

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：42723

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13479

研究課題名(和文) DNA多型・メチル化とアタッチメント連続性との関連性

研究課題名(英文) Association between DNA polymorphism/methylation and attachment continuity.

研究代表者

斎藤 晃 (Saito, Akira)

鶴見大学短期大学部・保育科・准教授

研究者番号：10225691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はDNA多型・メチル化が乳児期から青年期までのアタッチメント連続性に与える影響を検討することである。

ストレンジ状況法における乳児のアタッチメント行動を因子分析し、た安全性(secure)と両面価値(ambivalence)の2因子を抽出した。この2因子と青年期IWM、DNA多型との関連性に関して、共分散構造分析による多母集団の同時分析を行った。その結果、乳児期アタッチメント安全性と成人期アタッチメントスタイルの安全性との関連性において5-HTTLPRの多型(ss型とll型)が異なる影響を与えていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to assess the effect of the DNA polymorphism and methylation on the attachment continuity from infancy through adolescence.

The factor analysis extracted two factors, secure and ambivalence, from infant attachment behaviors in the strange situation procedure. Covariance structure analysis yielded that the polymorphism of 5-HTTLPR has different effects on the association between infant secure factor and adult security.

研究分野：発達心理学

キーワード：アタッチメント連続性 DNA多型・メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 学術的背景

#### アタッチメントの連続性

乳児のアタッチメントは乳児がある特定の対象に形成する心の絆と定義される (Bowlby, 1969)。乳児期アタッチメントは Ainsworth ら (1978) が開発したストレンジ状況法 (Strange Situation Procedure, SSP) によって測定され、安全群 (B)、両面価値群 (C)、回避群 (A)、非構成的 / 非志向的群 (D) に分類される。SSP 開発当初から乳児のアタッチメントは母親の一貫した感性に影響を受けるとされ、当初は 12~18 ヶ月間のアタッチメント連続性が議論された。その後 Main ら (1985) によって成人アタッチメント面接 (Adult Attachment Interview, AAI) が開発された。AAI はアタッチメント体験に基づく自己概念や対人関係に関する包括的概念である内的表象 (Internal Working Model, IWM) を明確化する手法で SSP 分類に対応しており、B 群に対応する安全・自律型、A 群に対応する喪失型、C 群に対応する囚われ型、そして D 群に対応する未解決型に分類される。AAI の手法が確立されて以来、母親の肯定的 IWM が児の安全性 (security) の形成に影響するという世代間伝達とアタッチメント連続性の観点から「乳児期アタッチメントと成人期 IWM との関連性」の議論が始まった。例えば、乳児期 SSP と成人期 AAI による連続性は「安全性 - 不安定性」の軸に限定した場合、ストレスある出来事を経験しなかった群では 78%、経験した群では 61% の連続性であった (Waters ら, 2000)。

一方、乳児期アタッチメント研究に触発され、成人期アタッチメントを質問紙で測定する試みが行われてきた。その最初期の試みでは成人期アタッチメントを SSP 分類に相当する 3 群に分類した (Hazan ら, 1987)。その後、複数の研究者によって提案がなされ、例えばアタッチメントを 4 分類する Relationship Questionnaire (RQ, Bartholomew ら, 1991) が提案され、この日本語版である「愛着スタイル尺度日本語版」(加藤和生, 1998) が開発された。RQ はアタッチメントを 4 つの型に分類し、最初期の 3 分類である安全型、両面価値型、回避型はそれぞれ RQ 4 分類の安全型、とらわれ型、恐れ型に相当する。

#### DNA 多型

DNA 多型とは DNA 配列の特定部分の個体差で、母集団の 1% 以上の頻度で出現し、疾病発生に関係しない場合をいう。多型には一塩基の違い (SNP) から複数塩基の反復 (VNTR) まで数種類ある。ドーパミン受容体遺伝子 (DRD4) の特定部分の反復回数 7 回と D 群との間に関連ありと報告されたが (Lakatos ら, 2000)、確認できなかった (Bakermans-Kranenburg ら, 2004)。セロトニン輸送体関連遺伝子 (5-HTTLPR) の特定部分の反復 16

回 (1 型) よりも反復 14 回 (S 型) の方が D 群と関連すると報告されたが (Spangler, 2009)、人種により結果が異なると指摘された (Cicchetti ら, 2011)。オキシトシン受容体 (OXTR) の SNP (GG 型) が否定的環境の影響を受けやすいと報告されたが (Bradley ら, 2011)、人種により異なると指摘された (Chen ら, 2011)。このように、アタッチメント形成を DNA 多型のみで説明することは困難である。また、OXTR の SNP の内、rs53576 の G キャリアー (AG, GG) はノンキャリアー (AA) と比較して情動認知が低く、rs2254298 の A キャリアー (AG, AA) はノンキャリアー (GG) と比較して社会性が低いと報告された (Parker ら, 2014)。

#### DNA メチル化

メチル化は塩基配列のシトシン 5 位炭素にメチル基が付加することで、遺伝子機能の発現・抑制を制御する。従って、メチル化は、DNA 多型がアタッチメント形成に与える影響をコントロールする機能を有する可能性がある。メチル化と成人期 AAI との関連性を検討した研究は 1 例 (van IJzendoorn ら, 2010) のみである。

## 2. 研究の目的

### (1) 目的

本研究は、DNA 多型・メチル化という遺伝子情報、及び母親の感性・IWM が「乳児期アタッチメントと成人期アタッチメント (IWM) との連続性」に与える影響を解明することを目的とする。

乳児期に形成されたアタッチメントは加齢に伴って IWM として統合され、自己概念や対人関係の基礎になる。近年の分子生物学の急速な進歩により、DNA 多型・メチル化の解析が可能となり、遺伝子情報を得ることが可能となった。本研究結果は、アタッチメントの視点から遺伝子・環境両者の具体的データを使用して、従来から議論されてきた「遺伝と環境」問題の解明に寄与する。

### (2) DNA 多型・メチル化要因の導入

アタッチメント連続性は、環境要因に起因するストレスを受けない場合は 78% (Waters ら, 2000) であり、ハイリスクサンプル (母親の経済、年齢、婚姻、学歴等の要因から判断) の場合は 51% (Weinfield ら, 2000) である。後者のハイリスクサンプルであっても 51% に連続性が見られたことは、単に環境要因だけでは連続性の説明が困難であることを示唆する。

しかし先に述べたように、アタッチメント形成要因に関して DNA 多型を導入した先行研究間の結果には矛盾があり、多型のみでは不十分である。そこで、遺伝子機能の発現・抑制を制御する DNA メチル化要因を導入することによって先行研究間の矛盾を解明することが可能となる。例えば、アタッチメント関

連でメチル化解析が唯一行われた研究によれば、成人の未解決・トラウマ度合は5-HTTLPR・s型・低メチル化で高く、s型・高メチル化で低い(van IJzendoornら,2010)。従って、アタッチメント連続性を検討する際に例えば「5-HTTLPRのs型は被傷性が高い」という従来の多型のみを要因では不十分であり、メチル化要因を考慮する必要がある。しかし、新生児期～成人期間におけるアタッチメント連続性をDNA多型・メチル化の視点から分析した研究は皆無であり、ここに本研究の意義が存在する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究協力者

本研究は、研究代表者が縦断的に行ってきた第1コホート研究(平成6~8年出生)の協力者(満期産)とその生物学的母親を対象とした。

#### (2) 成人期 IWM の指標

当初、協力者のIWMをAAIにて得る予定であった。しかし、米国にて開発されたAAIを日本文化において成長した協力者に対して忠実に施行すると、心理的侵襲が発生する可能性が存在することが判明した。そこで、IWM測定方法として、自己記入式質問紙である日本語版RQを採用した。

#### (3) 分析方法

成人期IWMを説明するための「独立変数」の内、行動要因として、生後12ヶ月に施行されたSSPにおけるアタッチメント行動を採用した。さらに、遺伝要因としてDNA多型・メチル化を、環境要因として母親の敏感性・育児意識・自己受容意識・IWMを指標とした。そして、「従属変数」として成人期にて測定したRQを使用し、共分散構造分析を行った。

\* 本研究は鶴見大学短期大学部倫理審査委員会の承認を得た後に、研究協力者とその母親に対して研究趣旨を説明し、文書による同意書を得てから開始した。また、解析機関と機密保持契約を行った上、DNA解析を依頼した。

### 4. 研究成果

新生児期から20年間に渡って縦断的に協力いただいていた協力者約40名中20名(平均年齢21.0歳)とその母親20名(平均年齢51.4歳)から本研究に対する協力が得られた。

#### (1) アタッチメント評定

研究協力者名が1歳の時点でSSPを施行し、Carlson博士(ミネソタ大学)が児の行動を7段階評定尺度にて評定した。その結果、安全群(B)80%、両面価値群(C)15%、回避群(A)5%であった。同じくCarlson博士が非構成的/非志向的傾向を9段階評定尺度にて評定した結果、D/D群(評定値5以上)、非D/D群(評定値4以下)はそれぞれ10%、

80%であった。

#### (2) DNA 解析

非侵襲的採取方法であるORAGENE(DNA Genotek)にて唾液を採取・保存後、DNAチップ研究所(東京)にDNA抽出、及びDNA多型・メチル化解析を委託した。

##### DNA 多型

サンガーシーケンス法にて多型を同定した。協力者の5-HTTLPR多型はss型75%、sl型25%であり、母親の多型はss型90%、sl型10%であった。また協力者のOXTRのSNPは、rs53576のGキャリアー(AG,GG)が85%、ノンキャリアー(AA)が15%、rs2254298のAキャリアー(AG,AA)が45%、ノンキャリアー(GG)が55%であった。母親のOXTRのSNPは、rs53576のGキャリアー(AG,GG)が75%、ノンキャリアー(AA)が25%、rs2254298のAキャリアー(AG,AA)が55%、ノンキャリアーが45%であった。

##### DNA メチル化

次世代シーケンス法(NGS)を使用してセレクトニン遺伝子(SLC6A4)とOXTRのメチル化を同定した。10個以上マッピングできたCpGを対象にしてメチル化率を算出した。SLC6A4の平均メチル化率は協力者3.77%(sd1.26)、母親5.19(SD1.09)であり、両者間に有意差があった(p=.001)。オキシトシンのメチル化率は協力者11.6%(SD2.08)、母親13.33(sd3.13)で、両者間に有意差ありの傾向が示された(p=.051)。一般に、メチル化は加齢に伴って上昇するとされており、本結果はこれに一致した。

#### (3) アタッチメント連続性の解析結果

サンプル数が少ないので、アタッチメントパターンを安全群とそれ以外の不安全群に2分割し、1歳時点のSSPにおけるアタッチメントパターンと成人期RQによるアタッチメントパターンの一致率(連続性)を算出した。その結果、安全群35%(7/20)、不安全群65%(13/20)であった(表1)。一般に乳児期～児童期・成人期アタッチメントの連続性は不安全群よりも安全群の方が高いとされるが、本結果は逆となった。

表1 アタッチメント連続性

	成人期・愛着スタイル尺度(RQ)				計
	安全	とらわれ	恐れ	拒絶	
乳児期	7	2	6	1	16
安全	0	2	0	1	3
両面価値	1	0	0	0	1
回避	8	4	6	2	20

次に、DNA多型が連続性に与える影響を検討した。SSPの第5、8エピソードにおける接近・接触行動(PS5,PS8)、接触維持行動(CM5,CM8)、抵抗行動(R5,R8)、回避行動

(A5, A8), を対象として因子分析(最尤法, プロマックス回転)を行い, 2 因子を抽出した。第 1 因子は PS5, PS8, A5, A8, 第 2 因子は R5, R8, CM5, CM8 で構成された。前者の構成概念を安全, 後者を両面価値と命名した。この 2 つの構成概念と成人期 IWM との関連性に対して DNA 多型が与える影響を検討するために, 共分散構造分析による多母集団の同時分析を行った。その結果, DNA 平均メチル化率, 母親の感性・育児意識・自己受容意識・IWM は協力者の成人期安全・不安全に対して有意なパスを示さなかった。

一方, 乳児期安全と成人期アタッチメントの安全との関連性において 5-HTTLPR の多型(ss 型と ll 型)が異なる影響を与えていることが判明した。すなわち, 5-HTTLPR の s1 群において有意な正のパスが示されたが, ss 群において有意ではないが負のパスが示された(図 1)。多くの先行研究において, s 型キャリアーと比較して l 型キャリアーの方が環境要因の影響を受けづらいとされている。本協力者には成長期において過大なストレスを経験した者は存在しないが, 本結果は乳児期に安全群であった l キャリアーの協力者は成人期においても安全群であることを示した。

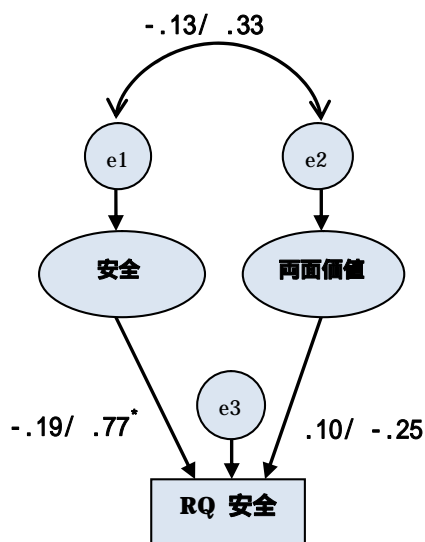


図 1 5-HTTLPR 多型が乳児期安全性 - 成人期安全性 (RQ) の関連性に与える影響(注)"/"の左側が 5-HTTLPR の ss 型, 右側が s1 型のパス係数である。\* < .05

(4) 本研究結果の位置づけとインパクト

アタッチメント, 及びアタッチメント以外の領域における欧米の先行研究では, 5-HTTLPR の ss 群と s1 群を合体した ss/s1 群と ll 群との比較を行っている。白人の協力者を対象とした研究では ll 群は 30%前後存在し, ss/s1 群 - ll 群間を比較して多くの領域で有意差が報告されている。本研究の協力者と母親の合計 40 名において ll 群は皆無で

あったが, アタッチメント連続性において ss 群 - s1 群間において有意差が示された。本結果は ll 群が少ないアジア系黄色人種を対象とするアタッチメント, 及び他領域の研究に DNA 要因を導入することの意義を示した。

(5) 今後の展望

サンプル数の問題

サンプル数が少なく, 検定力が低いので詳細な分析が出来なかった。今後, 第 2 ~ 4 コホートの協力者データを追加して再分析する予定である。

DNA 多型・メチル化の位置づけ

DNA 多型と成人期 IWM との関連性は部分的に示されたが, 全測定 CpG の平均メチル化率と安全・不安全との関連性は見い出されなかった。ある特定の CpG とある特定の社会的行動との間に関連性あり, という先行研究があり, 今後, 各 CpG 別と IWM との関連性を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 晃 (SAITO, Akira)

鶴見大学短期大学部・保育科・准教授

研究者番号: 10225691