
インスリン様成長因子の遺伝的多様性から
見た胎児発育とその後の成長予後に関する
総合的研究

17591137

平成 17 年度～平成 19 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 長屋 建

旭川医科大学医学部助教

〈はしがき〉

子宮内胎児発育遅延 (IUGR; intrauterine growth retardation) は、出生時の体重が小さいという事だけでなく、その後の成長障害や知能障害、さらには成人となった後に高血圧や糖尿病などの生活習慣病 (common disease) に罹患する率が高いことが知られている。IUGR の原因には、胎盤因子や胎児因子と母体因子の相互関連が想定されている。私たちは胎児および出生後の児の成長に強く関与している IGF-1、IGF-2、及びそれらの受容体遺伝子の SNPs とそれにより構成されるハプロタイプと IUGR の関連を調べ、さらに IUGR 児のその後の成長障害との関連を検討することにより、胎児発育およびその後の成長を規定している遺伝的条件を明らかにする事を目的に研究を行った。

研究組織

研究代表者 長屋 建 (旭川医科大学医学部助教)

研究分担者 蒔田芳男 (旭川医科大学医学部教授)

研究分担者 林 時仲 (旭川医科大学医学部講師)

研究分担者 藤枝憲二 (旭川医科大学医学部教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|----------|-----------|---------|-----------|
| 平成 17 年度 | 1,000,000 | 0 | 1,000,000 |
| 平成 18 年度 | 1,000,000 | 0 | 1,000,000 |
| 平成 19 年度 | 850,000 | 150,000 | 1,000,000 |
| 総計 | 2,850,000 | 150,000 | 3,000,000 |

研究発表

(1) 学会誌発表

(ア) 長屋建、竹田津原野、藤枝憲二、胎児発育と IGF、ホルモンと臨床、55、2007

(イ) 長屋建、藤枝憲二、胎児発育障害と IGFs の役割、日本小児科学会、2008、掲載予定

(2) 口頭発表

(ア) 長屋建、蒔田芳男、藤枝憲二、IGF2 遺伝子多型が胎児・胎盤発育に及

ぼす影響、北海道新生児談話会、2005. 9. 10

- (イ) 長屋建、蒔田芳男、藤枝憲二、*IGF2* 遺伝子多型が胎児・胎盤発育に及ぼす影響、第 50 回未熟児新生児学会、2005. 12. 4
- (ウ) 長屋建、蒔田芳男、竹田津原野、中村英記、林時仲、向井徳男、藤枝憲二、*IGFs* 遺伝子多型が胎児胎盤発育に及ぼす影響、第 10 回小児分子内分泌学会、2006. 7. 8
- (エ) 長屋建、蒔田芳男、竹田津原野、中村英記、林時仲、藤枝憲二、*IGFs* 遺伝子多型が胎児胎盤発育に及ぼす影響、第 40 回小児内分泌学会、2006. 9. 27
- (オ) 川田友美、岡本年男、中村英記、長屋建、林時仲、藤枝憲二、FISH 法にて *IGF-1R* 遺伝子のヘテロ欠失を確認した 15 番染色体長腕遠位部 (q26. 2-qter) 欠失の子宮内発育遅延の 1 女児例、北日本小児科学会、2006. 9. 10
- (カ) K Nagaya, Y Makita, G Taketazu, E Nakamura, T Hayashi, K Fujieda, Fetal growth and IGFs, LOC symposium, The 3rd International Congress Of the GRS and the IGF Society, Nov 11-15. 2006
- (キ) K Nagaya, Y Makita, G Taketazu, E Nakamura, T Hayashi, K Fujieda, Polymorphism in paternal allele of *IGF-2* gene associate with fetal and placental growth in Japanese, The 3rd International Congress Of the GRS and the IGF Society, Nov 11-15. 2006
- (ク) K Nagaya, Y Makita, G Taketazu, E Nakamura, T Hayashi, T Mukai, K Fujieda, The association between *IGFs* gene and fetal and placental growth in Japanese, The 2nd Congress of Asian Society for Pediatric Research, Dec 8-10. 2006

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

I. 研究の目的

子宮内胎児発育遅延 (IUGR; intrauterine growth retardation) は、出生時の体重が小さいという事だけでなく、その後の成長障害や知能障害、さらには成人となった後に高血圧や糖尿病などの生活習慣病に罹患する率が高いことが知られている。また、胎児発育には胎盤因子 (胎盤の異常、母体の基礎疾患など) や胎児因子 (染色体異常、先天性代謝異常など)、母体因子の相互関連が想定されているが、臨床の現場では各個人の原因を特定できない場合が多い。

これらのどの因子にも種々の成長因子が関与している。特に IGFs は母体-胎盤-胎児を一つのユニットとして胎児発育に促進的に働くことが知られている。IGF-1 は胎児発育のみならず生後発育にも重要な役割を担い、IGF-2 は胎盤発育を含め胎児発育に大きく寄与する。例えば *IGF-1* 遺伝子¹ や *IGF-2* 遺伝子² のノックアウトマウスはいずれも出生体重が 60% に抑制される。両者のダブルノックアウト³ では出生体重が 30% にまで抑制される。一方 *IGF1R* 遺伝子のノックアウトマウス⁴ は正常の 45% の胎児発育である。胎盤重量は *IGF-1* 遺伝子ノックアウトマウスでは正常だが、*IGF-2* 遺伝子のノックアウトマウスでは 75% に抑制される。しかしヒトにおいて IGF-1 や IGF-2 の産生異常やそれらの受容体異常の報告は極めて少ない。

IGF-2 遺伝子は父親由来の刷り込み遺伝子で、父親由来の対立遺伝子のみが発現している。*IGF-2* 遺伝子は、より下流に位置し母親由来の刷り込み遺伝子である *H19* 遺伝子と共通のエンハンサー群 (*H19* 遺伝子の下流に位置する) により発現調節を受けている。このエンハンサー群は父由来の染色体上では *IGF-2* 遺伝子に作用し、母由来の染色体上では *H19* 遺伝子に作用する。この作用の違いは両遺伝子間に存在する ICR (imprinting control region) のメチル化状態で決定される。通常、低メチル化状態である母親由来アレルの ICR には CTC factor (CTCF) が結合し、それがインスレーターとして働きエンハンサーが *IGF-2* 遺伝子に作用する事をブロックされ *H19* 遺伝子のみ作用する。一方、高メチル化状態である父由来アレルの ICR には CTCF は結合できず、エンハンサーは *IGF-2* 遺伝子に作用し発現する。最近、父親由来の対立遺伝子上のこの ICR の高メチル化による *IGF-2* の過剰発現が巨大児となりやすい Beckwith-Wiedemann 症候群の一つの原因であり、母親由来の対立遺伝子上の ICR の低メチル化が子宮

内発育不全となる Silver-Russel 症候群の一つの原因であることが証明された。

そこで、私たちは胎児および出生後の児の成長に強く関与している *IGF-1* 遺伝子、*IGF-2* 遺伝子、及びそれらの受容体遺伝子の多型をハプロタイプ解析を用いて胎児胎盤発育との関連を調べ、さらにその後の成長障害との関連を検討することにより、胎児発育およびその後の成長を規定している遺伝的条件を明らかにすることを目的とし科学研究費の補助を得て研究を行った。

II. 方法

(ア) 検体の収集

旭川市内産婦人科病院または旭川医科大学周産母子センター出生の在胎期間 35 週以上の新生児を対象に、臍帯血と母体血から DNA を抽出した。検体、臨床情報は血液採取機関で匿名化し ID 番号で旭川医科大学小児科にて保存した。なお、本研究を始めるにあたり旭川医科大学倫理委員会の承諾をえて、検体採取に対しては担当医により研究内容についてのインフォームドコンセントをとり同意をご両親から書面にて得た上で行った。

(イ) ハプロタイプ解析

データベース (JSNP : A database of Japanese Single Nucleotide Polymorphisms、http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html) から収集した *IGF1*、*IGF2*、*IGF1R*、*IGF2R* 遺伝子に存在する SNPs を用いて、健常成人 48 人の DNA を用いてそれぞれの遺伝子を PCR direct シークエンス法でタイピングを行った。これらを基に SNPalyse Softwear (Dynacom, Yokohama) を用いて連鎖不平衡解析を行い、それぞれ 3 つの tag-SNPs (*IGF1*: rs35767, rs2288378, rs2072592. *IGF2*: rs1003484, rs3741211, rs3741206. *IGF1R*: rs3743263, rs2272037, rs2293117) を抽出し、それらで構築されるハプロタイプを最尤法 (maximum likelihood method) で推定した。PCR は以下に示す配列のプライマーを使用し TaKaRa PCR Amplification Kit (TAKARA BIO INC. Japan) を用いてマニュアルに従い行った。 *IGF1*(rs35767): L-CCCTGAAGGACTTGACCAT, R-CCCAGGAGTGGTGGAAATAA

IGF1(rs2288378): L-CACTTGGCAACTGGGACAAG, R-TTTGGGCATGGTGACAAATA

IGF1(rs2072592): L-CAGCGTTGCCAACAAGATTA, R-CATACCCTGTGGGCTTGTCT

IGF2(rs1003484): L-GAGGCACATGGATTGGAGTC, R-GGCCTTTCTCATTCCCATTT

IGF2(rs3741211): L-CCTCACTGGCCTCGTCAAG, R-CACAAGCTCGGTGGTGACTC

IGF2(rs3741206) :L-GAACACACAGCTGTCTTCACAAG, R-GACACACAGCTCTGCTTGACG

IGF1R(rs3743263) :L-TTGTGAAGCAACAGCCTCTG, R-TTGCAATTTTGTGGGATAA

IGF1R(rs2272037) :L-GAAGCATTGGTGCGAATGTA, R-GCCCAGAGTCCAGTCACTTC

IGF1R(rs2293117) :L-GCCACCTGACCCTCTGAGTC, R-GAGTCAAGCGCATCGAGAAG

アニーリング温度はすべて 57°Cで行った。

*IGF2R*遺伝子は連鎖不平衡が保たれておらず tag-SNP を同定することができなかった。また、*IGF2* 遺伝子は父親来の刷り込み遺伝子であるため、上記で得られた母子それぞれのハプロタイプから父親由来のハプロタイプを推定した。以上から得られたハプロタイプを用いて胎児胎盤発育との関係をハプロタイプ解析を行った。

(ウ) IGFs 濃度の測定

上記DNA抽出時に同時に得られた血漿を用いて、臍帯血中の IGF1、IGF2、IGFBP-3 濃度を測定し、胎児胎盤発育との関係と上記で得られたハプロタイプ別での違いを検討した。IGF-1 は RIA 固相法、IGF-2 は ELISA 法、IGFBP-3 は RIA2 法で測定した。

(エ) *IGF-2* 遺伝子のメチル化解析

日立ハイテクマニファクチャ&サービスの協力をえて *IGF2/H19* におけるメチル化領域のうち、過去に報告の見られる CTCF-6 と H19-DMR に注目し、MassARRAY を用いてメチル化解析を行った。サンプルをバイサルファイト処理した後、リバーズ側には T7 プロモーター配列を付加した上記領域特異的プライマー (CTCF-6:L-GGTGTTTTAGTTTTATGGATGATGG, R- AATAACACAAAAACCCCTTCCTAC) を用いて PCR 増幅を行った。その後 T7 プロモーターから *in vitro* 転写と T 特異的切断を行い、断片を質量解析し EpiTYPER (SEQUENOM, INC. カリフォルニア州) にてデータ処理を行った。

(オ) 成長記録のフォローアップ方法

平成 17 年度の症例 180 名を対象に 1 歳 6 ヶ月時の発育をアンケート方式で調査し計 48 名から回答を得た (回収率 26.7%)。計測値はそれぞれの地域で行われる 1 歳 6 ヶ月健診時の値とした。

III. 結果

(ア) 平成 17 年度

初年度は、奇形や合併症なく生後順調に経過した健常新生児 180 人とその母

親を対象に構築したハプロタイプ別に胎児胎盤発育を比較検討した。なお対象となった新生児の出生体重とその SDS は正規分布し、体格に偏りのない集団であり、それぞれの頻度は Hardy-Weinberg の法則に従っていた。統計学的検定は、二群間の比較には student t 検定を用い、三群間の比較には ANOVA を用いて検討した。

1. IGF-1 遺伝子

児の IGF-1 遺伝子は 3 つの tagSNP がそれぞれ CGG、TGA、CAG、TGG の 4 つのハプロタイプでほとんどの児が分けることができた。出生時の体格別にハプロタイプ頻度を見ると、ハプロタイプ TGG が少数ながら有意に HFD (heavy for date) 児に多かった (表 1)。そこでハプロタイプ TGG とそれ以外で胎児胎盤発育を比較したところ、有意にハプロタイプ TGG の児が出生体重とその SD が高かった (表 2)。すなわちハプロタイプ TGG は胎児発育促進に影響していることが示唆された。

(表 1) IGF-1 遺伝子の出生時体格別ハプロタイプ頻度 (%)

| | Overall (n=180) | HFD 児 (n=11) | AFD 児 (n=152) | SFD 児 (n=17) | <i>p</i> |
|--------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------|
| CGG | 41.5 | 36.4 | 41.5 | 46.3 | ns |
| TGA | 27.2 | 13.6 | 27.2 | 38.2 | ns |
| CAG | 17.7 | 13.6 | 17.7 | 9.6 | ns |
| TGG | 8.5 | 36.4 | 6.8 | 3.6 | 0.005 |
| others | 5.1 | 0 | 6.0 | 0 | ns |

HFD: heavy for date AFD: appropriate for date SFD: small for date

(表 2) IGF-1 遺伝子ハプロタイプ別胎児胎盤発育の比較 (平均値±標準偏差)

| | non-TGG (148) | TGG (32) | <i>p</i> |
|------------|----------------|----------------|----------|
| 在胎期間 (wks) | 39.1 ± 1.2 | 39.1 ± 1.5 | ns |
| 出生体重 (g) | 3027.1 ± 367.6 | 3239.4 ± 541.8 | <0.01 |
| 体重の SDS | -0.2 ± 0.8 | 0.43 ± 1.0 | <0.001 |
| 出生身長 (cm) | 48.4 ± 1.8 | 49.0 ± 4.6 | 0.1 |
| 出生頭囲 (cm) | 33.7 ± 1.1 | 34.1 ± 1.5 | 0.1 |
| 胎盤重量 (g) | 579.3 ± 106.5 | 616.1 ± 113.0 | ns |

| | | | |
|----------------|-------------|-------------|----|
| 胎盤/体重比 | 0.19 ± 0.03 | 0.19 ± 0.03 | ns |
| Ponderal Index | 33.5 ± 0.8 | 33.3 ± 0.8 | ns |

2. IGF1R 遺伝子

180 人のうちタイピングができた児は 165 名であった。児の IGF1R 遺伝子は 3 つの tagSNP がそれぞれ TGG、TAG、TGA、TAA、CGG、CGA の 6 つのハプロタイプにほとんどの児が分けることができた。出生時の体格別にハプロタイプ頻度を見ると、ハプロタイプ TAA が少数ながら有意に HFD (heavy for date) 児に多かった (表 3)。そこでハプロタイプ TAA とそれ以外で胎児胎盤発育を比較したところ、有意にハプロタイプ TAA の児が出生身長が高かった (表 4)。しかしその平均値の差は 0.7cm であり臨床的には有意なものではなく、胎児発育には大きく寄与はしていないと考えられた。

(表 3) IGF1R 遺伝子の出生時体格別ハプロタイプ頻度 (%)

| | Overall (n=165) | HFD (n=11) | AFD (n=137) | SFD (n=17) | <i>p</i> |
|--------|--------------------|---------------|----------------|---------------|----------|
| TGG | 24.6 | 28.0 | 24.6 | 17.2 | ns |
| TAG | 16.6 | 10.5 | 16.8 | 24.0 | ns |
| TGA | 16.1 | 12.9 | 16.3 | 23.5 | ns |
| TAA | 15.4 | 25.8 | 15.6 | 0 | < 0.05 |
| CGG | 14.9 | 16.0 | 14.6 | 18.1 | ns |
| CGA | 7.0 | 6.7 | 6.1 | 11.8 | ns |
| others | 5.4 | 0.1 | 6.0 | 5.4 | ns |

HFD: heavy for date AFD: appropriate for date SFD: small for date

(表 4) IGF1R 遺伝子ハプロタイプ別胎児胎盤発育の比較 (平均値 ± 標準偏差)

| | non-TAA (100) | TAA (65) | <i>p</i> |
|------------|----------------|----------------|----------|
| 在胎期間 (wks) | 39.0 ± 1.2 | 39.2 ± 1.2 | ns |
| 出生体重 (g) | 3040.6 ± 437.1 | 3118.3 ± 386.2 | ns |
| 体重の SDS | 0.1 ± 0.9 | 0.1 ± 0.9 | ns |
| 出生身長 (cm) | 48.2 ± 1.9 | 48.9 ± 1.9 | 0.03 |
| 出生頭囲 (cm) | 33.7 ± 1.2 | 33.9 ± 1.2 | ns |

| | | | |
|----------------|---------------|---------------|----|
| 胎盤重量 (g) | 583.6 ± 118.5 | 594.9 ± 112.6 | ns |
| 胎盤/体重比 | 0.19 ± 0.03 | 0.19 ± 0.03 | ns |
| Ponderal Index | 33.4 ± 0.9 | 33.5 ± 0.7 | ns |

3. IGF-2 遺伝子

母親と児の検体がそろってタイピングができたのは 134 組であった。

母親の 2 つのアレルのハプロタイプと児の 2 つのアレルのハプロタイプの組み合わせ (ディプロタイプ) から児の父親由来アレルのハプロタイプを表 5 に示すように推測した。その結果、ほとんどの児が 3 つの tagSNP がそれぞれ TTA、CCA、CTG の 3 つのハプロタイプに分けることができた。

出生時の体格別にハプロタイプ頻度を見ると、ハプロタイプ CTG が有意に SFD (small for date) 児に多かった (表 6)。そこでハプロタイプ CTG とそれ以外で胎児胎盤発育を比較したところ、有意にハプロタイプ CTG の児が出生体重、身長、胎盤重量が小さかった。しかし有意に在胎期間も短く、それが発育の差に影響している可能性は否定できないが、SDS や ponderal index も有意に小さく、このハプロタイプは胎児発育に大きく関係していると考えられた (表 7)。

(表 5) IGF-2 遺伝子における父親由来の児のハプロタイプの推測

| 児のディプロタイプ | 母のディプロタイプ | 父親由来の児のハプロタイプ |
|-----------|-----------|---------------|
| AA | AA | A |
| AA | AB | A |
| AB | AA | B |
| AB | AB | unknown |
| AB | BB | A |
| BB | AB | B |
| BB | BB | B |

A, B はそれぞれのハプロタイプで、太文字が父親由来のハプロタイプ

(表 6) IGF-2 遺伝子の出生時体格別ハプロタイプ頻度 (%)

| | overall | HFD | AFD | SFD | p |
|--|---------|-----|-----|-----|---|
|--|---------|-----|-----|-----|---|

| | (n=134) | (n=8) | (n=97) | (n=29) | |
|---------|---------|-------|--------|--------|--------|
| TTA | 35.8 | 50.0 | 36.2 | 34.5 | ns |
| CCA | 21.6 | 12.5 | 23.8 | 13.8 | ns |
| CTG | 19.4 | 25.0 | 14.3 | 37.9 | < 0.05 |
| CTA | 2.2 | 0 | 1.9 | 3.5 | - |
| TCA | 1.5 | 0 | 1.9 | 0 | - |
| others | 2.1 | 0 | 3.0 | 0 | - |
| unknown | 17.2 | 12.5 | 19.0 | 10.3 | ns |

HFD: heavy for date AFD: appropriate for date SFD: small for date

(表 7) *IGF-2* 遺伝子ハプロタイプ別胎児胎盤発育の比較 (平均値±標準偏差)

| | non-CTG (98) | CTG (26) | <i>p</i> |
|----------------|----------------|----------------|-----------|
| 在胎期間 (wks) | 39.5 ± 1.2 | 38.6 ± 1.5 | < 0.005 |
| 出生体重 (g) | 3000.0 ± 441.3 | 2596.6 ± 541.8 | < 0.001 |
| 体重の SDS | 0.2 ± 1.0 | 0.8 ± 1.0 | < 0.05 |
| 出生身長 (cm) | 48.3 ± 2.2 | 45.7 ± 4.6 | < 0.00001 |
| 出生頭囲 (cm) | 33.5 ± 1.2 | 33.0 ± 1.5 | ns |
| 胎盤重量 (g) | 568.4 ± 110.7 | 483.5 ± 113.0 | < 0.001 |
| 胎盤/体重比 | 0.19 ± 0.03 | 0.19 ± 0.03 | ns |
| Ponderal Index | 33.6 ± 0.9 | 32.1 ± 6.8 | < 0.05 |

以上の結果から以下のことが考えられた。

- a. *IGF-1* 遺伝子の tag-SNPs で構成されるハプロタイプ TGG は胎児発育促進に影響している可能性がある。
- b. *IGF-2* 遺伝子の tag-SNPs で構成される父親由来ハプロタイプ CTG の児は non-CTG ハプロタイプの児より有意に在胎期間が短かったが、胎児・胎盤発育に影響し、asymmetrical な IUGR を起こしている可能性がある。

(イ)平成 18 年度

平成 17 年度の結果をふまえ、特に有意差が強く認められた *IGF-2* 遺伝子において検体数を増やすとともに、新たに得られた検体で *IGF1*、*IGF-2*、*IGFBP-3* 値を測定しそれぞれのハプロタイプが臍帯血におけるこれらの値にどのように影

響しているかを検討した。

対象となった新生児の出生体重とその SDS は正規分布し、体格に偏りのない集団であり、それぞれの頻度は Hardy-Weinberg の法則に従っていた。

新たに 152 検体を追加して計 276 検体で *IGF-2* 遺伝子においてハプロタイプ解析を行った。その結果ハプロタイプ CTG は 55 例と non-CTG は 221 例で、両群間で有意差を認めていた在胎期間には有意差を認めなくなり出生体重、出生身長と胎盤重量に有意差を認めた (表 8)。

さらにこれらのうち 92 検体で測定できた IGF1、IGF-2、IGFBP-3 値を表 9 に示す。検体数は少ないものの各ハプロタイプ間で臍帯血中のこれらの値に差を認めず、少なくともハプロタイプ CTG が出生時の IGFs 濃度に影響していないと考えられた。

(表 8) *IGF-2* 遺伝子ハプロタイプ別胎児胎盤発育の比較 (平均値±標準偏差)

| | non-CTG (221) | CTG (55) | <i>p</i> |
|----------------|----------------|----------------|----------|
| 在胎期間 (wks) | 39.4 ± 2.9 | 39.0 ± 1.3 | ns |
| 出生体重 (g) | 3009.5 ± 414.4 | 2850.1 ± 509.3 | 0.02 |
| 体重の SDS | -0.2 ± 1.0 | -0.4 ± 1.0 | ns |
| 出生身長 (cm) | 48.3 ± 2.0 | 47.6 ± 3.0 | 0.04 |
| 出生頭囲 (cm) | 33.6 ± 1.3 | 33.5 ± 1.4 | ns |
| 胎盤重量 (g) | 582.7 ± 109.0 | 542.7 ± 126.1 | 0.02 |
| 胎盤/体重比 | 0.2 ± 0.03 | 0.2 ± 0.02 | ns |
| Ponderal Index | 33.4 ± 2.4 | 33.7 ± 0.8 | ns |

(表 9) ハプロタイプ別の臍帯血中の IGFs 値 (平均値±標準偏差) (ng/ml)

| | non-CTG (72) | CTG (20) | <i>p</i> |
|--------|---------------|---------------|----------|
| IGF-1 | 67.6 ± 29.9 | 68.9 ± 24.3 | ns |
| IGF-2 | 646.5 ± 144.2 | 661.6 ± 102.3 | ns |
| IGFBP3 | 0.9 ± 0.2 | 0.9 ± 0.2 | ns |

以上の結果から以下のことが考えられた。

- a. *IGF-2* 遺伝子の tag-SNPs で構成される父親由来アレルのハプロタイプ CTG の児は胎児・胎盤発育に影響し、asymmetrical な IUGR を起こして

いる可能性がある。

- b. しかし、臍帯血中 IGFs 値には大きく影響はしておらず、他の機序を介して胎児胎盤発育に影響する事が推測された。

(ウ)平成 19 年度

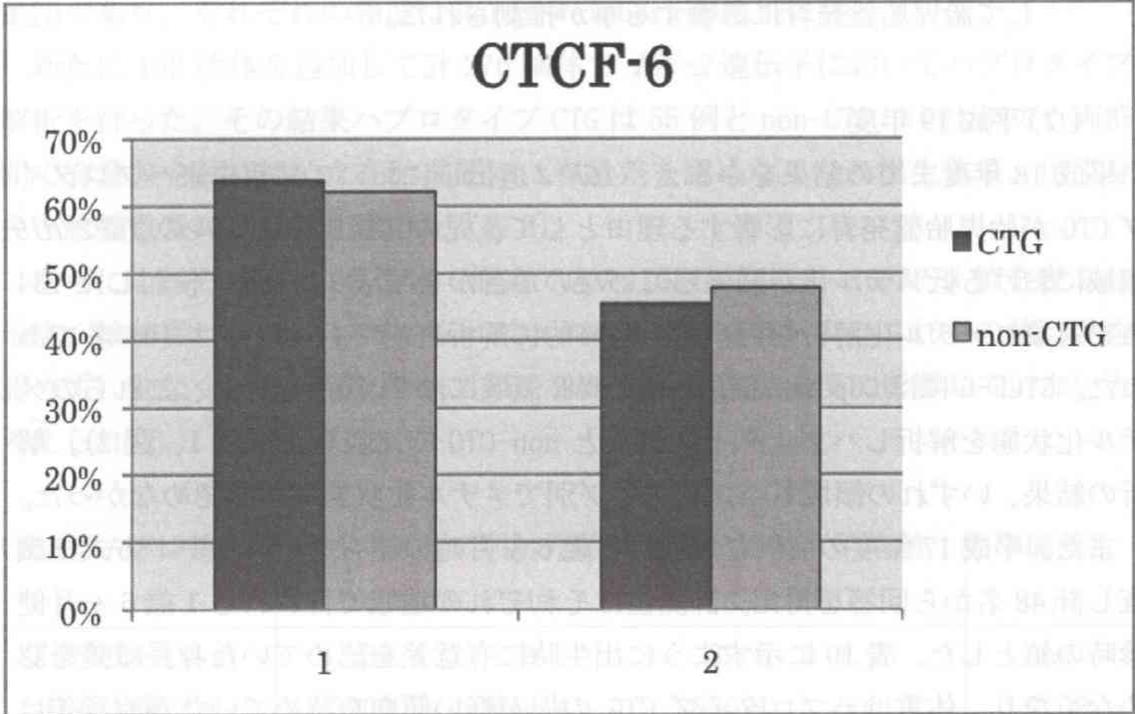
平成 18 年度までの結果をふまえ、*IGF-2* 遺伝子において父親由来ハプロタイプ CTG が胎児胎盤発育に影響する理由として、児の父親由来アレルの *IGF2/H19* 領域における低メチル化が関係していないか否かを平成 17 年度に検討した 134 名を対象にメチル化解析を行った。最終的に解析可能であったのは 108 名であった。CTCF-6 には CGp が 2 箇所、H19-DMR 領域には 21 箇所存在し、これらのメチル化状態を解析しハプロタイプ CTG と non-CTG で比較した (図 1、図 2)。解析の結果、いずれの領域もハプロタイプ別でメチル化状態に差を認めなかった。

また、平成 17 年度の症例を対象に 1 歳 6 ヶ月時の発育をアンケート方式で調査し計 48 名から回答を得た。計測値はそれぞれの地域で行われる 1 歳 6 ヶ月健診時の値とした。表 10 に示すように出生時に有意差を認めていた身長は差を認めなくなり、体重はハプロタイプ CTG の児が軽い傾向を認めていたが有意差はなく、出生時に体格の小さかったハプロタイプ CTG の児は 1 歳 6 ヶ月の時点でほぼキャッチアップしていることがわかった。これは、父親由来ハプロタイプ CTG は胎児発育には影響するが生後の発育には影響しないことを示唆した。

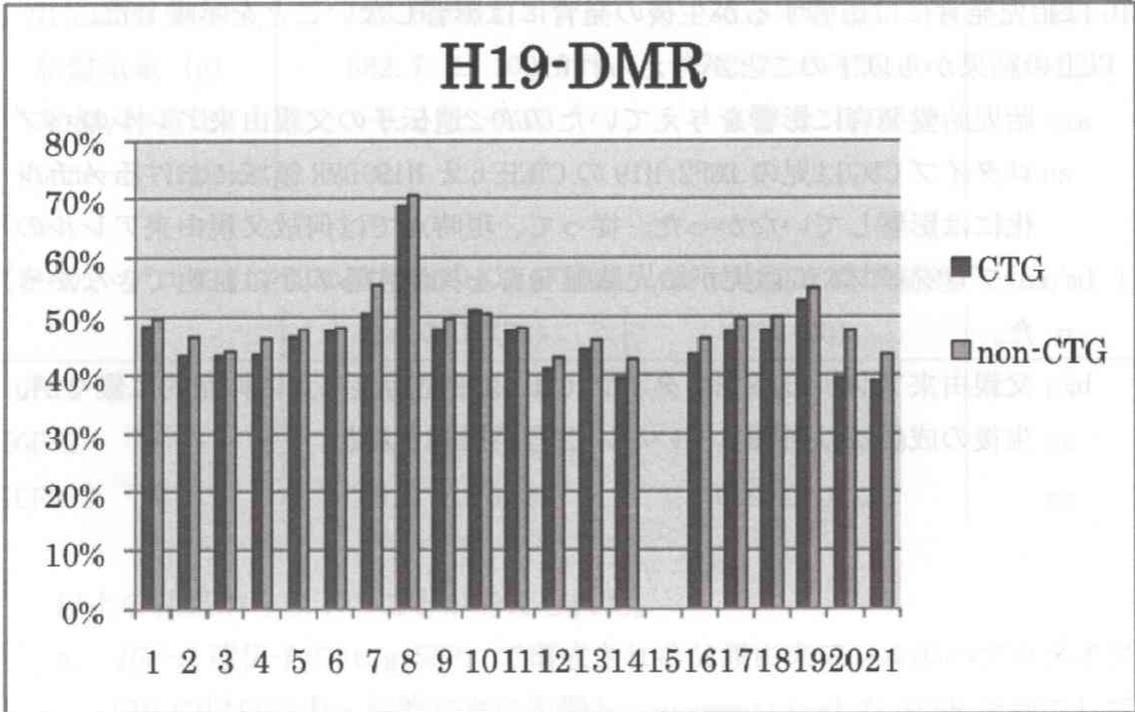
以上の結果から以下のことが考えられた。

- a. 胎児胎盤発育に影響を与えていた *IGF-2* 遺伝子の父親由来アレルのハプロタイプ CTG は児の *IGF2/H19* の CTCF-6 と H19-DMR 領域におけるメチル化には影響していなかった。従って、現時点では何故父親由来アレルのハプロタイプ CTG は児が胎児胎盤発育を抑制するのかは証明できなかった。
- b. 父親由来アレルのハプロタイプ CTG は胎児胎盤発育に抑制的に働くが、生後の成長には影響していないことが推測された。

(図1) CTCF-6 におけるメチル化状態



(図2) H19-DMR におけるメチル化状態



(表 10) *IGF-2* 遺伝子ハプロタイプ別の 1 歳 6 ヶ月時の発育

| | Non-CTG (n=38) | CTG (n=10) | <i>p</i> |
|---------|-------------------|---------------|----------|
| 身長 (cm) | 79.8 ± 2.5 | 78.2 ± 3.1 | ns |
| 体重 (kg) | 10.3 ± 1.1 | 9.9 ± 1.1 | ns |

IV. 結論

3 年間の研究の結果、以下のことが考えられた。

- a. *IGF-1* 遺伝子の tag-SNPs で構成されるハプロタイプ TGG は胎児発育促進に影響している可能性がある。
- b. *IGF-2* 遺伝子の tag-SNPs で構成される父親由来アレルのハプロタイプ CTG の児は胎児・胎盤発育に影響し、asymmetrical な IUGR を起こしている可能性がある。
- c. 胎児胎盤発育に影響を与えていた *IGF-2* 遺伝子の父親由来アレルのハプロタイプ CTG は臍帯血中 IGFs 値には大きく影響はしておらず、また児の *IGF2/H19* の CTCF-6 と H19-DMR 領域におけるメチル化にも影響していなかった。従って、現時点では何故父親由来アレルのハプロタイプ CTG は児が胎児胎盤発育を抑制するのかは証明できなかった。
- d. 父親由来アレルのハプロタイプ CTG は胎児胎盤発育に抑制的に働くが、1 歳 6 ヶ月の時点で身長、体重ともキャッチアップを認め、生後の成長には影響していないことが推測された。

今後は、父親由来アレルのハプロタイプ CTG がなぜ胎児胎盤発育に影響するのかを解明すべく *IGF2/H19* の他のメチル化領域の検索など研究を続ける必要があると考えられた。

参考文献

- 1 Barker GJ, Lin JP, Robertson EJ, et al. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993; 75: 73-82.
- 2 DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A: *Nature* 1990; 344: 78-80.
- 3 Efstratiadis A. Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol* 1998; 42:

955-976.

- 4 Liu JP, Baker J, Perkins AS, et al. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993; 75: 59-72.