

論文の内容の要旨

論文題目 早産児・低出生体重児における血液検体での
DNA メチル化解析・遺伝子発現解析に基づいた
エピジェネティック変化の探索

氏名 鹿嶋晃平

【序文】 出生体重 2,500g 未満の低出生体重児は我が国では 10%、OECD 加盟国全体でも 6~7%と一定の出生率を占める。低出生体重児は、在胎週数 37 週未満の早産児と出生体重 10パーセントイル未満(-1.28SD 未満に相当)の Small for Gestational Age (SGA)児に分類されるが、いずれも周産期に子宮内外で栄養不良や低酸素に曝露され、生存のための適応を強いられることが多い。Barker らの報告以降、低出生体重児や早産児が成人期あるいは学童期以降に 2 型糖尿病、インスリン感受性低下、冠動脈疾患、血圧上昇、骨粗鬆症、精神疾患などの発症頻度が高いことが疫学的に明らかになってきており、「生存のための適応の過程で、成人後の疾病体質が形成される」DOHaD 仮説が支持を集めている。この「疾病体質の形成」にはエピジェネティックなメカニズムが関与しているのではないかと考えられている。早産児・低出生体重児の分野では、DNA メチル化と在胎週数や出生体重などの臨床情報との関連を調べるエピゲノムワイド関連解析(EWAS)は世界中で行われており、知見も蓄積されているが、遺伝子発現との関連はほとんど検討されておらず、周産期に起こったメチル化変化の生後の持続(エピジェネティックメモリー)に関しては結論が出ていない。本研究の目的は DNA メチル化解析および遺伝子発現解析に基づいて早産および SGA に関連したエピジェネティック変化を調べ、生後にも持続する変化を探索することである。本研究は早産および SGA 児の分野において、日本における血液検体でのエピゲノムワイド関連解析(EWAS)を行った最初の研究である。

【方法】 東京大学医学部附属病院および東京都立墨東病院で出生した在胎 23~41 週の早産児・正期産児のうち同意をいただいた母児を対象に、臨床データ、臍帯血サンプル、および採取可能な場合に限り児の生後末梢血サンプルを収集した。臍帯血・生後末梢血サンプルは回収後、単核球分離を行い、DNA および RNA を同時抽出した。先天性疾患や双胎、品質に問題のあるサンプルなどを除外した後、解析可能な臍帯血 DNA 110 サンプル、臍帯血 RNA 55 サンプル、生後末梢血 DNA 47 サンプルを用いて DNA メチル化アレイ (Infinium HumanMethylation450 BeadChip: 約 48 万個の CpG プローブを搭載; イルミナ社)および遺伝子発現アレイ (SurePrint G3 Human GE microarray 8×60K Ver. 3.0: 約 6 万個の遺伝子発現プローブを搭載; アジレント社)により、アレイデータを出力した。早産の指標を在胎週数、SGA

の指標を出生体重 SD スコアと決めて統計解析した。統計解析の枠組みは大きく、(1) 在胎週数ないし出生体重 SD スコアと関連のある臨床的特徴の検討 (交絡因子の検討; $n = 110$)、(2) 在胎週数ないし出生体重 SD スコアについての臍帯血でのエピゲノムワイド関連解析 (EWAS; $n = 110$)およびパスウェイ解析、(3) 在胎週数ないし出生体重 SD スコアについての臍帯血での遺伝子発現関連解析($n = 55$)およびパスウェイ解析、(4)DNA メチル化変化と遺伝子発現の関連の確認 ($n = 55$)、(5) エピジェネティックメモリーの候補絞り込み(出生時の DNA メチル化変化が生後にも持続しているか検討; $n = 47$)の 5 つで構成され、左記の順に解析した。尚、EWAS および遺伝子発現関連解析は線形回帰モデル(目的変数: DNA メチル化/遺伝子発現(log2 スケール)、説明変数: 在胎週数および出生体重 SD スコア、調整変数: 細胞分画(B cell、CD4T cell、CD8T cell、NK、Granulocyte、Monocyte、nucleated RBC; DNA メチル化アレイデータから推測可能)、実験バッチ、性別など)を用いた多変量解析で行った。エピジェネティックメモリーの候補絞り込みについては、臍帯血メチル化率と生後末梢血メチル化率の間の相関係数が 0.7 以上の CpG サイトを採択対象とした。

【結果】 (1) 出生前の臨床情報のうち、在胎週数と関連を認めた($p < 0.05$)のは、絨毛膜羊膜炎、妊娠前の母体喫煙、妊娠前母体 BMI、帝王切開、男児、出生体重 SD スコアであった。その他、炎症を伴わない特発性の前期破水が suggestive な関連($p = 0.06$)を認めた。一方、出生体重 SD スコアと関連を認めたのは、妊娠高血圧症と在胎週数であった。 (2) 左記(1)の結果を踏まえて、在胎週数ないし出生体重 SD スコアについての臍帯血での EWAS を行ったところ、多重検定補正後 FDR < 0.05 の基準で 27,619 箇所(在胎週数関連 CpG) および 150 箇所の SD スコア関連 CpG を認めた。パスウェイ解析では、メチル化率減少型 CpG(週数が進むとメチル化率が減少する CpG)では NF-kappa B signaling pathway などが、メチル化率増加型 CpG では PI3K-Akt signaling pathway などがエンリッチされていた。 (3) EWAS の結果、在胎週数ないし出生体重 SD スコアと関連のあった CpG 計 27,701 箇所に対応する遺伝子発現プローブ 9,691 個について遺伝子発現関連解析を行ったところ、出生体重 SD スコアと FDR 基準で関連のある遺伝子発現プローブはなく、 $p < 0.05$ (補正なし)の基準でも 6 個であった。一方、在胎週数と関連のある発現プローブは FDR 基準で 401 個、 $p < 0.05$ (補正なし)の基準で 1,834 個であった。(4)以降の解析には前者のプローブだけを用いた。後者のプローブでパスウェイ解析を行ったところ、発現増加型(週数が進むと発現が増加)のプローブでは、NF-kappa B signaling pathway などが、発現減少型では PI3K-Akt signaling pathway などがエンリッチされていた。 (4) 左記(3)において、FDR 基準で採択した在胎週数関連遺伝子発現プローブ 401 個と対応する在胎週数関連 CpG1,085 箇所の組み合わせ 1,179 通りを、RefSeq 遺伝子を介して作成した。1,179 通りの組み合わせのうち、 $p < 0.05$ の基準で関連が確認されたのは 672 通り(RefSeq 遺伝子として 257 個)であった。このうち負の相関(メチル化率が増加すると遺伝子発現が減少する関係)をとる組み合わせが 426 通りで、正の相関をとる組み合わせは 246 通りであった。在胎週数関連 CpG27,619 箇所のうち、対応する遺伝子に在胎週

数との関連を認め、DNA メチル化と遺伝子発現の直接の相関を認めたものは 628 箇所であった。(5) 在胎週数関連 CpG 27,619 箇所のうち、臍帯血-生後児血間メチル化率相関係数が 0.7 以上のもの(エピジェネティックメモリーの候補)は 2,093 箇所であった。一方、出生体重 SD スコア関連 CpG 150 箇所のうち、エピジェネティックメモリーの候補は 7 箇所であった。在胎週数関連のエピジェネティックメモリー候補 2,093 箇所について、12 種のヒストンマークで特徴づけられる 25 種のクロマチン状態(ChromHMM による)のエンリッチメントを調べたところ、抑制性のポリコームの結合部分がエンリッチされていた。また、在胎週数関連のエピジェネティックメモリーの候補 CpG 2,093 箇所のうち、発現との相関を認めたものは 63 箇所であった。これら 63 箇所の CpG のうち、DNA メチル化-遺伝子発現の相関が負のもの(メチル化率が増加すると遺伝子発現が減少する)は 38 箇所、正のものは 25 箇所であった。さらに Promoter 領域 24 箇所に絞ると、負の相関をとるものが 13 箇所、正の相関をとるものが 11 箇所であった。左記 63 箇所のうち、最も個数の多かったのが、*CMY45*(12 箇所)であり、その他複数箇所の CpG サイトが検出された遺伝子は *UCN*、*SLC12A7*、*TNFAIP2*、*NGF*、*TAS2R41*、*EXOC3L4*、*LPPR2* であった。

【考察・結論】低出生体重児は早産児、SGA 児に大きく分類されるが、いずれも 2 型糖尿病や冠動脈疾患、神経学的問題などのハイリスク児である。「子宮内および生後早期における低酸素栄養不良など悪環境への適応に伴い、疾病体質が形成される」のが、DOHaD 仮説の概念であるが、エピジェネティックなメカニズムの関与が示唆されている。本研究の目的は、臍帯血および生後末梢血からの単核球分離サンプルを用いて、早産児および SGA 児に起こるエピジェネティック変化を調べ、そのうち生後に持続するものを探索することである。本研究は早産児および SGA 児の分野において、日本における血液検体でのエピゲノムワイド関連解析(EWAS)を行った最初の研究であり、DNA・RNA 同時抽出により遺伝子発現も広範囲に検討した世界で初めての EWAS 研究である。本研究では、EWAS により、多くの在胎週数関連 DNA メチル化変化およびいくつかの出生体重 SD スコア関連メチル化変化を確認し、前者に関しては遺伝子発現との関連も一定数確認した。在胎週数関連メチル化変化の中には生後にも持続する候補を見いだすことができ、早産児に在胎週数関連のエピジェネティックメモリーが起こることが示唆された。これらのエピジェネティックメモリーには抑制性ポリコーム結合などクロマチン状態の傾向が存在することも分かり、遺伝子発現との関連が確認できない場合や、DNA メチル化率増加に伴い遺伝子発現が増加するなど定説にそぐわない場合も見られることが分かった。エピジェネティックメモリーの形成にはメチル化そのものだけでなく、メチル化以外のエピジェネティックなメカニズムが関与していると考えられた。

今回は周産期に「結果」として生じた DNA メチル化変化の評価に留まったが、今後は周産期に発生した DNA メチル化変化からの将来の疾病予測が重要な課題となる。コホートやバイオバンクとの連携が不可欠であり、新生児フォローアップ体制の確立も急務である。

本研究は今後の日本の新生児 EWAS 研究の基盤になるものとする。