

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09499

研究課題名(和文)胎生期形態異常における妊娠維持機構の破綻による流産機序の解明と着床前診断への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of miscarriage due to disruption of the pregnancy maintenance mechanism in fetal morphological abnormalities and its application to preimplantation diagnosis

研究代表者

鈴木 伸宏 (Suzumori, Nobuhiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：70326148

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)：流産・死産児の原因解明のため、胎児の形態や染色体を分析し、2回以上流産・死産を繰り返す不育症症例で、流産時に夫婦と胎児のトリオ分析を行った。原因不明の不育症21家系のうち、16家系の正常核型を対象に、末梢血や唾液からゲノムDNAを抽出し、全エクソーム解析を実施、DNA定量の確認、ライブラリ調製、エクソン領域キャプチャーを行い、NovaSeq6000でシーケンスを行った。  
データは全エクソーム解析プログラムでマッピングし、ホモ接合体変異や病的バリエーションの有無を解析、データベースやPubMedで検索した。流産・死産に関わる病的バリエーションの抽出は現時点で困難であるが、本研究の遂行を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

流産・死産の原因検索のため、不育症の16家系、48検体全てを用いて全エクソーム解析によるトリオ分析を行い、ホモ接合体変異や複合ヘテロ接合体変異、病的バリエーションの有無を解析したところ、明らかな病的バリエーションを絞り込むことができなかったことから、不育症の遺伝学的解析により流産・死産の原因を単一の遺伝子多型の分析により解明することは困難であると思われる。一方、不育症に悩むカップルが多くなかで、その原因は胎児染色体異常、子宮形態異常、抗リン脂質抗体症候群以外にも多岐にわたり、胚・子宮内膜の局所での病理病態について未知の領域が多いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the cause of miscarriage and stillbirth, fetal morphology and chromosomes were analyzed, and trio analysis of the couple and fetus was performed at the time of miscarriage in cases of two or more repeated miscarriage or stillbirth. Genomic DNA was extracted from peripheral blood and/or saliva, whole exome analysis was performed, DNA quantification was confirmed, the libraries were prepared, the exon region capture was performed, and sequencing was performed on NovaSeq6000 for normal karyotype in 16 of the 21 families with unexplained miscarriage cases.

Data were mapped with a whole exome analysis program, analyzed for the homozygous mutations and pathological variants, and searched in databases and PubMed. The elucidation of pathological variants related to miscarriage and stillbirth is difficult at this time, but we are continuing to carry out this study.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：流産 胎生期形態異常 エクソーム解析 胎児染色体 胎盤 トリオ分析

## 1. 研究開始当初の背景

国内では、結婚年齢の上昇、出産年齢の高年齢化がしだいに進んできており、16人に1人は生殖補助医療による出生である。一方、卵子の老化、高年齢の妊娠による流産率の上昇(35歳で20%、40歳で40%)や胎児染色体異常の増加は、超高齢化社会や労働力人口の減少を背景に、大きな社会問題になっている。母親の加齢とともに、減数分裂時において染色体の不分離が高頻度で起き、胎児染色体異常・胎生期形態異常やそれに伴う流産・死産は増加している。

出生児の3~5%には先天性疾患がある。また、自然流産・死産の約70%に胎児染色体数的異常がみられ、アレイ解析を加えると、さらに約10%の微細欠失・重複などの染色体構造異常がみられる。つまり、流産の約80%には胎児の染色体不均衡がある。また、通常の受精卵には、かなり高い頻度で染色体異常がみられ、20~34歳で59%、35~39歳で63%、40~47歳では受精卵の74%に染色体の異常がみられる。また、胎児形態異常がみられると、染色体異常がなくても多くの胎芽・胎児が淘汰されることが分かっている。

血管新生は、炎症、低酸素、がんなどにかかわる病態において誘引されるが、胚発生、創傷治癒、妊娠といった生理的過程においても起きる現象である。胚発生のときは血管新生が促進され、胎芽・胎児発育が促される。一方、胎児染色体不均衡や胎生期形態異常があると、母体胎児境界でフィブリン沈着が増えて、バリア形成され、妊娠維持機構が破綻する。フィブリン沈着は抗原特異的な免疫反応、細胞性免疫反応でみられ、子宮脱落膜において免疫系のシグナルが働き、胎児の排除機構へ導かれると考えられる。また、妊娠ごく初期の段階で、制御性T細胞が免疫学的寛容を誘導することが分かっている。しかし、胎児染色体異常や胎生期形態異常があると、なぜほとんどの症例で自然流産となるのか、について詳しいメカニズムはわかっていない。それが本研究課題の核心をなす学術的な問いである。

## 2. 研究の目的

自然流産の要因として、胎児染色体や胎生期形態異常による胎児因子、抗リン脂質抗体症候群や子宮形態異常による母体因子、局所の炎症等による環境因子の3つが知られている。私たちはこれまでの研究テーマで、胎児染色体不均衡の遺伝学的要因、遺伝子多型解析による流産や胎児形態異常の原因について分析を進めてきた。本研究の目的は、妊娠10週以降の胎児因子による流産において、脱落膜での免疫・血管新生の制御による母児間免疫クロストークからみた胎児形態異常の流産、排除機構の解明に焦点を絞っている。

ほ乳類の胎盤絨毛、母体の免疫細胞を含む脱落膜では多くのサイトカインが発現しており、胎児成分が母体免疫・血管系に積極的に認識されることによって脱落膜に生着して妊娠が成立する。脱落膜細胞のケモカイン遺伝子のサイレンシングによって、T細胞の母体胎児境界への侵入を制限することがわかっている。また、サイトカイン研究のモデル動物のうち、HGF (Hepatocyte Growth Factor) ノックアウトマウスでは、胎児形態異常、胎盤の著しい成長障害による流産が起きることが報告されている。胎生期形態異常があると、母体胎児境界で細胞性免疫反応でみられるフィブリン沈着が増えている。これらのことから、免疫・血管新生、T細胞が形態異常を有する胎児成分の排除メカニズムにかかわっていることが示唆される。

次世代シーケンサーの普及によりさまざまな稀少遺伝性疾患の病因遺伝子が解明されてきている。全前脳胞症(holoprosencephaly: HPE)の重症型は、16,000人に1人の割合で出生するが、自然流産200例に1例の割合で発生する胎生期形態異常であり、99%近くは流産する。*HPE1*は21q22.3、*HPE2*は2p21、*HPE3*は7q36、*HPE4*は18pの4つの遺伝子座があり、染色体だけではなく、胎児遺伝子変異が母体で認識され、流産に至ることが分かる。また、胎生期形態異常には、夫婦のホモ接合体変異や複合ヘテロ接合体変異など、病的バリエーションの組み合わせで起きる重篤な遺伝性疾患があり、着床前診断へ結びつく可能性が高い。

本研究は、胎児形態異常の子宮脱落膜における免疫系・新生血管因子による流産、排除機構を解明し、夫婦と児のトリオ分析により着床前診断へつなげるという点で学術的独自性があり、高年齢の妊娠が急増している社会に与えるインパクトが高いという点で、波及効果は大きい。

### 3. 研究の方法

対象者は不育症女性とその夫、胎児（流産絨毛）とし、2-6回の初期流産歴を有して出産既往は問わないとする。夫婦と胎児（絨毛）のトリオ分析として、2回以上の原因不明の流産・死産例のうち、夫婦・胎児（絨毛）の染色体分析にて全て正常核型を解析対象とする。また、不育症精査にて原因不明、絨毛染色体検査にて染色体正常核型を対象とし、夫婦の末梢血または唾液、胎盤の絨毛成分よりゲノムDNAを抽出して、全エクソーム解析によるトリオ分析を行い、ホモ接合体変異や複合ヘテロ接合体変異、病的バリエーションの有無を解析する。

Germline mutationの検出は、Genomon-exomeを用いて行う。配列リードはBurrows-Wheeler Alignerを用いてhg19ゲノムをコントロールとし、VariantはPicard toolsを用いてPCR duplicateを除去し、VarScan2を用いて検出する。Variant allele frequency>0.2 (20%)をカットオフ値とし、American College of Medical Genetics (ACMG)のガイドラインにより、(1) ESP6500 exome variant server、(2) 1000 genomes projectでマイナーアレル頻度が1%を超えるSNPsを除去した。このVariantは、病原性が既に報告された原因Variant、あるいは関連するリスクを引き起こすと強く予想されるVariantとした。各Variantの具体的な病原性については、NCBIのHuman Genome Mutation Database、PubMedにより検討する。

### 4. 研究成果

対象者は29-40歳の不育症女性とその夫、胎児（流産絨毛）とし、2-6回の初期流産歴を有して出産既往は問わないとし、夫婦と胎児（絨毛）のトリオ分析として、2回以上の原因不明の流産・死産例、21症例のうち、夫婦・胎児（絨毛）の染色体分析にて全て正常核型の16家系、48検体を解析対象とした。また、不育症精査にて原因不明、絨毛染色体検査にて染色体正常核型を対象とした。夫婦の末梢血または唾液、胎盤の絨毛成分よりゲノムDNAを抽出して、16家系、48検体全てを用いて全エクソーム解析によるトリオ分析を行い、ホモ接合体変異や複合ヘテロ接合体変異、病的バリエーションの有無を解析した。

胎児染色体正常の不育症症例のトリオ解析によって、解析条件からの絞り込みを行った。常染色体上の候補遺伝子で潜性遺伝（劣性遺伝）形式としては、*SLC25A5*、*NEB*、*PKD1*、*ZMYND15*、*ERICH3*、*DNAH17*、*ARHGFE2 (HYDIN)*、*ZFH2*、*MOCOS*、*PCNT*、*ZMYM3*が挙げられた。いずれも母体成分の混入がない検体であることを確認した。X染色体上の候補遺伝子としては、胎児成分が46,XYであったトリオ解析症例で、*FAM47C*の2か所、*GATA1*、

*DIAPH2*、*COL4A5*、*MAGEC2*、*PASDI*、*ERCC6L*、*RAB40AL*、*RBMXL3*、*CT47B1*、*OCRL* が挙げられた。いずれの候補遺伝子でも SNP であり、明らかな病的バリエーションと指摘できるデータは抽出困難であった。

児（絨毛）に引き継がれた Rare variant が、圧倒的に母由来のものが 5 症例あり、絨毛としてエクソーム解析をしていたつもりが母由来の DNA 混入によるものであった可能性があり、ショートタンデムリピート解析にて個人識別を行った。

さらに着床前診断へ応用として、ゲノム DNA のトリオ分析で、夫婦の病的バリエーションで起きる重篤な遺伝性疾患と判断される症例を検討している。トリオ分析で遺伝的要因が明らかなきは、着床前診断の対象症例として考慮し、妊娠 10 週以降の胎生期形態異常流産・死産例を含めて対象とし、病理学的に原因分析し、状況に応じてトリオ分析を推進していく。シーケンス結果は、臨床ゲノム情報統合データベースなどのデータベース分析をして、PubMed 検索で Variant の意義についてさらに詳しく調べていく方針である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Konishi Akiko, Samura Osamu, Suzumori Nobuhiro et al.	4. 巻 67
2. 論文標題 Prevalence of common aneuploidy in twin pregnancies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 261 ~ 265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-021-01001-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzumori Nobuhiro	4. 巻 48
2. 論文標題 What are the ethical issues involved in noninvasive prenatal testing in Japan?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 300 ~ 305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15089	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyagami Keiko, Shirato Nahoko, Izumi Mikiko, Hirose Tatsuko, Yasui Osamu, Hamada Shoko, Matsuoka Ryu, Suzumori Nobuhiro, Sekizawa Akihiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Prenatal Identification of Confined Placental Mosaicism in Pregnant Women with Fetal Growth Restriction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 896 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43032-021-00772-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyagami Keiko, Shirato Nahoko, Izumi Mikiko, Hirose Tatsuko, Yasui Osamu, Hamada Shoko, Matsuoka Ryu, Suzumori Nobuhiro, Sekizawa Akihiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Prenatal Identification of Confined Placental Mosaicism in Pregnant Women with Fetal Growth Restriction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 896 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43032-021-00772-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Konishi Akiko, Samura Osamu, Muromoto Jin, Tanaka Toshitaka, Yonetani Naoto, Kamei Yoshimasa, Nagamatsu Takeshi, Matsumoto Mariko, Tairaku Shinya, Fujiwara Arisa, Nakamura Hiroaki, Harada Takashi, Watanabe Takafumi, Sasaki Shoko, Kawaguchi Satoshi, Minami Sawako, Ogawa Masaki, Miura Kiyonori, Suzumori Nobuhiro et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Prevalence of common aneuploidy in twin pregnancies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-01001-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Goto Shinobu, Suzumori Nobuhiro, Kumagai Kyoko, Otani Ayano, Ogawa Shino, Sawada Yuki, Inuzuka Saki, Sugiura Ogasawara Mayumi	4. 巻 47
2. 論文標題 Trends of fetal chromosome analysis by amniocentesis before and after beginning of noninvasive prenatal testing: A single center experience in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 3807 ~ 3812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田辺紋子、武田恵利、鈴森伸宏、熊谷恭子、後藤志信、大谷綾乃、田口育、杉浦真弓、町田純一郎、岸上靖幸、小口秀紀
2. 発表標題 NIPT陰性確認後に流・死産となった経緯についての検討
3. 学会等名 第46回日本遺伝カウンセリング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野村佳美 後藤志信 大谷綾乃 熊谷恭子 北折珠央 鈴森伸宏 杉浦真弓 加藤晋 岩田欧介
2. 発表標題 当院で周産期管理した胎児18トリソミーについての検討
3. 学会等名 第58回日本周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学  
<https://www.nagoyacumedobgyn.com/research/>

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
---------	---------