

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18701

研究課題名（和文）不育症の原因究明にむけた流産絨毛・脱落膜のエピゲノム解析

研究課題名（英文）Characteristic DNA methylation profiles of chorionic villi in recurrent miscarriage

研究代表者

松本 洋介（MATSUMOTO, YOSUKE）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：90791294

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）：習慣流産は約25%の症例で原因は不明のままである。私たちは原因不明習慣流産患者の流産時に採取した、絨毛（胎児由来）と脱落膜（母体由来）を同時に網羅的DNAメチル化解析し、脱落膜ではなく絨毛において、DNAメチル化プロファイルが習慣流産群と正常妊娠群で異なっていることを発見した。習慣流産群と正常妊娠群でDNAメチル化の異なる代表的な遺伝子としてSPATS2Lを同定し、習慣流産群の絨毛の細胞性栄養膜細胞において、SPATS2Lタンパク質の発現が低下していることを発見しました。またSPATS2Lをノックダウンすると、栄養膜細胞の浸潤能・遊走能が低下し、胚の正常な発育が阻害されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

習慣流産の原因となりうる一つの因子として、絨毛のエピゲノム異常が示唆されました。従来原因不明と説明していた患者に、研究的にはエピゲノム異常による流産が存在し、研究対象の習慣流産患者5人全員がその後生児獲得できていることから、その場合は次回妊娠での生児獲得の期待値が高いと説明できます。

研究成果の概要（英文）：The cause of recurrent miscarriage remains unknown in approximately 25% of cases. We performed a comprehensive DNA methylation analysis of chorionic villi (fetal origin) and decidua (maternal origin) collected at the time of miscarriage from patients with unexplained recurrent miscarriage and found that the DNA methylation profiles of chorionic villi, but not decidua, were different between the recurrent miscarriage group and normal pregnancy group. We identified SPATS2L as a representative gene that differs in DNA methylation between the recurrent miscarriage group and the normal pregnancy group, and found that SPATS2L protein expression was decreased in the trophoblastic cells in the recurrent miscarriage group. Knockdown of SPATS2L also reduced the invasive and migratory ability of trophoblast cells, suggesting that the normal development of embryos is inhibited.

研究分野：不育症

キーワード：習慣流産 絨毛 脱落膜 エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

習慣流産は3回以上連続する流産と定義されており、その頻度は1.1%である。その原因には、抗リン脂質抗体症候群(自己免疫疾患)、先天子宮異常、カップルの染色体異常、胎児(絨毛)染色体異常性があるが、25%は原因が特定できない。流産を何度も繰り返すことは非常に辛い経験であり、少子化の現代で習慣流産の原因究明とその予防は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

胚発生において、受精が成立後早期の段階でエピジェネティック・リプログラミングと呼ばれるダイナミックなDNAメチル化の変化が起こり、種々の組織へ分化・成長していくことがわかっている。近年、このエピジェネティクスの観点から習慣流産の原因を究明しようとした研究が散見されるが、胎児由来である絨毛と、母体由来である脱落膜を同時に解析した研究は存在しない。今回私たちは、胎児要因と母体要因のどちらがより大きな影響を及ぼすか調べるために、習慣流産患者の流産時に絨毛と脱落膜を採取し、同時に網羅的なDNAメチル化解析を行った。

3. 研究の方法

習慣流産(RM)患者(n=5)の子宮内容除去術施行時に絨毛と脱落膜を採取し、人工妊娠中絶(AA)患者(n=5)をコントロールとして、網羅的DNAメチル化解析を行った。同定されたRM群とAA群でメチル化の異なる遺伝子を、多数検体(n=19)においてパイロシークエンス法で検証し、免疫染色でSPATS2L蛋白質の発現を解析した。細胞外栄養膜細胞の細胞株において、SPATS2Lをノックダウンし、浸潤能・遊走能に影響を及ぼすか解析した。

4. 研究成果

対象として習慣流産患者5名、コントロールとして人工妊娠中絶女性(正常妊娠)5名を抽出し、網羅的にDNAメチル化を解析した。習慣流産群とコントロール群でDNAメチル化率に差のあった遺伝子のプローブを抽出し、階層型クラスター分析を行ったところ、絨毛では2群間できれいにクラスターが分かれたのに対し、脱落膜ではクラスターが分かれず2群間の症例が入り交じっていた(図1)。

そこで、2群間でメチル化率の差が大きい遺伝子を抽出し、症例数を各群19例に増やして個別領域のDNAメチル化を解析した。SPATS2Lを代表とする3つの遺伝子のエンハンサー領域において、2群間で有意にDNAメチル化率が異なっており、驚くべきことに妊娠週数とのDNAメチル化率の相関も認められた(図2)。

図1 絨毛と脱落膜のDNAメチル化プロファイル

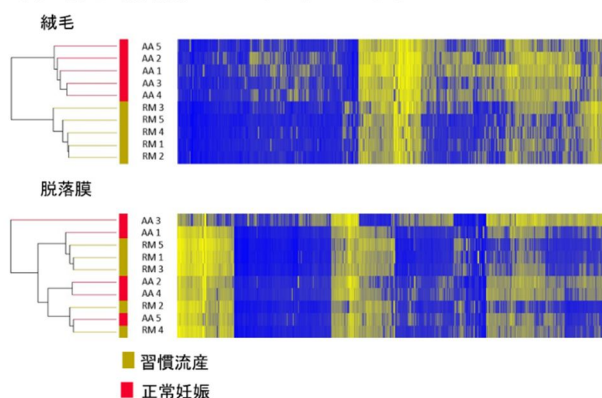
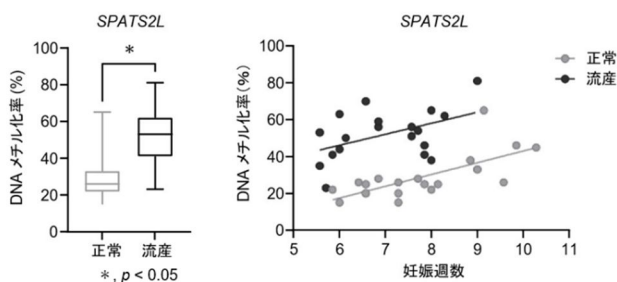


図2 パイロシークエンス法によるSPATS2LのDNAメチル化解析



次に、絨毛組織で SPATS2L の免疫染色を行った。2 層構造を取る絨毛膜の内側を構成する、細胞性栄養膜細胞の細胞質において、習慣流産群で SPATS2L 蛋白の発現が低下していることを発見した。(図 3)

さらに、栄養膜細胞の細胞株を用いて SPATS2L をノックダウンしたところ、その浸潤能、遊走能が低下し、胚の正常な発育が阻害されることが示唆された(図 4)

本研究は、原因不明習慣流産患者の脱落膜ではなく絨毛において、DNA メチル化プロファイルが正常妊娠群と異なっていることを世界で初めて発見した。SPATS2L の DNA メチル化異常だけで流産の原因になるとは断定できないものの、複数の遺伝子の DNA メチル化異常が重なることで、結果として流産が起こりうることを示唆された。今回、網羅的に DNA メチル化を解析した 5 例の習慣流産患者は、全員その後の妊娠で最終的に生児を獲得できている。これにより、従来原因不明と説明していた習慣流産患者に、研究的にはエピゲノム異常で流産となる症例が存在し、その場合は後の生児獲得の期待値が高いことを説明できるようになる。このことは、精神的苦痛を数多く経験している習慣流産患者にとって、大きな精神的な支えになることが期待される。これらの成果をまとめた論文が、2022 年 7 月に Scientific Reports 誌に掲載された。

図3 絨毛における SPATS2L の免疫染色

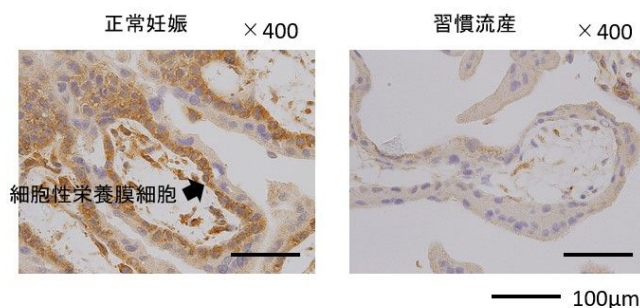
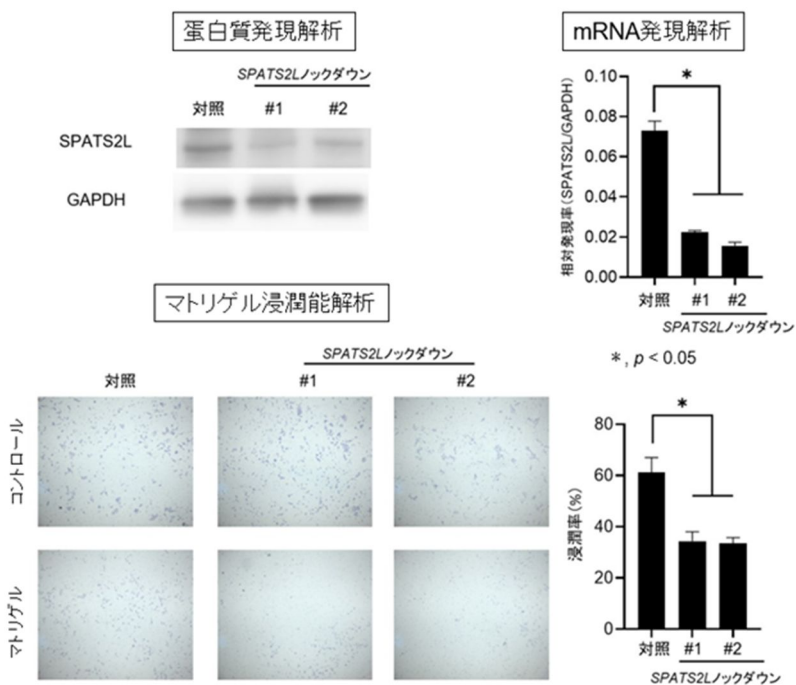


図4 絨毛外栄養膜細胞の SPATS2L ノックダウン



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yosuke Matsumoto, Keiko Shinjo, Shoko Mase, Masaki Fukuyo, Kosuke Aoki, Fumiko Ozawa, Hiroyuki Yoshihara, Shinobu Goto, Tamao Kitaori, Yasuhiko Ozaki, Satoru Takahashi, Atsushi Kaneda, Mayumi Sugiura & Yutaka Kondo	4. 巻 12
2. 論文標題 Characteristic DNA methylation profiles of chorionic villi in recurrent miscarriage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15656-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本 洋介
2. 発表標題 習慣流産患者における流産時の絨毛と脱落膜の網羅的 DNA メチル化解析
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 洋介
2. 発表標題 Genome-wide DNA methylation analysis of chorionic villi and decidua in patients with recurrent miscarriage.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Matsumoto
2. 発表標題 Genome-wide DNA methylation profiles of chorionic villi and decidua in patients with unexplained recurrent miscarriage.
3. 学会等名 ESHRE 35th Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------