

令和元年6月4日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11117

研究課題名(和文) RNA-Seqによるトランスクリプトーム解析を用いた妊娠高血圧症候群の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of pregnancy induced hypertension using transcriptome analysis by RNA-Seq

研究代表者

西澤 春紀 (NISHIZAWA, HARUKI)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：80367698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群は、周産期領域における重篤な疾患の一つとして知られているが、胎児・胎盤の娩出以外に有効な治療法が確立されていないため、早期の診断法の開発が急務である。今回、妊娠高血圧症候群の胎盤に対して、次世代高速シーケンサーを用いた新たなトランスクリプトーム解析であるRNA sequencingによる解析を行ったところ、これまでの網羅的発現解析では明らかとなっていない新規転写産物やスプライシングバリエーションを同定することが可能であった。本研究結果から得られた新たな知見により、妊娠高血圧症候群や胎盤形成不全の発症機序に関するや診断および治療法の開発に向けた大きな貢献が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群は、周産期領域における重篤な疾患の一つとして知られていますが、発症機序や予防法は確立されていません。今回、遺伝子の塩基配列を高速に読み出せる最新の次世代高速シーケンサーという装置を用いて解析を行ったところ、これまでの研究では明らかとなっていない遺伝子産物や翻訳過程を明らかにすることが可能でした。本研究結果から、妊娠高血圧症候群や胎盤形成不全の発症機序が明らかにされるとともに新たな診断および治療法の開発が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Pregnancy induced hypertensive is known as one of the serious diseases in the perinatal area, but no effective treatment has been established. In this study, when the placenta of pregnancy induced hypertensive was analyzed by RNA sequencing, which is a new transcriptome analysis using a next-generation sequencer, it was possible to identify novel transcripts and splicing variants. New findings obtained from the results of this study are expected to contribute significantly to the development of diagnostic and therapeutic methods for the pathogenesis of pregnancy induced hypertension and placental hypoplasia.

研究分野：産科学

キーワード：pre-eclampsia placenta RNA sequencing

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群の原因に関しては学説の疾患と言われているように、多岐にわたる病因論が展開されているが、いまだ“disease of theories”の域を脱していないと言える。近年は、昇圧物質の増加と血管不応性、血管内皮障害、凝固・線溶異常、免疫異常、胎盤形成障害など様々な病態が次々と報告され、また地理的、人種的な家系調査や遺伝子多型との関連など遺伝学的因子が関与する報告もなされている。そのため、妊娠高血圧症候群の発症機序に関しては遺伝要因と環境要因、さらには胎児・胎盤と母体の生体反応がそれぞれ独自に、また相互作用して発症する多因子疾患であるという考えが主流になっている。妊娠高血圧症候群の発症機序に関する網羅的遺伝子発現研究として、マイクロアレイ技術を応用した研究はこれまで数多く報告されているが、既知の遺伝子情報を用いた解析であるため、プローブが搭載されていない遺伝子の発現レベルや未知の遺伝子を含めたトランスクリプトームの全体像を理解することは不可能であり、未だ妊娠高血圧症候群の発症機序の解明には至らず、また臨床応用への展開も不十分なものとなっている。

一方、近年開発された次世代高速シーケンサーによる新たなトランスクリプトーム解析である RNA sequencing (RNA-Seq) は、転写産物の発現定量化だけでなく、その配列決定から新規転写産物および新規スプライシングジャンクションの探索までを網羅的に行うことを可能とした新たな解析法として、今後の応用や展開も大いに期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、妊娠高血圧症候群の胎盤を用いて RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析を行い、転写産物の発現定量のみならず、これまでの手法では明らかとなっていない新規転写産物や新規スプライシングジャンクションを網羅的に検討することにより、妊娠高血圧症候群の病態を明らかにするとともに新規診断マーカーを開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

妊娠高血圧症候群における RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析を実施することを初期目標とし、以下の項目に関する検討を行う。

(1) 既知遺伝子における転写産物について対照群との定量比較（従来の研究との比較や新規遺伝子リストの作成）するとともに、新規転写産物・スプライシングジャンクションの探索

(2) RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析の結果より得られた転写産物やスプライシングジャンクションについて、対照群および妊娠高血圧症候群の胎盤サンプルを用いて、通常分子生物学的手法により標的蛋白に対する後方視的な比較検討を行うことにより、妊娠高血圧症候群に特有の標的蛋白を選択する。

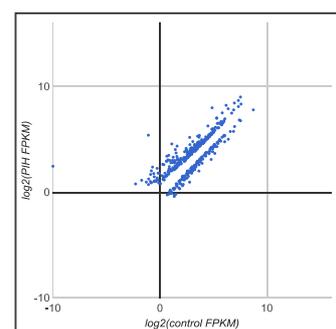
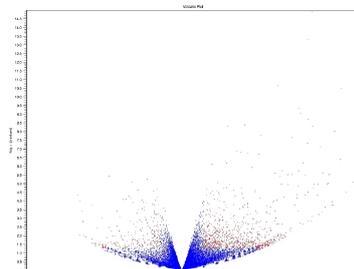
(3) さらに、トランスクリプトーム解析により得られた標的蛋白について、妊娠母体の血中発現レベルを評価することにより、低侵襲な検出が可能か否かについて検討するとともに、新たな生物学的マーカーとしての有用性と診断精度について検討する。

### 4. 研究成果

(1) 重症妊娠高血圧腎症 (PE) 群 : 8 例、対照妊婦として合併症のない正常血圧妊婦 (NL) 群 : 8 例および子宮内胎児発育不全 (FGR) 群 : 8 例の計 24 例の胎盤を帝王切開時にサンプリングした。RNA を抽出し、ライブラリを作製後にシーケンスを行い、得られたリードをゲノムにマッピングし、CLC Genomics Workbench を用いて解析を行った。

はじめに、Quality check 後に解析した 57,773 遺伝子に対して群間比較を行ったところ、NL 群と PE 群において、Fold Change > 2, P-value < 0.05 かつ FDR p-value < 0.25 を満たすのは 168 遺伝子であった。一方、NL 群と FGR 群において、同条件を満たすのは 1,314 遺伝子であった。このうち、PE 群と FGR 群で共通していたのが、37 遺伝子であり、31 遺伝子が増加し、6 遺伝子が低下していた。PE 群でのみ差を認めたのが 131 遺伝子であり、102 遺伝子が増加し、29 遺伝子が低下していた。FGR 群でのみ差を認めたのが 1,277 遺伝子であり、900 遺伝子が増加し、377 遺伝子が低下していた。次に、我々がこれまで行ってきた妊娠高血圧症候群に対するマイクロアレイ研究によるデータ

(Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array (21,014 genes) と比較解析し、PE 群および FGR 群において RNA-Seq による特異的発現差を有する遺伝子を同定した。また、選択的スプライシングバリエーションについて NL 群と PE 群の検索を行ったところ、skipped exon, alternative 5' splice site, alternative 3' splice site, mutually exclusive exons では有意な差を見いだせなかったが、retained intron (イントロン保持) で有意な splicing events が確認された。



(2) NL 群と PE 群で有意差のあった splicing events についてデータベースにない新規のイントロン保持を検出する目的で de novo アセンブルしたトランスクリプトームを用いたパイプラインを用いて、NL 群と PE 群で比較検討したところ、生理的 retained intron は 3699 遺伝子で、そのうち統計学的に有意差のある splicing events が 82 遺伝子 (2.22%) で同定された。また、有意なスプライシング関連遺伝子の変動として、SRRM2, INTS3, MRPS21, RRP9, HSD17B10, RPS21, SNRPA, NOP2, MPHOSPH6, SNRPF, QTRT1, THOC3, CELF6 の発現上昇と UTP18, CNOT6L, ESRP1, SIRT1, PPP4R2, FMR1, PUM2, QKI, SNRPA1 の発現低下が確認された。

**選択的スプライシングの解析**

	Control vs FGR		Differential Splicing events (FGR vs CG)	
	AS events	Total Events	percentage	percentage
Skipped exon	SE	17685	7	0.04
	MXE	1701	4	0.24
	ASSS	2021	1	0.05
	RI	3256	1	0.03
Alternative 5' splice site	SE	3347	3	0.09
	MXE	1707	6	0.35
	ASSS	2078	0	0.00
	RI	3314	2	0.06
Alternative 3' splice site	SE	17789	8	0.04
	MXE	1707	6	0.35
	ASSS	2078	0	0.00
	RI	3314	2	0.06
Mutually exclusive exons	SE	20224	0	0.00
	MXE	2501	0	0.00
	ASSS	1008	0	0.00
	RI	441	2	0.45
Retained Intron	SE	22191	7	0.03
	MXE	2483	1	0.04
	ASSS	2408	7	0.29
	RI	3712	13	0.35
		<b>3698</b>	<b>82</b>	<b>2.22</b>

(3) 発現解析の結果より有意に発現が増加していた ATG16L2, FBXL6, NTF4 について胎盤における定量 PCR および western blot 法により各 mRNA および蛋白レベルを比較検討したところ、いずれも有意な発現の増加が確認された。また、ATG16L2, FBXL6 については、母体血中の蛋白濃度を ELISA にて測定したところ、PE 群で有意な増加が確認され、新規診断マーカーとしての可能性が示唆された。一方、スプライシング関連遺伝子の変動を母体血中で検出可能か否かについても検討を行っているが、標的蛋白の増減についてはこれまで検出できていない。しかしながら、今回の妊娠高血圧症候群の胎盤を用いた RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析により、新たに明らかとなった intron retention に関する既報告はなされていないため、さらなる詳細な検討により、妊娠高血圧症候群や胎盤形成不全の発症機序に関するや診断および治療法の開発に向けた大きな貢献が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。