

厚生労働科学研究委託費（成育疾患克服等総合研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

## 早産のエピジェネティクス分析

担当責任者 高橋尚人 東京大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター  
准教授

研究要旨 低出生体重児は冠動脈疾患・肥満・2型糖尿病・メタボリックシンドロームをはじめとした成人後疾病発症のハイリスクとされ、エピジェネティックな変化がそのメカニズムの一つとして想定されているが、その証明はなされていない。本研究は極低出生体重児に焦点を当て、臍帯血・生後末梢血・胎盤絨毛膜板を用いて網羅的 DNA メチル化解析と遺伝子発現解析を行うことにより、出生時・出生後の栄養状態・治療がエピジェネティックな修飾状態と遺伝子発現に与える影響およびそれらの関連を検証することを目的とする。東京大学医学部附属病院と国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得て、2014年11月より検体の回収を開始し、2015年1月末までに、35例の検体を採取した。今後、さらに検体採取を進めるとともに、解析を行う。メチル化解析・発現解析の過程で有意な情報が得られた場合は、DNA メチル化や発現に影響を与える遺伝因子について、SNP(single nucleotide polymorphism;一塩基多型)アレイ解析などを用いた検討を追加する。

### A. 研究目的

近年、胎児期の環境が将来の生活習慣病の発症に影響するという仮説が提唱され、DOHaD(developmental origins of health and disease)と呼ばれている。この仮説は疫学的検討および動物実験では実証されつつあるが、ヒトにおけるそのメカニズムはまだ不明である。そのメカニズムの一つとして、環境に合わせて遺伝子発現を調節するエピジェネティクスが想定されている。一方、極低出生体重児（出生体重 1500g 未満の児）をはじ

めとする多くのハイリスク新生児が生存可能となっているが、これらハイリスク児には子宮内環境のみならず出生後にも医療など様々な環境要因が負荷される。従って、極低出生体重児には出生前のみならず出生後においてもエピジェネティクスの面で、様々な変化があることが想定される。

現在、これら胎生期から新生児期にかけてのエピジェネティクスについては、正期産児および late preterm の児についての検討はいくつか報告されているが、さ

らなる早産児や極低出生体重児に絞った解析はなされておらず、特に網羅的解析についての報告は皆無である。

本研究では、極低出生体重児の臍帯血および生後の末梢血、さらに胎盤から DNA を抽出し、網羅的メチル化解析および遺伝子発現解析を行うことにより、出生時・出生後の栄養状態・治療がエピジェネティックな修飾状態と遺伝子発現に与える影響およびその関連を検証する。さらに、この解析過程で有意な情報が得られた場合は、DNA メチル化や発現に影響を与える遺伝因子について、SNP アレイ解析および全エクソン配列解析を用いた検討を追加する。

## B. 研究方法

本研究は東京大学（以下、東大）医学部産婦人科・小児科と成育医療研究センター周産期病態研究部の共同研究とする。東大が主たる研究施設となる。

主な対象は東京大学医学部附属病院（以下、東大病院）で出生する極低出生体重児とするが、同時に出生体重 1500g 以上の新生児についても、比較対照として同様に検体採取を行う。検体は胎盤、臍帯血、生後の末梢血とする。これら新生児の出生後に臍帯血 2ml と胎盤 3cm<sup>3</sup> を採取する。また、新生児がそのまま東大病院新生児集中治療部に 2 週間以上入院する場合、受胎後 36～42 週の時点で末梢血を 1-2ml 採取する。

東大小児科において、これら採取した

血液からリンパ球を分離し、DNA と RNA を抽出した後、成育医療研究センターに搬送する。胎盤については、東大にて小片を取り分けた後、速やかに凍結保管とし、成育医療研究センターに搬送し、その後 DNA と RNA を抽出する。

これらの DNA について、成育医療研究センターにおいて DNA のメチル化を網羅的に解析する。その後、DNA のメチル化の状況を、在胎週数や出生体重、胎児発育遅延の有無(SGA vs non SGA: \*SGA; small for gestational age)、母体因子などの臨床情報、児への治療内容(呼吸管理, 栄養状況など)、遺伝背景および各遺伝子の発現状態と照らし合わせて、統計学的解析を行う。もしこの過程で有意な情報が得られた場合は、DNA メチル化に影響を与える遺伝要因について、成育医療研究センター周産期病態研究部で、一塩基多型(SNP)アレイ解析および全エクソン配列解析、遺伝子発現アレイを用いた検討を追加する。全ゲノムシーケンス解析は行わない。

（倫理面への配慮）

研究は東京大学医学部附属病院ヒトゲノム倫理委員会・成育医療研究センター倫理委員基へ申請を行い、承認を得た（審査番号: 東大 G10036、成育 234）。その申請内容に基づき、検体・資料の匿名化を行い、個人情報保護した。臍帯血・胎盤絨毛膜板に関しては、母児に負担をかけずに採取を行っている。生後の末梢血に関しても、検体量は 1-2mL と直後の貧

血につながる量ではない。あくまで生後の児血の採取は定期採血と同時に行うこととしており、本研究のためだけの児からの採血は行っていない。また、児の全身状態が不安定と主治医が判断した際には生後末梢血採取は行っていない。研究参加者は新生児のため、その保護者に口頭ならびに文書にて説明し同意書を取得している。

#### C. 研究結果

2014年4月～10月の間は、検体処理プロトコルの作成、予備実験など研究開始にあたっての基盤作りを行なった。予備実験では健常成人血液検体を用いて単核球分離後、核酸精製ができることを確認した。2014年11月から臨床検体(臍帯血、生後の末梢血、胎盤絨毛膜板)の回収を開始し、2015年1月31日までに極低出生体重児9例、比較対照の児26例から検体回収し、全例のDNA回収に成功している。RNAに関しては生後の末梢血が1例回収できなかったが、残りの対象症例に関しては回収できている。これまでの研究参加症例35例の内訳は、35例全体の中で男児15例、女児20例、SGA児10例(男児5例、女児5例)、non SGA児25例(男児10例、女児15例)であった。在胎週数に関しては23週2日から40週2日の範囲(中央値37週3日)で、出生体重に関しては300gから3576gの範囲(中央値2540g)である。在胎週数32週以下の症例は9例でこのうちSGA児は5例、non SGA

児は4例であった。

#### D. 考察

予算執行が10月末からで、検体採取開始が遅かったこともあり、現時点で網羅的メチル化解析は行えていないが、年度内に開始する予定である。検体採取が順調に進んでいることから、今後さらに検体回収を進める。極低出生体重児の検体回収も進んではいるが、進捗速度の改善が望まれるため、現在、他の施設の当研究への参入を検討中である。

今までに検体を採取した対象について、週数・出生体重・SGAの頻度を考慮した症例の多様性もあり、今後の研究を進める上で十分に検討の対象になるものと考ええる。

メチル化解析・発現解析の過程で有意な情報が得られた場合は、DNAメチル化や発現に影響を与える遺伝因子について、SNPアレイ解析などを用いた検討を追加する予定で、その準備も開始している。

#### E. 結論

研究初年度で、倫理申請、検体処理プロトコルの作成、予備実験など研究開始にあたっての基盤作りを行なった。2014年10月末の予算執行後、同年11月より検体(臍帯血、生後の末梢血、胎盤絨毛膜板)の回収を開始し、回収状況は順調である。平成27年度は残りの検体回収を行う。メチル化解析・発現解析の過程で有意な情報が得られた場合は、DNAメチル化や

発現に影響を与える遺伝因子について、  
SNP アレイ解析などを用いた検討を追加  
する。

F．健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括  
研究報告書にまとめて記入）

G．研究発表

1. 論文発表

なし

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