

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：42723

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26590152

研究課題名(和文) 早産児のDNA多型・メチル化とアタッチメント形成・予後との関連性

研究課題名(英文) The association among pre-term infants' DNA polymorphism/methylation, attachment formation and later outcomes

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DRD4・5-HTTLPRの多型・メチル化率は在胎日数と関連しなかった。新生児行動評価、母親感受性、DRD4・5-HTTLPR多型、DRD4・SLC6A4メチル化率を独立変数、D/D値を従属変数として重回帰分析を行った結果、有意な関連性はなかった。CpGサイト別にマンホイットニーU検定を行った結果、低D/D群と比較して、高D/D群はSLC6A4のある特定の複数CpGサイトにおいて有意に高いメチル化率を示した。

研究成果の概要(英文)：Neither DRD4/5-HTTLPR polymorphism nor DRD4/SLC6A4 methylation ratio were not associated with gestational age. Multiple regression analysis yielded no association between dependent variables (i.e. NBAS, maternal sensitivity, DRD4/5-HTTLPR polymorphism, DRD4/SLC6A4 methylation ratio) and an independent variable (i.e. disorganized/disoriented score). Mann-Whitney U test revealed the highest disorganized/disoriented score group against the lowest one showed significantly higher methylation ratio at certain SLC6A4 CpG sites.

研究分野：発達心理学

キーワード：アタッチメント DNA多型・メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) はじめに 産科・新生児医療の急速な進歩により、早産児の生存率が高まり、その必要性から認知・情動発達、注意持続性等の研究が急増した。従来、発達研究の測度として児要因として行動特徴が、環境要因として母親の養育行動等が使用されてきたが、必ずしも一貫した結果が得られた訳ではない。最近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、遺伝情報を測度とする研究が始まった。遺伝情報を使用できれば、従来からある「遺伝対環境」の議論を進展させることが可能である。

(2) 学術的背景 DNA 多型・メチル化とアタッチメント、その他の行動特徴との関連性

本研究で着目する神経伝達物質であるドーパミンは情動・動機と、セロトニンは体温調節・気分障害と関連する。DNA 多型は 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、かつ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から複数塩基の反復まで数種ある。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、遺伝子機能の発現を制御する。アタッチメントはストレンジ状況法 (SSP) にて B 群 (安全群)、C 群 (両面価値群)、A 群 (回避群) に分類した後、非構成的 / 非志向的群 (Disorganized/Disoriented, D/D) に分類する。乳児期に重篤なストレスを経験すると、D/D 群になるという (Main ら, 1990)。しかし、北米の平均的・非臨床的な群における D 群出現率は 15% だと報告されており (Van IJzendoorn ら, 1999)、全ての D/D 群の形成要因が重篤なストレスであるかは確定できていないのが現状である。

ドーパミン受容体遺伝子 (DRD4) 多型とアタッチメントとの関連性 DRD4 多型の反復回数が 7 回で母親に未解決な喪失感・トラウマがあると D/D 群になり、反復回数が 4 回の場合は母親に問題があっても D/D 群にはなら

ない、と報告された (Lakatos ら, 2000; Bakermans-Kranenburg ら, 2007)。しかしその後、DRD4 多型と D/D とは関連しないと報告され (Bakermans-Kranenburg ら, 2004)、結果は相反している。

セロトニントランスポーター遺伝子 (5-HTTLPR) 多型とアタッチメントとの関連性 5-HTTLPR の反復 16 回が L 型、反復 14 回が S 型で、S 型がストレスを受けやすいと報告された (Caspi ら, 2003)。S 型で母親敏感性が低いと安全性が低く (Barry ら, 2008)、D/D 群になりやすい (Spangler ら, 2009)。S 型は白人のみでは D/D と関連するが (Luijk ら, 2011)、白人と非白人の混合群では D/D と関連せず (Luijk ら, 2011)、条件により関連する (Cicchetti ら, 2011) と報告され、一貫した結果は得られていない。

DRD4・5-HTTLPR 多型とアタッチメントとの関連性 DRD4 多型の反復 7 回で 5-HTTLPR の L 型の児は SSP においてストレンジャーに対する不安傾向が低かった (Lakatos ら, 2003)。

人種の問題 人種を混合した分析の場合、5-HTTLPR の S 型とアタッチメント安全性とは関連ないと報告がある (Luijk ら, 2011)。しかし、DRD4 反復回数が 7 回以上の場合、白人だと D/D 群に分類され、非白人だと関連性がなかったという (Roisman ら, 2013)。HapMap 研究によれば DNA 多型には人種差が明白に存在し、DNA メチル化も人種差が存在する (Fraser ら, 2012)。従って、本研究で行う日本人 (黄色人種) に限定した「DNA 多型・メチル化とアタッチメント形成・予後との関連性の分析」は先行研究の矛盾した結果の原因を解明する一助となる。

## 2. 研究の目的

本研究は早産児の「環境要因である乳児期の母親敏感性」・「遺伝要因である DNA 多型・メチル化」が「新生児期の行動特徴 (NBAS)、乳児期アタッチメント、児童期の心理社会的

適応状態 (CBCL・YSR), 実行機能 (WCST) とその際の脳機能」に影響を与える機軸を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

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。研究協力者とその母親に研究の目的を十分に説明の上、母親から文書によるインフォームド・コンセントを得た。研究協力者の内、15歳以上はインフォームド・コンセント、15歳未満の場合はインフォームド・アセントをそれぞれ文書にて得た。

本研究は、研究代表者が縦断的に行ってきた第2～4コホート研究(平成9～20年)における協力者を対象とする。本研究は、早産児を実験群、満期産児を統制群とする。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感性を、各コホート児の心理学的特徴として新生児期の行動(NBAS)、生後1年間における母親感性、生後12ヶ月におけるアタッチメント行動とD/D傾向、児童期の心理社会的適応状態(CBCL・YSR)と実行機能(WCST)を測度として使用する。

平成27年度に全ての協力児に対するDNA多型・メチル化解析を終了した。WCST・脳波分析、CBCL・YSRは平成26～27年度において第3コホート児が8～10歳、第2コホート児が12～13歳、第3コホート児が15～16歳になった時点でを行った。

### 4. 研究成果

(1) アタッチメント評定 協力者45名が1歳の時点でストレンジ状況法を行った。児の行動を7段階評定尺度にて評定した結果、安全群(B)67.5%、両面価値群(C)18.6%、回避群(A)4.6%、分類不可9.3%であった。次に9段階評定尺度にて非構成的/非志向的傾向を評定した結果、非D/D群(4以下)、D/D群(5以上)はそれぞれ72.1%、27.9%であった。D/Dの最高評定値は6であり、欧米に見られる高いD/D値を示す児は皆無であっ

た。分析はCarlson, Sroufe両博士(ミネソタ大学)によって行われた。

(2) DNA解析 協力者が7～15歳時点で非侵襲的採取方法であるORAGENE(DNA Genotek)にて唾液を採取後、DNAチップ研究所(東京都港区)にDNA抽出を委託した。DNA多型・メチル化解析は北海道システムサイエンス(株)(北海道札幌市)に委託した。両社とはあらかじめ秘密保持契約を締結した。

DNA多型 サンガーシーケンス法にて多型を同定した。DRD4第3エクソン48bp多型の反復7回は1例のみであり、日本人の反復7回が少ないことを例証した(Kiddら, 2014)。5-HTTLPRの多型はS/S型が約60%を占め、Nakamuraら(2000)に一致した。ハーディー・ワインベルグ平衡検定を行ったところ、DRD4は不平衡、5-HTTLPRは平衡であった。

DNAメチル化 次世代シーケンス法(NGS)を使用してDRD4とSLC6A4のメチル化を同定した。マッピングが10個以上あるCpGを対象にしてメチル化率を算出した。

### (3) DNA解析結果と諸変数との関連性

早産児・満期産児群間におけるDNA多型・メチル化の有意差 DRD4の反復7回/非7回、及び5-HTTLPRのSS型/SL型の変数を使用して、早産児・満期産児に関してFisherの正確確率検定(FET)を行った結果、有意差はなかった。早産児・満期産児間のDRD4、及びSLC6A4のメチル化率に関してマンホイットニーU検定(MWUT)を行ったところ、いずれも有意差は見出されなかった。従って、早産児・満期産児群間にDNA多型・メチル化率に有意差はないので、これ以降は両群を同一群として分析した。

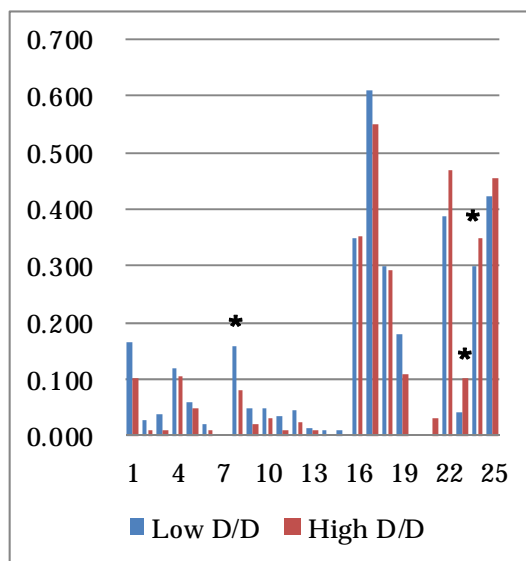
DNA多型・メチル化と諸変数との関連性 DRD4の反復7回/非7回、及び5-HTTLPRのSS型/SL型の変数を使用して、D群・非D群、低D/D群(D/D値1～2)・高D/D群(D/D値5～6)に関してFETを行った結果、いずれも有意差はなかった。また、CBCL・YSRに関し

て 5-HTTLPR の SS 型/SL 型間に有意差は見出されなかった (MWUT)。NBAS, 母親感性, CBCL・YSR と DRD4・SLC6A4 のメチル化率との間に有意差はなかった (MWUT)。

実行機能と諸変数との関連性 実行機能の全ての下位項目において非 D/D 群・D/D 群間には有意差が見られなかった (MWUT)。しかし DMS において、低 D/D 群と比較して高 D/D 群の誤反応数が有意に少なかった (MWUT)。DMS とは準拠している概念を見失う程度である。この結果は低 D/D 群と比較して、高 D/D 群はよりビジランス傾向が高いことを示唆している。実行機能と DNA メチル化率に有意な関連性はなかったが、5-HTTLPR 多型の SS 型と比較して SL 型は有意に PEN の誤反応数が少なかった (MWUT)。PEN とは直前の誤反応の保続傾向である。また、実行機能実施中の脳波に関しては、低 D/D 群と比較して高 D/D 群は前頭前野右側 (fp2) における 波パワー値が有意に高かった (MWUT)。ただし高 D/D 群と低 D/D 群間において、瞑想時と実行機能時の後頭部 (O1, O2) 波パワー値は有意差がなかった (MWUT)。従って、この fp2 の特徴は 抑制ではなく、前頭前野右優位性の視点からの再検討が必要である。

DNA 多型・メチル化とアタッチメント D/D 値との関連性 NBAS, 母親感性, DRD4 多型・5-HTTLPR 多型, DRD4・SLC6A4 メチル化率を独立変数, D/D 値を従属変数として重回帰分析を行った結果、有意な関連性はなかった。

DRD4 と SLC6A4 の各 CpG サイト別に非 D/D 群・D/D 群間のメチル化率に関して有意差は見出されなかったが、低 D/D 群・高 D/D 群間に関しては有意差のある CpG サイトが複数見出された (MWUT)。全 CpG サイトを俯瞰すると、DRD4 には一貫した傾向はなかった。が、低 D/D 群と比較して高 D/D 群は、SLC6A4 の転写開始点 (TSS) の下流に行く程 CpG サイトのメチル化率が高まる傾向を示した (図 1)。



TSS

図 1 SLC6A4-CpG 別メチル化率

注) Low D/D: 低 D/D 群(D/D 値 1~2).

High D/D: 高 D/D 値(D/D 値 5~6).

\* < .05

(4) 結論 2000 年以降、欧米の先行研究では DNA 多型とアタッチメント D/D 群との関連性が議論されてきたが、いまだにコンセンサスは得られていない。特に、DRD4 多型の反復 7 回と D/D 群との関係に焦点が当てられてきたが、日本人で反復 7 回はまれであり、本研究では DRD4 多型と D/D 群との間に有意な関連性は見られなかった。従って D/D 群を DRD4 多型のみで論じることには限界のあることを本研究は例証した。

本研究では、DNA 多型と D/D 値との間に有意な関連性はなかったが、DNA メチル化率に関して SLC6A4 のある特定の複数 CpG サイトにおいて低 D/D 群と高 D/D 群との間に有意差が見られた。アタッチメントと DNA メチル化率との関連性を発表した研究はまだ存在せず、本研究は今後のアタッチメント研究におけるメルクマールの結果を提供した。

DNA 解析結果は生物学的指標として理解されるものであり、環境要因の重要性を減じるものではない。DNA メチル化は環境要因の影響を受けることが知られている。本研究の結

果は、D/D 傾向とメチル化の相互作用の影響を受けた可能性を考慮する必要がある。メチル化を指標とする今後の研究は前向き研究が必要である。

## 5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

齋藤晃(企画・話題提供), 岡田宰, 安藤寿康, 戸田まり(2016年4月). DNA多型・メチル化とアタッチメントとの関連性 - DRD4, 5-HTTLPR, SLC6A4 を生物学的指標として -. 日本発達心理学会第27回大会・自主シンポジウム, 北海道大学(北海道札幌市).

## 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