

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成30年度分担研究報告書

既存の毒性データおよびヒトデータとの検証

研究分担者 国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所
周産期病態研究部 部長
秦 健一郎

要旨

近年、妊娠中の母親への摂取栄養の程度や栄養成分の偏りによって、胎児のエピゲノムに影響し、生後の発育や疾患の発症に寄与するという DoHaD (Developmental Origins of Health and Disease) のコンセプトが提唱されており、そのメカニズムについて明らかになりつつある。本研究では動物実験を中心に DoHaD のメカニズムについて文献調査を行った。また、陽性対照物質バルプロ酸などの作用メカニズムを明らかにするため、ヒトのエピゲノムデータに関して研究を行い、胎児期あるいは新生児期に受けた影響により、ゲノムのメチル化が生じ生後長期に渡って継続し、疾患リスクとなる可能性を見出した。さらに、バルプロ酸投与例の胎盤のエピゲノム解析を行い、メチル化の揺らぎの重要性を明らかにした。本調査研究により、胎児期あるいは新生児期の環境要因はゲノムの DNA メチル化状態を変化させ、長期遺残して遺伝子発現に影響する可能性が示唆された。

A．研究目的

本研究では動物実験を中心に DoHaD のメカニズムについて文献調査を行った。また、ヒトのエピゲノムデータに関する調査を開始した。

B．研究方法

DoHaD コンセプトをもとに動物実験によりメカニズムの解析を行っている文献を調査した。また、ヒトのエピゲノムデータを解析している文献についても調査研究を行った。

C．研究結果

調査研究の結果を、以下に記載する。

(1) 胎仔期・新生仔期の外因性内分泌かく乱物質への暴露が精子のインプリント領域 DNA メチル化異常を誘引し、その精子で受精した胚は最終的に流産あるいは不妊・不育症の原因となる (Guerrero-Bosagna et al. Curr Opin Genet Dev. 2014)。広く環境中に存在する合成エストロゲンのビスフェノール A (BPA) の新生仔期への暴露により、H19 インプリント領域の有意な低メチル化と遺伝子発現異常が認められ、かつこのラットの精子で受精した胚は着床後胚損失が生じた (Doshi et al. Mol Biol Rep. 2013)。農業用の防カビ剤の成分であるピンクロゾリンの胎仔の生殖腺の性分化が行われる時期の妊娠中雌ラットへの暴露は、胎仔の精子エピジェ

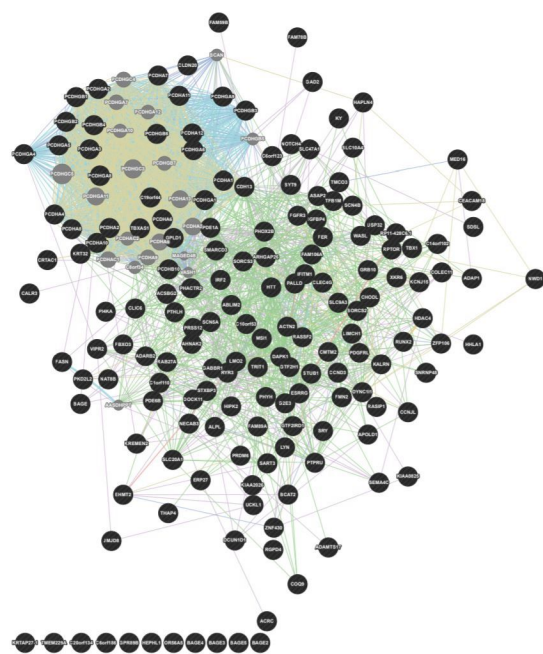
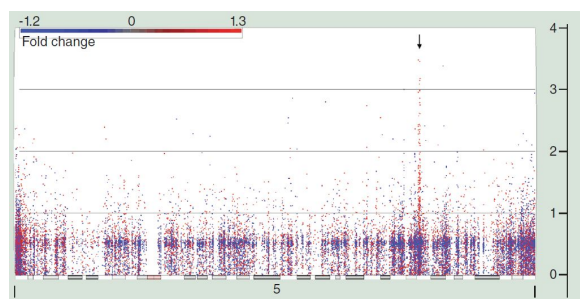
ネティック異常と精子形成細胞のアポトーシスが3世代後まで遺残する (Anway et al. Science. 2005)。世代を超えたエピジェネティクス異常がいくつかのインプリント領域で生じる一方、世代を超えるごとに徐々に正常化する (Stouder et al. Reproduction. 2010)。ピンクロゾリン暴露による精子エピジェネティックへの影響は、胎生期の中でも始原生殖細胞ゲノムのDNAメチル化が一度すべて消去される時期での暴露が顕著 (Skinner et al. PLoS ONE. 2013)。

(2) ヒト血中レベルのBPAの妊娠期間中マウスへの暴露は、出生直前 (E18.5) の雌胎仔マウスの脳内のDNAメチル化酵素 Dnmt1 と Dnmt3a 量減少とグルタミン酸トランスポーター Slc1a1 発現を上昇させた (Wolstenholme et al. PLoS One. 2011)。子宮内のBPA暴露によって生後28日目の雌仔マウスの海馬 Bdnf の発現が上昇し、一方で雄仔マウスが減少。この影響は雌雄ともに生後60日目まで確認され、雄マウスの発現低下は Bdnf プロモータの高メチル化と連動していた。さらに、ヒトにおいても妊娠中の血中のBPA濃度が高かった母親から生まれた男児の臍帯血DNAでBDNFのメチル化が高くなった (Kundakovic et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014)。最近の報告では、人体に影響はないといわれている濃度以下での動物実験において、妊娠中のBPA暴露が新生仔の脳内の遺伝子発現を変化させている。影響に性差が認められる結果は一致しており、新生雌ラットでは、視床下部におけるエストロゲンレセプター、の発現と、海馬と視床下部のオキシトシンの発現が上昇していた。一方新生雄ラットでは海馬のオキシトシンの発現が減少していた (Arambula et al. Endocrinology. 2016)。妊娠中のBPA暴露の影響は、孫世代の仔の行動異常にも認められた (Wolstenholme et al. Horm Behav. 2013)。

(3) 妊娠中の喫煙はヒト臍帯血の解毒や免疫機能に関わる遺伝子 (AHRR、MYO1G、CYP1A1、CNTNAP2 など) のメチル化を変化させ、この変化は17歳時点の血液中でも

継続した (Richmond et al. Hum Mol Genet. 2015)。

(4) 妊娠中のアルコール摂取がDNAメチル化をはじめエピジェネティック制御に及ぼす影響についても、動物モデルからヒト培養細胞を用いた解析、胎児性アルコール・スペクトラム障害 (FASD) 検体の解析までと、広く報告されている。アルコールはDNAメチル化酵素 DNMT1 の活性を低下させ、全体のメチル化レベルを抑制することが明らかにされており (Garro et al. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1991)。この結果は、マウスの妊娠中のアルコール曝露実験でも、神経幹細胞のメチル化獲得の遅延として確認されている (Chen et al. PLoS One. 2013)。FASDである3-6歳の幼児の頬粘膜上皮細胞のDNAメチル化解析の結果、protocadherin 遺伝子上でクラスター



を形成して21か所のメチル化サイトが高メチル化していること、メチル化変化が認められた遺伝子群は、hippo signaling,

glutamatergic synapse, calcium signaling と神経細胞の機能を示唆するパスウェイ上の遺伝子で有意に濃縮されていることが認められている(図 1) (Laufer et al. Epigenomics 2015)。

図 1 胎児性アルコール・スペクトラム障害患児に共通してメチル化変化が認められた遺伝子。PCDHG 遺伝子クラスターに集中して変化が認められた。(Laufer et al.より)

さらに多検体の FASD の児童を解析した報告でも、FASD の頬粘膜上皮細胞で有意に高メチル化していた遺伝子群に protocadherin 遺伝子が認められ、neurodevelopmental processes や anxiety, epilepsy, autism spectrum disorders に関連した遺伝子が有意に濃縮されていたことを明らかにした (Portales-Casamar et al. Epigenetics Chromatin 2016)。

(5) 妊娠中の体重変化が至適でない(妊娠中の体重増加が 7 kg 未満あるいは 12kg 以上だと) 出生児の胎盤の DNA メチル化状態に外れ値が多く観察された(図 2) (Kawai et al. SciRep.2015)。体重変化が至適でない妊婦では、何らかの栄養状態の偏りがあつたと推測されるが、その環境ストレスは胎児に影響を与えた結果、DNA メチル化値の外れ値の多寡(エピゲノムの「乱れ」)を引き起こしたと考えられる。妊娠中の体重増加が不適切な検体のなかの 3 例で、胎盤の GABA receptor subunit 遺伝子にメチル化外れ値が検出されたことより(図 3)、神経発生においても子宮内環境が同遺伝子のエピジェネティック制御に影響し、異常な発達に關与するかもしれない可能性が示唆された。

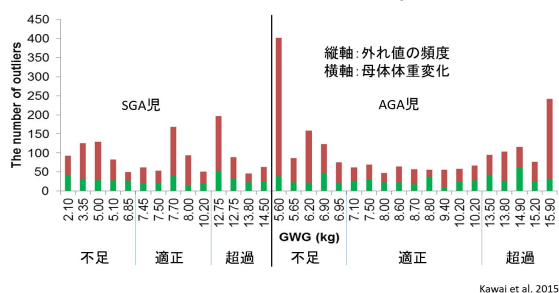


図 2 妊娠中の体重変化が至適でない、出生児の体重は正常であっても、胎盤の DNA メ

チル化状態に外れ値が多く観察された。

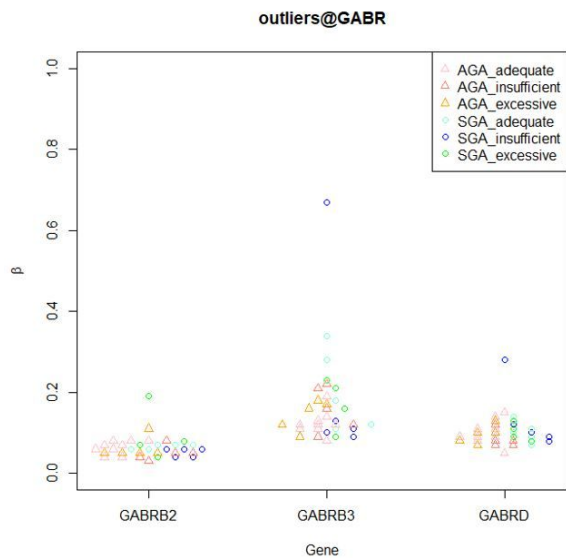


図 3 妊娠中の体重増加が不適切な検体のなかの 3 例で、胎盤の GABA receptor subunit 遺伝子にメチル化外れ値が検出された

D. 考察

上記の調査研究により、以下のことが示唆された。

- ・胎仔期・新生仔期の環境要因の影響が出生後も持続して認められる。
- ・発生段階の脳では、一過性の発現変化も結果的に不可逆的な脳機能変化を引き起こし、これは初期エピジェネティックな調節異常が遺残するためである。
- ・始原生殖細胞における親由来 DNA メチル化情報の消去が正常に行われることが生殖能力に重要。
- ・発生段階の脳において、外因性内分泌かく乱物質暴露によるエピジェネティック異常に伴う機能異常が生じる。
- ・発生初期の子宮内における環境要因の影響が、脳の発達においてエピジェネティックな制御を介し生後遺残する可能性。
- ・ヒトでもこれらのエピゲノム変化が起こる可能性。
- ・ヒトの子宮内環境の影響は、神経細胞以外の細胞でも、神経細胞の機能に関連する遺伝子の DNA メチル化変化として発達後も確認される。

E. 結論

本調査研究により、胎児期あるいは新生児期の環境要因はゲノムのDNAメチル化状態を変化させ、長期遺残して遺伝子発現に影響する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Urushiyama D, Suda W, Ohnishi E, Araki R, Kiyoshima C, Kurakazu M, Sanui A, Yotsumoto F, Murata M, Nabeshima K, Yasunaga S, Saito S, Nomiya M, Hattori M, Miyamoto S, Hata K : Microbiome profile of the amniotic fluid as a predictive biomarker of perinatal outcome. Scientific Reports, 2017;7:12171
2. Kawai T, Hata K : Reproductive/Developmental Abnormalities Induced by Epigenetic Aberrations and Possible Environmental Causes. Nihon Eiseigaku Zasshi. 2016;71:195-199
3. Ito Y, Maehara K, Kaneki E, Matsuoka K, Sugahara N, Miyata T, Kamura H, Yamaguchi Y, Kono A, Nakabayashi K, Migita O, Higashimoto K, Soejima H, Okamoto A, Nakamura H, Kimura T, Wake N, Taniguchi T, Hata K : Novel Nonsense Mutation in the NLRP7 Gene Associated with Recurrent Hydatidiform Mole. Gynecol Obstet Invest. 2016;81:353-358
4. Nohara K, Okamura K, Suzuki T, Murai H, Ito T, Shinjo K, Takumi S, Michikawa T, Kondo Y, Hata K :

Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring. J Appl Toxicol. 2016;36:105-112

5. Kawai T, Yamada T, Abe K, Okamura K, Kamura H, Akaishi R, Minakami H, Nakabayashi K, Hata K : Increased epigenetic alterations at the promoters of transcriptional regulators following inadequate maternal gestational weight gain. Sci Rep. 2015;5:14224.

2. 学会発表

1. 秦健一郎 : DOHaD theory in human cases: Inheritable epigenetic changes caused by environmental factors. 第60回日本神経化学学会, 仙台, 2017.9.7
2. 秦健一郎 : 「『ARTとDOHaDの相互理解と将来への展望』-生命誕生とエピジェネティクス」第35回日本受精着床学会総会・学術講演会, 米子, 2017.7.21
3. 秦健一郎 : 「DOHaDをひろげるために」DOHaD研究会学術集会会長講演, 東京, 2016.7.25
4. 秦健一郎 : Inadequate maternal gestational weight gain increased epigenetic alterations at the promoters of transcriptional regulators in placenta, Joint Japan-New Zealand DOHaD Researchers Seminar, Auckland, 2016.2.2

G. 知的財産の出願・登録状況
該当なし