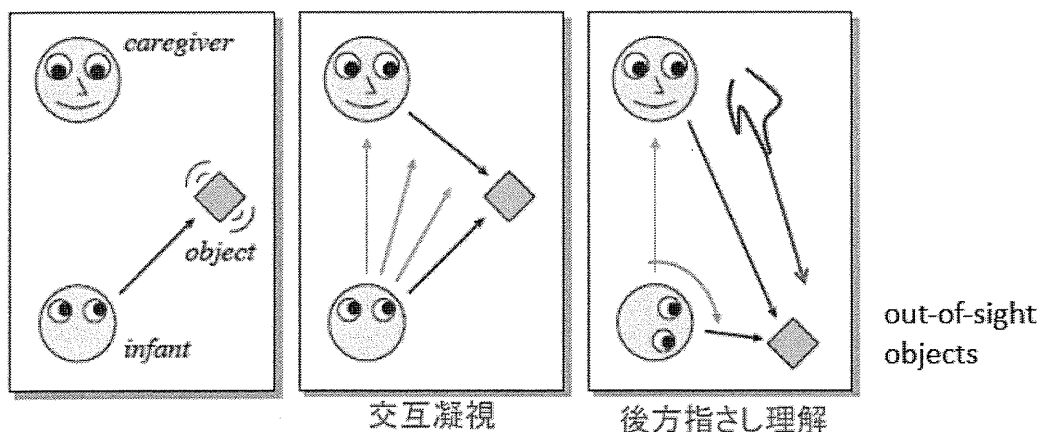


図3 乳児の視覚的共同注意の発達 (Nagai Y et al. 2003.改変)

ロコモーションと視覚的共同注意の観察対象

Group	9Mo	12Mo	合計
A	1	5	6
B	16	7	23
C	7	0	7
A/C	11	7	18
	35	19	54

ロコモーションと視覚的共同注意の完成度

Group	9Mo			12Mo		
	はいはい完成	交互凝視	後方指さし理解	はいはい完成	交互凝視	後方指さし理解
A	0/1人	1/1人	0/1人	4/5人	5/5人	3/5人
B	7/16人	16/16人	8/16人	7/7人*	7/7人	6/7人***
C	3/7人	7/7人	1/7人	-	-	-
A/C	5/11人	11/11人	6/11人	6/6人**	6/6人	4/6人

はいはいの完成; * :9MoB vs 12MoB P=0.01, ** :9MoA/AC vs 12MoA/AC P=0.02
 後方指さし理解:いずれも有意差なし(***B群12Moで1人増えると有意差ありとなる)

表2 上:ロコモーションと視覚的共同注意の観察対象、下:各群における9か月と12か月でのロコモーションと視覚的共同注意の完成度

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つため、前方視的、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「感染性要因」、喫煙・ダイエット、就労状況等の「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。現在までに 1810 名の妊婦が登録され、1592 例が分娩している。子宮頸管長のデータが欠損していた 227 例を除いた 1365 例で検討したところ、妊娠 34 週未満の早産のリスク因子は、妊娠 20-24 週の頸管長の短縮と胎児性別が男児であることであった。妊娠 37 週未満の早産のリスク因子はパートタイム勤務、子宮筋腫、ステロイド剤の内服、頸管長の短縮であった。

A. 研究目的

日本における早産・低出生体重児の「感染性要因」「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相関する因子を抽出し、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。

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

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、詳細な説明を受けた後、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

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¹の消失、好中球増加)¹「三菱化学メディエンス(株)に依頼した。」
- 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)に依頼した。」
- 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)で行なった。
- 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・遺伝子研究に関する倫理指針、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箇所で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、研究告知の為のパンフレット等を作成した。

次年度からはこれらの体制により検体収集を行い、合計 1810 症例を収集した。1810 例のうち、分娩後の詳細なデータが得られなかった 218 例を除き、さらに妊娠 20-24 週の子宮頸管長の測定が行なわれなかった 227 例を除いた 1365 例で解析した。データは、まず単変量解析を行ない、その後 multiple logistic regression 法を行ない、P 値が 0.05 以下を有意差ありとした。1365 例中 34 週未満早産率は 1.5%(20/1365)、37 週未満早産率は 8.9%(122/1365)であった。

まず、妊娠 34 週未満早産のリスク因子につき検討した。社会経済的な因子として、中学卒例の早産率が 25%(1/4)と単変量解析では有意に高率であった($p < 0.001$)が、多変量解析では、有意差はなくなった。過去の早産歴も単変量解析では

2.4% (11/461)と早産歴のない症例での 34 週未満早産率が 0.8% (9/1100)に比し、有意 ($p=0.036$)に高値であったが、多変量解析では有意差が消失した。胎児の性別が男児であった場合の 34 週未満早産率 2.1% (17/821)は、女児である場合の値 0.4% (3/765)に比し、有意に ($p=0.0056$)高値であり、多変量解析でも胎児性別が女児であった場合のオッズ比 0.18、95%CI (0.05-0.63)と有意な差であった。妊娠 20-24 週の頸管長短縮は、単変量、多変量解析とも有意なリスク因子であり、頸管長 20mm、25mm、30mm、35mm 未満の 34 週未満早産率は、それぞれ 50%、33.3%、13.9%、4.9%と高率であった。次に、妊娠 37 週未満の早産のリスク因子につき検討した。その結果、仕事がパートタイム勤務である症例の早産率は 13.5% (30/222)と、専業主婦の値 6.6% (45/677)、フルタイム勤務の値 7.1% (46/645)に比し、有意に高値であった。多変量解析においてもオッズ比 2.05、95%CI (1.24-3.38)と有意な ($p=0.0053$)リスク因子であった。

既往歴では、子宮筋腫合併例で早産率が 15.7%と単変量解析で有意に高率で ($p=0.018$)、多変量解析でもオッズ比 2.43、95%CI (1.16-5.08)と有意なリスク因子であった。

服用製剤では、ステロイド剤(自己免疫疾患例や気管支喘息例であり、切迫早産例での胎児肺成熟を目的とした症例は除外した。)ならびに降圧剤使用群での早産率が 46.7% (7/15)、50% (6/12)と有意に高値となったが、多変量解析ではステロイド剤内服は、オッズ比 7.31、95%CI (2.21-24.20)と有意なリスク因子となり、降圧剤使用ではオッズ比 5.27、95%CI (0.95-29.21)と高い傾向 ($p=0.056$)があった。

妊娠 20-24 週時の頸管長短縮は、単変量、多変量解析とも有意 ($p<0.001$)なリスク因子であり、頸管長 20mm、25mm、30mm、35mm 未満での早産率は、それぞれ 75%、41.7%、23.6%、13.1%と高率であった。

その他、収入、細菌性膣症、喫煙、飲酒歴、頸管中 IL-8 値などは、早産のリスク因子ではなかった。

D. 考察

社会的経済因子、過去の既往歴、タバコやアルコール等の嗜好歴、細菌性膣症、頸管炎、頸

管長、胎児性別等の因子が、日本人の早産のリスク因子となるかについては、大規模な成績はこれまでに報告されておらず、本研究が初めてのものとなる。その中で判明したことは、パートタイム勤務が 37 週未満のリスク因子であることである。パートタイム勤務は日当制であり、妊娠期間中に切迫早産徴候があっても、十分に安静を保てない可能性がある。パートタイム勤務者の妊婦に対しては、きめ細かい指導と、場合によっては休職をして、自宅安静を勧めたり、入院が必要な際は、入院させる等の対策が必要となろう。また胎児が男児である場合、早産が多いことは、諸外国でも報告されており、超音波診断で、あらかじめ胎児性別を確認しておくメリットがある。子宮筋腫合併例、ステロイド剤内服では、早産のリスク因子となることは、これまでも知られていたが、今回の成績でも再確認され、産科診察においても十分に留意する必要がある。

子宮頸管長短縮は、妊娠 20-24 週 25mm 以下がリスク因子とされてきたが、今回の成績では 35mm 未満が早産リスク因子であることが判った。もちろん頸管長 25mm 未満では早産率が 41.7%と高率ではあるが、25-35mm の症例に対しても、力仕事等の負担を避けること、腹緊時には横になること、頻回な子宮収縮時には、産婦人科外来を受診するように指導することも、早産減少のためには有用であろう。今回の検討では、ゲノム解析は行えなかったが、これらの因子とゲノム因子とを組み合わせた早産のリスク因子の解明が必要であろう。ただし、臨床検体は保存してあるので、症例が累積された段階で、解析を行なう予定である。

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、ヒトゲノム・遺伝子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バイオリソースを構築し、データベース化された臨床情報と遺伝情報の疫学解析を行うための基盤体制が構築された。今回の成績で頸管長の短縮、児が男児であること、パートタイム勤務、子宮筋腫合併妊娠、ステロイド剤内服、妊娠 20-24 週時の頸管長短縮がリスク因子となった。今後、遺伝的な早産リスク因子との交絡を明らかにしたい。

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, Satoh S, Saito S. Comparison of risk factors for gestational hypertension and preeclampsia in Japanese singleton pregnancies. JOGR in press. 2012 Sep 25. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01990.x.
- 2) Darmochwal-Kolarz D., Saito S., Tabarkiewicz J., Kolarz B., Rolinski J., Leszczynska-gorzela B., Oleszczuk J.. Apoptosis Signaling Is Altered in CD4+CD25+FoxP3+ T Regulatory Lymphocytes in Pre-Eclampsia. Int. J. Mol. Sci. 13: 6548-6560, 2012.
- 3) Nakashima A, Shima T, Inada K, Ito M, Saito S. The Balance of the Immune System between T Cells and NK Cells in Miscarriage. Am J Reprod Immunol. 67:304-310, 2012.
- 4) Toldi G., Saito S, Shima T., Halmos A., Veresh Z., Vásárhelyi B., Rigó J., Molvarec A. The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 68:175-80, 2012.
- 5) Li LP, Fang YC, Dong GF, Lin Y, Saito S. Depletion of Invariant NKT Cells Reduces Inflammation-Induced Preterm Delivery in Mice. J Immunol. 2012;188:4681-4689. doi:10.4049/jimmunol.1102628
- 6) Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. : Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. Am J Med Genet A. 2012;158A:1670-5.
- 7) Matsuda Y, Kawamichi Y, Hayashi K, Shiozaki A, Satoh S, Saito S. J Obstet Gynaecol Res. Impact of maternal age on the incidence of obstetrical complications in Japan. 2011; 37:1409-14.
- 8) Vujaklija DV, Gulic T, Sucic S, Nagata K, Ogawa K, Laskarin G, Saito S, Haller H, Rukavina D. First trimester pregnancy decidual natural killer cells contain and spontaneously release high quantities of granulysin. Am J Reprod Immunol. 2011;66:363-372.
- 9) Saito S, Nakashima A, Ito M, Shima T. Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology. Expert Rev Clin Immunol. 2011;7:649-657.
- 10) Namba F., Ina S., Kitajima H., Yoshio H., Miura K., Saito S., Yanagihara I. Annexin A2 in amniotic fluid: Correlation with histological chorioamnionitis, preterm premature rupture of membranes, and subsequent preterm delivery. J. Obstet. Gynecol. Res. 38:137-144, 2011.
- 11) Molvarec A., Shiozaki A., Ito M., Toldi G., Stenczer B., Szarka A., Nakashima A., Vásárhelyi B., Rigó J. Jr., Saito S. Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. J Reprod Immunol. 91:56-63, 2011.
- 12) Shiozaki A., Matsuda Y., Satoh S., Saito S.: Impact of fetal sex on pregnancy-induced hypertension/pre-eclampsia in Japan. J Reprod Immunol. 89:133-139, 2011.
- 13) 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