

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
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、ヒトのエピゲノムデータについても調査を行った。

A. 研究目的

出生前後の環境が数十年後の疾患発症に関連していることが、疫学研究により明確に示されている。この現象を司る分子機構の一つとして、エピジェネティックな制御が示唆されており、それを裏付けるデータも集積してきている。これらの知見を背景に DOHaD（Developmental Origins of Health and Disease）学説が提唱され、予防医学や先制医療の観点からも注目されている。また、このメカニズムを介して疾患発症を引き起こす出生前後の環境要因についても、栄養環境だけではなく、様々な要因の関与が示唆されている。本研究では、DOHaD のメカニズム解明を目的に行われたこれまでの動物実験の報告より、とくに化学物質の影響に着目した報告を取りまとめることを目的とした。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ついても調査した。

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。また、妊娠中のバルプロ酸内服症例から出生した児の臍帯血 DNA メチル化状態を解析した。

C. 研究結果

調査研究の結果を、以下に記載する。エピゲノムすなわちエピジェネティックな情報とは、ゲノムを変化させずにはたらきを決め、しかもゲノム（DNA の塩基配列）を介さないにもかかわらず「遺伝」することである。エピゲノムを担う代表的な分子の実体として、ヒストンのメチル化・アセチル化や、DNA のシトシンのメチル化が挙げられる。哺乳類の初期発生時には特に、これらのエピゲノムがダイナミックに変化して消去と再構築されることが知られている。具体的には、受精直後に精子由来のメチル化は速やかに消去され（能動的脱メチル化）、卵子由来のメチル化はそれに遅れ、DNA 複製依存的に維持されずに失われていく（受動的脱メチル化）。親由来の DNA メチル化修飾情報はこのように、大部分が一度消去され、

その後胚盤胞期まで低メチル化状態にある。着床後、それぞれの細胞は複数の DNA メチル化酵素によって、発生段階特異的かつ組織特異的な DNA メチル化修飾を確立する。このように、受精後から発生初期に観察されるエピゲノムの初期化と再構築の時期は、可塑性に富んでいると考えられ、この時期の環境負荷により DNA メチル化状態の違いが生じれば、その違いは長期にわたりそのまま残っている可能性が考えられる。もともと DNA メチル化は、細胞が分裂しても安定して娘細胞に情報が維持される性質を有しており、そのような特徴もこの可能性を支持する点である。したがって、DOHaD 学説はこの時期のエピジェネティックな制御に注目している。さらに、DOHaD 学説が注目する受精時、胎児期、新生児乳幼児期の環境には、栄養環境だけではなく、内分泌かく乱物質などの影響や、喫煙や飲酒の影響、母体の精神状態に起因する内分泌の乱れ、等も含まれる。

(1) 妊娠中の神経内分泌異常の胎児への影響について

妊婦の精神的ストレスが、胎児の内分泌系にかかわる遺伝子のエピゲノム変化を誘導する可能性は、検証数を重ねることで確実性を増してきている。胎児の視床下部-下垂体-副腎の神経内分泌系、いわゆる HPA axis は、妊娠 22 週目より発達し 2 歳までの間は可塑性があることが知られている。したがって、妊娠中の母体のストレス経験が胎児の HPA axis をプログラムし永久的にその機能を変化させる可能性がある。Palma-Gudiel らによる 7 論文に基づく 977 人の被験者のメタ解析の結果は、妊娠中の不安状態やうつ傾向が、児のグルココルチコイドレセプター(GR) 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化レベルと有意に相関することを示している。メタ解析で対象とした 7 論文のうち 3 論文は 136 名、25 名あるいは 74 名分の臍帯血 DNA メチル化値を測定しており、残り 4 論文は、胎盤 (482 名分)、生後 2 か月前後の口腔粘膜 (56 名分)、14 か月時前後の唾液 (181 名分)、

14 歳前後の末梢血 (23 名分) を解析している (Palma-Gudiel H et al. Epigenetics 2015)。この領域の DNA メチル化が上昇していると、GR 遺伝子の発現抑制によるグルココルチコイド不応性、抵抗性、が亢進するため、社会心理的ストレスに脆弱性を示す可能性が示唆されている。

(2) 胎児期の外因性内分泌かく乱物質暴露が成人期の生殖能に及ぼす影響について  
胎児期・新生児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) の新生児期への暴露により、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ビ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)。ビ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  $\alpha$ 、 $\beta$  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) 妊娠中の喫煙の影響

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)。

### (4) 妊娠中の母体体重増加量の胎児への影響

妊娠中の体重増加量が妊婦の栄養状態を反映すると仮定し、胎児への影響を計測するために胎盤 DNA メチル化の計測を行った。母体の体重変化が適切でないと (妊娠中の体重増加が 7kg 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 1) (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ったと推測されるが、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 2)、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、異常な発達に関与するかもしれない可能性が示唆された。

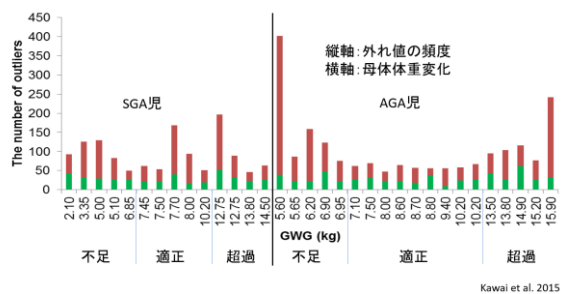


図1 妊娠中の体重変化が至適でないとき、出生児の体重は正常であっても、胎盤のDNAメチル化状態に外れ値が多く観察された。

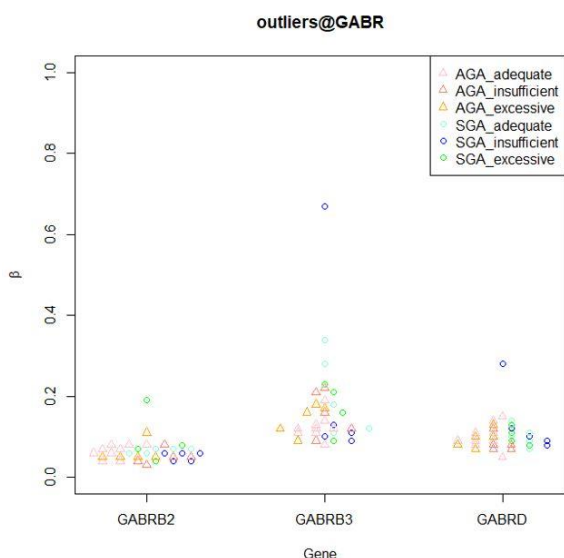


図2 妊娠中の体重増加が不適切な検体のなかの3例で、胎盤のGABA receptor subunit 遺伝子にメチル化外れ値が検出された

(5) 世代を超えて遺残する環境の影響  
環境の影響は、本人のみではなく、世代を超えた影響がありうることで、その分子機構の解明が、近年多数報告されている。つまりは、ここまで述べてきた対象者の胎児期や新生児・乳幼児期だけでなく、対象者の親が若い頃の環境や、祖父母が経験した環境の影響にも注目が集まっている。

慢性的な高脂肪食下にあるオスのラットを親とするメスは、適正な食餌を与えても糖代謝異常とβ細胞機能不全が認められ、対照群に比べ膵島で多くの遺伝子の発現量が異なっており、プロモーターのDNAメチル化状態が異なっている遺伝子も同定された(Ng et al. Nature 2010)。また、若い時にタンパク質欠乏食を与えられたオスは、その後適正な

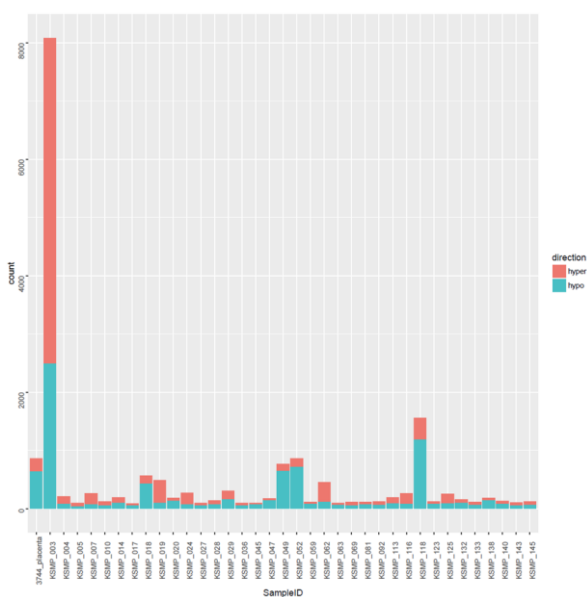
食餌を与えても、自身の仔の肝臓で代謝にかかわる多くの遺伝子の発現が異常を呈し、脂質代謝のマスターレギュレーターであるPparaのDNAメチル化が異なっていた(Carone et al. Cell 2010)。これらの報告が2010年に共に発表されて以来、父親の生活環境が次世代に影響する現象とその分子機構の解明に関する報告がこれまでに集積してきている。不適切な食事負荷により糖尿病予備軍にあるマウスでは、精子のDNAメチル化パターンが健常のそれと異なっており、この異常メチル化パターンが世代を超えて仔の膵島でも確認され、仔世代の代謝異常を引き起こしていることが報告された(Wei et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014)。一方で、世代を超えて食事の乱れの影響が伝わるメカニズムは、DNAメチル化そのものの遺残ではないという報告もある。解析対象となるマウス(第3世代)の父(第2世代)が、父自身の母親(すなわち解析対象から見ると祖母、第1世代)の胎内にいる時期に栄養不良に曝されると、その時期の父(第2世代)の生殖細胞にDNAメチル化変化が起き、出生後も精子メチル化パターンの変化が遺残し、その影響が解析対象(すなわち、栄養不良だった妊娠マウスから見ると孫、第3世代)の代謝異常を引き起こしている可能性が示された(Radford et al. Science 2014)。この論文では、父(第2世代)の異常精子メチル化パターンは、仔(第3世代)の脳と肝臓には伝わっておらず、直接の代謝異常の原因ではないことが示唆される。前述したように、胚の発生初期には親由来のエピジェネティックな情報は一旦消去されて再構築されるため、これは理にかなっている。ところが、解析対象マウスの体組織において異常な発現が認められる遺伝子は、解析対象(第3世代)から見て祖母(第1世代)の栄養不良に伴い父(第2世代)の精子で観察されるDNAメチル化異常領域の近傍にある遺伝子であり、やはり何らかの因果関係があることが強く示唆される。DNAメチル化以外の分子機構、例えばヒストン修飾の異常による伝達が候補に挙げられるが、実際にヒ

ストン修飾の乱れが世代を超えて伝わる可能性も報告されており(Siklenka et al. Science 2015)、あるいはオスの食環境の乱れが精子内の RNA 分子を介した伝達をする可能性も示され(Sharma et al. Science 2016)、今後の研究発展が注目される。現在のところ、これらの分子機構は動物モデルにおける検証にとどまっているが、ヒトでも同様の分子機構が存在する可能性は十分に考えられる。

(5) 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)。

(6) 妊娠中のバルプロ酸内服が胎児に与える影響

国立成育医療研究センターバイオバンクで、1 例のみ、妊娠中にバルプロ酸内服を継続していた例を収集することができた。同症例の妊娠中のバルプロ酸血中濃度はお 40-60ug/ml を推移し、妊娠分娩経過に特段の異常を認めなかった。図 2 と同様に、本症例の胎盤 DNA メチル化の外れ値検定 (多いほど DNA メチル化が乱れている) を検証する



と、外れ値平均値が  $282.3 \pm 305.1$  だったのに対し、同症例は 860 と外れ値が高い、すなわち、DNA メチル化が乱れている傾向が示唆

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。

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. ヒトでもこれらのエピゲノム変化が起こる可能性。
7. 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。
8. 1 症例ではあるが、バルプロ酸に暴露された胎児の DNA メチル化状態は乱れている傾向が観察された。

#### E. 結論

環境による影響は、胎児期あるいは新生児期にエピゲノム状態を変化させ、生後長期に渡って継続し、疾患リスクとな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