

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11254

研究課題名(和文)胎盤特異的DNAメチル化からみた母体血による癒着胎盤・胎盤機能異常の評価法の開発

研究課題名(英文)The study for development of prediction method of placental adhesion, using cell-free DNA in maternal blood

研究代表者

小出 馨子(Koide, Keiko)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90384437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：母児ともに経過順調かつ未陣発未破水で帝王切開した5症例を対象に胎盤と産褥5日目の母体血を採取し絨毛DNAと産褥母体血中cell free(cf) DNAのDNAメチル化プロファイルを作成した。胎盤ではDNAメチル化率100%であるが、産褥母体血中cfDNAではDNAメチル化率0%である遺伝子群を抽出し、「胎盤特異的DNAメチル化パターンを示す遺伝子群」として妊娠中に母体血を用いてモニタリング可能かどうかを検証中である。また、前置胎盤と診断された症例の妊娠32週時の血液を用いて、胎盤由来cfDNA量測定が「臨床応用可能な、分娩前の癒着胎盤予測法」となりうるかを検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癒着胎盤は産科危機的出血の要因となり、その管理には高度な医療技術・施設が要求される。よって、癒着胎盤症例の予後を改善させる最大の方法は、分娩前に癒着胎盤を予測し適当な施設で周産期管理を行うことである。本研究により、癒着胎盤群と非癒着胎盤群とで母体血中cell-free DNA量が大きく異なる遺伝子を発見できれば、癒着胎盤群の予測精度の高いカットオフ値を設定することができる。これが実現できれば癒着胎盤の分娩前予測法として臨床診療での活用の可能性は高まり、「分娩前に癒着胎盤を予測し適当な施設で周産期管理を行う」という、癒着胎盤症例の理想的な周産期管理の実現に大きく寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed five DNA methylation profile sets of villous DNA and cell-free DNA from the women of the 5th day of postpartum to discover some genes which DNA methylation rate of cell-free DNA in the women of the 5th day of postpartum and of villous DNA are 0% and 100%, respectively.

Using blood from pregnant women in 32 weeks of gestation who had diagnosed with placenta previa, it will be verified whether placenta-derived cell-free DNA volume measurement can be a clinically applicable, pre-delivery adhesion placenta prediction method.

研究分野：産婦人科

キーワード：癒着胎盤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血漿中には cell-free DNA (cfDNA) が存在し循環している。1997 年に妊娠中には胎児(胎盤)由来の cfDNA が母体血漿中に存在していることが報告され(母体血漿中に存在する cfDNA の約 10%は胎盤由来)、近年 NIPT (21 トリソミーなどの染色体異常に関する、新型出生前検査) という形で臨床応用されている。胎盤由来 cfDNA は妊娠 7 週から母体血漿中に検出され、妊娠経過とともに増加し分娩後 48 時間以降には確認されないことより、胎盤の状態を real time に評価する手段として注目されている。

一方、近年 DNA の配列変化(変異)を伴わない遺伝子発現変化のメカニズムである DNA の修飾変化(エピジェネティクス)の存在が明らかとなり、さまざまな分野で研究がすすめられ、ヒトゲノム全域の DNA 修飾解析により、ゲノム上のどの遺伝子領域が DNA の修飾を受けるかは細胞や組織の種類により異なっていること(Genes Cells, 2002)が分かった。これに着目し、我々は、胎盤では妊娠経過に伴い DNA メチル化(エピジェネティクスの一つ)が生理的に変化すること、妊娠高血圧腎症の胎盤では DNA メチル化異常を認めることをこれまでに報告するなど、胎盤を用いた DNA メチル化に関する研究を継続的に実施している。

癒着胎盤とは、絨毛の子宮筋層内への浸潤のために胎盤が子宮壁から剥離しない状態を指し、産科危機的出血の要因の一つである。これまでに超音波/カラードプラ検査や MRI 検査などによる癒着胎盤の予測が試みられてきたが、癒着胎盤を確実に分娩前診断あるいは否定する方法は現在のところ確立しておらず、診療の現場では「児娩出後に胎盤が娩出されず、用手剥離によっても胎盤の全体もしくは一部が子宮壁からはずれない」ことで臨床的に診断されるのが現状である。もし分娩前に癒着胎盤を予測し、大量輸血などの出血性ショックの管理・IVR・妊娠子宮の摘出などが可能な施設で児娩出前から管理することが可能となれば周産期予後の改善につながることは間違いなく、分娩前の癒着胎盤の予測法の開発が期待される。しかし、分娩前の癒着胎盤の予測法はいまだ確立していない。我々は、胎児が男児である妊婦を対象とした研究で、非癒着胎盤症例と比較し癒着胎盤症例では母体血漿中の胎盤由来 cfDNA 量(Y 染色体上に存在する遺伝子の DNA を PCR 法で測定)が有意に高値であることを報告した(Clin Chem 2002)。この結果をもとにした癒着胎盤の予測法の開発が期待されたが、この手法では胎児が男児の症例を対象は限定される点が欠点であり臨床応用には至らなかった。

一方、近年、母体と胎盤で DNA メチル化状態が大きく異なる遺伝子が存在することが明らかとなった。また、母体と胎盤で DNA メチル化状態が異なる、常染色体上の遺伝子をターゲットとし、メチル化感受性制限酵素と PCR 技術を利用することで、母体血からターゲットとした遺伝子の胎盤由来 cfDNA 断片(胎盤由来ターゲット cfDNA)のみを(増幅し)採取することに成功した報告がある。

2. 研究の目的

母体由来 DNA ではメチル化されていないが胎盤由来 DNA ではメチル化されている遺伝子の存在に着目し、母体血漿中の胎盤由来 cfDNA 量の妊娠週数に伴う生理的变化と胎盤形成異常や胎盤機能不全病態下での正常変化からの逸脱を明らかにし、これにより「癒着胎盤の予測マーカー」や「胎盤の機能不全や形成不全の病態把握マーカー」の礎となる知見を獲得することを目的に本研究を計画した。

3. 研究の方法

課題 1: 「胎盤特異的 DNA メチル化パターンを示す遺伝子群」を抽出する

母児ともに経過順調であり、かつ未陣発未破水で帝王切開により分娩予定の 5 症例を対象に、

分娩直前の母体血、胎盤、産褥 5 日目の母体血を採取した。血液は EDTA tube に採取し遠心により血漿と buffy coat に分離後、それぞれを解析まで -80 に保存した。胎盤は娩出後 2 時間以内に絨毛組織を採取し生食で洗浄し -80 で保存した。産褥 5 日目の血漿から DNA を抽出することで産褥 5 日目の cfDNA を得た。また、絨毛組織から DNA を抽出する。抽出した DNA をそれぞれパイサルファイト(亜硫酸水素塩)処理し、Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip にハイブリダイズし、各症例の胎盤 DNA と産褥母体血中 cfDNA の DNA メチル化プロファイルを作成した。全ての症例において、胎盤では DNA メチル化率 100%であるが、産褥母体血中 cfDNA では DNA メチル化率 0%である遺伝子群を抽出する予定である。

課題 2：胎盤由来 cfDNA 量測定が「臨床応用可能な、分娩前の癒着 胎盤予測法」となりうるかを検討する

はじめに、「胎盤では DNA メチル化率 100%であるが母体由来 cfDNA では DNA メチル化率 0%である遺伝子」の胎盤由来 cfDNA の母体血中濃度の生理的变化を確認する目的で、妊娠初期から分娩まで当院で管理した妊婦を対象に妊娠 11-13 週、妊娠 19-24 週、妊娠 30-34 週、妊娠 36-37 週時にそれぞれ母体血を採取した。血液は EDTA tube に採取し遠心分離にて血漿を得て、PME free-circulating DNA Extraction Kit を用いて cfDNA を抽出し、-80 に保存した。母体血漿を BstUI で処理し DNA メチル化(+)(ターゲットの遺伝子においては母体由来 DNA)の cfDNA を切断する。その後ターゲット遺伝子の cfDNA 量を定量 RT-PCR 法で測定することで胎盤由来ターゲット遺伝子の cfDNA 量を得る。妊娠週数が進むにつれ cfDNA 濃度が上昇することを確認し、胎盤由来ターゲット遺伝子の cfDNA 量をモニタリングできていることを確認する。

つぎに、妊娠 30 週ころに当院で前置胎盤と診断された症例を対象に妊娠 30-32 週に母体血を採取した。血液は EDTA tube に採取し遠心分離にて血漿を得て、PME free-circulating DNA Extraction Kit を用いて cfDNA を抽出し、-80 に保存した。上述と同様の方法で妊娠 30-32 週時の胎盤由来ターゲット遺伝子の母体血中 cfDNA 濃度を測定する。正常妊娠における妊娠 30-34 週時の濃度を比較し、胎盤由来 cfDNA 量測定が「臨床応用可能な、分娩前の癒着 胎盤予測法」となりうるかを検討する。

4. 研究成果

課題 1：母児ともに経過順調かつ未陣発未破水で帝王切開した 5 症例を対象に胎盤と産褥 5 日目の母体血を採取し絨毛 DNA と産褥母体血中 cfDNA の DNA メチル化プロファイルを作成した。胎盤では DNA メチル化率 100%であるが、産褥母体血中 cfDNA では DNA メチル化率 0%である遺伝子群を抽出し、「胎盤特異的 DNA メチル化パターンを示す遺伝子群」として妊娠中に母体血を用いてモニタリング可能かどうかを検証中である。

課題 2: 妊娠初期から分娩まで当院で管理した妊婦 609 人を対象に妊娠 11-13 週、妊娠 19-24 週、妊娠 30-34 週、妊娠 36-37 週時にそれぞれ母体血を採取した。血液は EDTA tube に採取し遠心分離にて血漿を得て、PME free-circulating DNA Extraction Kit を用いて cfDNA を抽出し、-80 に保存した。課題 1 の解析によりターゲット遺伝子が抽出されたのちに、母体血漿を BstUI で処理後にターゲット遺伝子の cfDNA 量を定量 RT-PCR 法で測定し、胎盤由来ターゲット遺伝子の cfDNA 量を得る。妊娠週数が進むにつれ cfDNA 濃度が上昇することを確認し、胎盤由来ターゲット遺伝子の cfDNA 量をモニタリングできていることを確認する。

また、前置胎盤と診断された妊婦 10 人を対象に妊娠 30-32 週時の血液を採取し、上述のように血漿から cfDNA を抽出し -80 に保存した。課題 1 の解析が終了次第、妊娠 30-32 週時の胎盤由

来ターゲット遺伝子の 母体血中 cfDNA 濃度を測定し、胎盤由来 cfDNA 量測定が「臨床応用可能な、分娩前の癒着 胎盤予測法」となりうるかを検討する予定である。

癒着胎盤は産科危機的出血の要因となり、その管理には高度な医療技術・施設が要求される。よって、癒着胎盤症例の予後を改善させる最大の方法は、分娩前に癒着胎盤を予測し適当な施設で周産期管理を行うことである。本研究により、癒着胎盤群と非癒着胎盤群とで母体血中 cell-free DNA 量が大きく異なる遺伝子を発見できれば、癒着胎盤群の予測精度の高いカットオフ値を設定することができる。これが実現できれば癒着胎盤の分娩前予測法として臨床診療での活用の可能性は高まり、「分娩前に癒着胎盤を予測し適当な施設で周産期管理を行う」という、癒着胎盤症例の理想的な周産期管理の実現に大きく寄与すると考える。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	関沢 明彦 (Sekizawa Akihiko) (10245839)	昭和大学・医学部・教授 (32622)	
連携研究者	川嶋 章弘 (Kawashima Akihiro) (10783376)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	