

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791225

研究課題名（和文）

子宮内胎児発育遅延児の胎盤形成遺伝子（*Rt11*）メチル化異常に関する研究

研究課題名（英文）

A study regarding aberrant methylation of Retrotransposon-like 1 gene in human placentas of intrauterine growth restriction

研究代表者

藤岡 一路 (FUJIOKA KAZUMICHI)

神戸大学・医学部付属病院・臨床研究員

研究者番号：20568810

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、胎盤形成遺伝子（*Rt11*）のプロモーター領域のメチル化異常がヒトの子宮内胎児発育遅延（IUGR）発症に関与しているかを明らかにすることであった。IUGR 児および正常新生児娩出後の胎盤から抽出した DNA を用いて、*Rt11* プロモーター領域の IG-DMR のうち、CG4 領域のメチル化率を比較したが、二群間で差を認めなかった。結果として、IUGR 発症に関与する *Rt11* メチル化異常は同定できなかった。そこで、IUGR 発症に関与する遺伝子多型の検討を行い、IUGR リスクとなる *VEGF* 遺伝子多型、*RAS* 遺伝子多型を同定した。

研究成果の概要（英文）：

A purpose of this study was to clarify the aberrant methylation of Retrotransposon-like 1 gene (*Rt11*) in human placenta of intrauterine growth retardation (IUGR). We could not find different methylation pattern of *Rt11* in human placentas of IUGR and healthy newborns. However, we detected the *VEGF* and *RAS* polymorphisms that are associated with IUGR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2800000	840000	3640000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：子宮内胎児発育遅延、胎盤、レトロトランスポゾン由来遺伝子 (Retrotransposon-like 1: *Rt11*)、遺伝子多型、血管内皮増殖因子 (VEGF)、レニン・アンジオテンシン系 (RAS)

1. 研究開始当初の背景

子宮内胎児発育遅延 (Intrauterine growth retardation: IUGR) は、胎内環

境悪化の結果、胎児が妊娠週数相当の標準発育に比べて小さい場合である。IUGR

児は、新生児死亡率や罹病率、後障害発生率が高いことに加え、成人期生活習慣病の発症リスクが高いことが明らかとなっており、IUGR発症の原因究明とその治療法の開発が緊急課題である。

近年、動物実験により、胎生期の環境刺激がDNA塩基のメチル化による遺伝子発現の変化 (Epigenetic変化) を来すことで、形態や機能の恒常的変化を来す可能性が報告されている。ヒトIUGR発症に関しても、Epigenetic変化との関連が強く示唆されているが、現在までヒトにおいて直接的にIUGRとEpigenetic変化の関連を証明した研究はない。

我々は過去の検討において、重症IUGR発症の主因が胎盤の異常であることを明らかにした (神緑会学術誌 2012)。また、近年同定されたレトロトランスポゾン由来の新たな胎盤形成遺伝子である Retrotransposon-like 1 (*Rt11*) は、プロモーター領域のDNAメチル化を介したEpigenetic変化により発現制御されていることがわかっている。興味深いことに、*Rt11*欠損モデルマウスは胎盤低形成を、*Rt11*過剰発現モデルマウスは胎盤過形成を呈するが、児はともに重度の发育遅延を伴う致命的な経過をたどることが明らかになった。以上より、*Rt11*のプロモーター領域のDNAメチル化を介した*Rt11*の適切な発現が、正常な胎児発育に欠かせないことが推察された。

2. 研究の目的

そこで、ヒトIUGRの発症に関与する、胎盤形成遺伝子*Rt11*プロモーター領域のメチル化異常を明らかにすることを目的として、以下の検討を行った。

3. 研究の方法

遺伝子解析に関して、本学の倫理委員会の承認を得た。検体採取に関して、神戸大学医学部附属病院周産母子センターでIUGRとして出生した新生児または正常新生児の出産後に娩出された胎盤を収集した。検討期間中に収集したIUGR児19例 [在胎週数中央値35(26-41)週、出生体重中央値1314(590-2312)g、出生体重Z-score中央値-2.8(-2.0--4.0)SD、男児13/19例]、正常新生児11例 [38(24-41)週、2728(590-3280)g、-0.1(-0.5-1.1)SD、5/11例]の胎盤を解析に供した。

胎盤をホモジナイズし、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いてDNAを抽出した。次いで、Kagamiらの既報 (Nat Genet 2008) で報告された*Rt11*プロモーター領域のIG-DMRのうち、メチル化率と*Rt11*発現の関連が示されたCG4: 82, 275, 42-82, 275, 737bp(311 bp)領域を対象として、同領域内の40bp中に含まれる5か所のCpGサイト (図1: CGCGGTTGCCATTGCCCGCG) についてメチル化率をPyrosequencing法 (EpigenDx, Inc) により測定し、各CpGサイトのメチル化率、CG4領域全体のメチル化率に関して二群間で比較検討した。

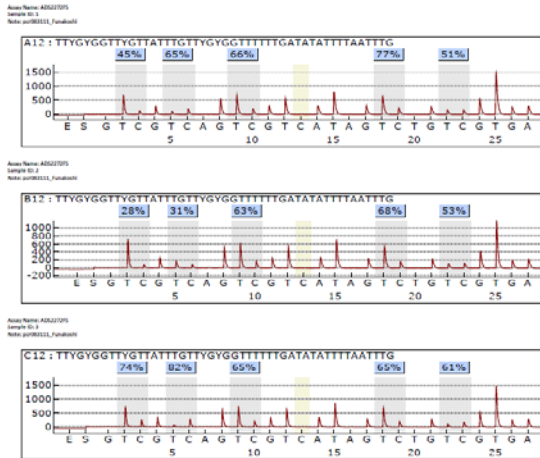
図1: 解析対象領域

Human IG-DMR sequences: CG4

```
>hg19_dna range=chr14:101275074-101276582 5'pad=500 3'pad=500 strand=+
repeatMasking=none
CTCTGTGTGAGGCTTTPGAGTAGCTAGGATCACAGGCTGAGCCAGCACATCGCTCAGGCCTGGGTGGTTGTGGCC
TCAGTTTACCAGTGAATTGCCAGGATTCATTCATCTCTGATCCTTGGAGTGGTGTGTGGCTGTTCCTGATCTAGGG
GACTGGTGTCAACAGAACTTCCTTCCACCCACACCAAACTGTCCAGGTTCTCTGTGCTTCTCACTGAGGGA
TGAGAGACTAGAACAGCACACACCCTCTCTTGGGATGACTTTGGTAAATTCACCTTTGAGCAGCTGTGTAA
AGCTCTCTGGGATGTTCTTTAGAGAGAGATCTTAAAGGCCCTCATTTCCAGTAGAGGCTTCCACTCTTC
TACTGTGTGAAATGTCTTCTCTGCTGAGGCTCTTTTGGGCGTAGCAACCTCCTCGGCGGCCCTC
CCTTGGGGAGACTGCTTCTCTCTCTTTTCATCTCTGGGGCCAAAGGAATGAATTTGGGTATTGAGGAG
ATTTGCATCTGCAGCTTCATGCCAAGATCTAACTACTCTCTGGCAAGAGAGACATACCTCACTACCGACTG
GGTTGGAGAGAGCTTTTCTTTCTCTGAGTCTTAAATTTGGTCAAGGATCTGGAC
TGGCTGAGAGGTTCTGAGGTTCTGGATCAGTGAGTAGAGAGTGCAGGCTCTGGTCTGTAAGCTGGA
CAACTTAATCTCTCTGAGATCTCAGATCAGTATATCATTCGAGTATCTGTGTGAAATAATGCCAACAC
TAATCCAGGTAACCTTTTGGCACCCCTTAGATTCTCGAATCTCCAGTAGAATTGCCAGACTCTATCC
TGGCTTAGGGAAACTTCTGAGGCTCCAAAGACCCAGTCTCCCTGAAAACCCACTGTGACCCAGTCTTT
TGTGTATGGTTTTGCACACCTGAGCTCTCTGAGTGTGAGAGTGCAGGCTCTGTGTCTGTAAAGCTGGA
GAACTGAGAGCCATTCTTAGCATGTTGTACTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AGCAATTGATAAGCATTTTGGTACCATTCCCTCTCAGACCCACAAATCCCTGATCTGCGACTGGGGCTTGAG
ACCACACTACACTAGCTTTTCTCATGTGTGGGGTGGACAGGTAACCAAGTGAACCTGCTGGTGGTAGCTCTTAA
TGTCTTGTGCTACTCTGAGGTCTCCCATGTGGGATAGGGAGATGAGAGAGCAACCAATCTCTCTGCGAC
CCAGATGACTCTGTAAATCTTCTCTTACAGCTGCTGAGGACACCCCTGTTTCTTTTAAATGGGATCT
TCATCTGTGGCCAGGCTGCATGACGAGTGCAATCTCACTCA
```

Blue highlighted: Pyrosequencing target (4 CG sites)
Yellow highlighted: PCR primers from the paper
(Nature Genetics 40, 237 - 242 (2008))

4. 研究成果

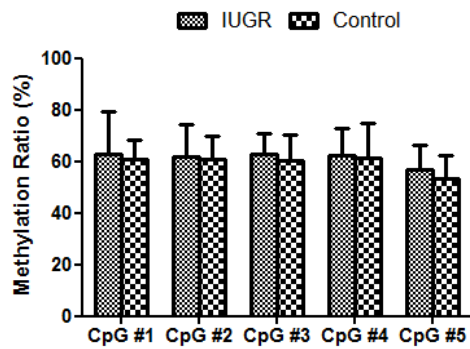


(1) 胎盤における *Rt11* プロモーター領域のメチル化率

Pyrosequencing 法によるメチル化率解析結果を示す (図 2)。

図 2: 症例毎のCpGサイトのメチル化率

IUGR 群と正常対照群の各 CpG サイトの平均メチル化率の比較を示す (図 3)。CpG #1-#5 において二群間で平均メチル化率に有意差を認めなかった (IUGR vs. Control; CpG #1



vs. 53.1 ± 9.1%, p=n.s)。

図 3: IUGR群と正常対照群の各CpGサイトの平均メチル化率の比較

また CG4 領域全体のメチル化率に関しても、二群間で有意差を認めなかった (IUGR vs.

Control; 61.3 ± 8.7 vs. 59.2 ± 7.1%, p=n.s)。

結論として、本検討においては胎盤形成遺伝子 *Rt11* プロモーター領域 (CG4) の DNA メチル化異常とヒトの IUGR 発症との関連は認めなかった。

(2) 血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: *VEGF*) 遺伝子多型の関与

遺伝的素因の観点から、胎生期の血管形成や胎盤血管形成において重要な役割を果たす血管新生因子である *VEGF* の遺伝子多型に着目し、IUGR およびその結果生じる Small for gestational age (SGA) 児との関連を検討した。

神戸大学病院周産母子センターに入院した初産の新生児のうち、出生体重が在胎週数の平均の発育より -1.5 SD を下回った児 41 例を SGA 群、在胎週数通りの発育を遂げた児 44 例を appropriate for gestational age (AGA) 群とし、2 群間において *VEGF* 遺伝子多型を周産期背景因子と共に比較検討した。疾患関連多型として過去に報告のある *VEGF* 一塩基多型 : -1498T>C (rs833061)、-1154G>A (rs1570360)、-634C>G (rs2010963)、-7C>T (rs25648)、936C>T (rs3025039)、1612G>A (rs10434) を解析対象とした。

結果として、2 群間の周産期背景因子は、妊娠高血圧症候群の割合が SGA 群で有意に多かった。*VEGF* 遺伝子型のアリル頻度は、-1498T/C の T アリル頻度、-634C/G の C アリル頻度が SGA 群で有意に高かった。また、遺伝子型頻度は、-1498T/C の CC 型が SGA 群で有意に少なく、-634C/G の CC 型が SGA 群で有意に多かった。多変量解析の結果、-634C>G の CC 型は SGA の独立した危険因子であった。

図4：SGA群とAGA群のVEGF遺伝子アレル頻度/遺伝子型頻度の比較

<RASアレル頻度の比較>

	アレル	SGA, n=82	AGA, n=88	p value
-1498T>C	T / C	68 / 14	60 / 28	0.026
-1154G>A	G / A	73 / 9	75 / 13	0.461
-634C>G	C / G	43 / 39	31 / 57	0.024
-7C>T	C / T	73 / 9	70 / 18	0.091
936C>T	C / T	63 / 19	69 / 19	0.805
1612G>A	G / A	74 / 8	74 / 14	0.232

<RAS遺伝子型頻度の比較>

	遺伝子型	SGA, n=41	AGA, n=44
-1498T>C	TT / TC / CC	28 / 12 / 1*	23 / 14 / 7
-1154G>A	GG / GA / AA	32 / 9 / 0	31 / 13 / 0
-634C>G	CC / CG / GG	14* / 16 / 11	6 / 19 / 19
-7C>T	CC / CT / TT	32 / 9 / 0	27 / 16 / 1
936C>T	CC / CT / TT	22 / 19 / 0	26 / 17 / 1
1612G>A	GG / GA / AA	33 / 8 / 0	31 / 12 / 1

* -1498T>CのCC型: SGA, 1/41(2.4%) vs. AGA, 7/44(15.9%), p=0.034
 * -634C>GのCC型: SGA, 14/41(34.1%) vs. AGA, 6/44(13.6%), p=0.026

結論として、VEGF-634C>GのCC型は、SGAの発症に関与している可能性がある。

(3) レニン-アンジオテンシン系 (Renin-angiotensin system: RAS) 遺伝子多型の関与

(2)に同じく、血圧、体液量、電解質代謝、組織障害などに大きく関与する因子であり、その機能的遺伝子多型と高血圧罹患、心血管合併症との関連が知られているRAS遺伝子多型とIUGR、SGAとの関連を検討した。

神戸大学病院周産母子センターに入院した新生児を、前述の基準によりSGA群92例、AGA群101例に分け、2群間においてRAS遺伝子多型を周産期背景因子と共に比較検討した。疾患関連多型として過去に報告のあるACE rs4340(I/D)、AGT rs699(C>T)、AGTRI rs5186(A>C)を解析対象とした。

結果として、SGA群ではAGA群と比較して、出生体重が有意に低く、帝王切開、妊娠高血圧症候群の割合、母体年齢が有意に高かった。RAS遺伝子アレル頻度の比較では二群間に有意差を認めなかった。一方、遺伝子型頻度の比較では、AGT rs699(C>T)のTT型がSGA群で有意に高かった(4.3% vs. 0%, p=0.03)。

多変量解析の結果、AGT rs699(C>T)のTT型はSGAの独立した危険因子であった。

図5：SGA群とAGA群のRAS遺伝子型頻度の比較

	遺伝子型	IUGR, n=92	AGA, n=101	P value
ACE rs4340(I/D)	II	38 (41.3%)	41 (40.6%)	0.92
	ID	48 (52.2%)	52 (51.5%)	0.92
	DD	6 (6.5%)	8 (7.9%)	0.71
AGT rs699(C>T)	CC	61 (66.3%)	62 (61.4%)	0.48
	CT	27 (29.3%)	39 (38.6%)	0.18
	TT	4 (4.3%)	0 (0%)	0.03
AGTRI rs5186(A>C)	AA	79 (85.9%)	87 (86.1%)	0.96
	AC	11 (12.0%)	14 (13.9%)	0.69
	CC	2 (2.2%)	0 (0%)	0.14

結論として、AGT rs699(C>T)のTT型は、SGAの発症に関与している可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

(1) Fujioka K, Morioka I, et al. Severe retinopathy of prematurity with retinal detachment in monozygotic twins. *Pediatr Int.* 査読有, 2013; 掲載確定

(2) 藤岡一路, 森岡一朗, 他. 日本人 Small-for-gestational age児における血管内皮増殖因子遺伝子多型の関与の検討. *日本未熟児新生児学会雑誌.* 査読有, 2013; 25(2):掲載確定

(3) 藤岡一路, 芳本誠司. <新生児編>II. X線診断 A. 単純X線診断 (正常像と異常像) 30 胸部X線診断-縦隔腫瘍, CCAM, 肺分画症. *周産期医学.* 査読無, 2013;43(増刊号):掲載確定

(4) 藤岡一路. II. 予防接種Q&A (1) 日本脳炎 172. (追加接種: 流行地への渡航) 東南アジアの日本脳炎流行地へ出かけるときは、成人でも追加接種を受けたほうがよいですか. *小児内科.* 査読無, 2013;45(増刊号):掲載確定

(5) Fujioka K, Sakai H, et al. N-terminal Pro-brain Natriuretic Peptide Levels in

Monochorionic Diamniotic Twins with Twin-to-twin Transfusion Syndrome Treated by Fetoscopic Laser Photocoagulation. Kobe J Med Sci. 査読有, 2013; 59(1):28-35.

(6) Fujioka K, Morioka I, et al. Renin is activated in monochorionic diamniotic twins with birthweight discordance who do not have twin-to-twin transfusion syndrome. J Perinatol. 査読有, 2012; 32(7):514-9.

(7) 藤岡一路, 森岡一朗, 他. 在胎週数相当の-2SD未満のSmall-for-Gestational-Age児の臨床像 単一施設の入院症例における検討. 神緑会学術誌. 査読無, 2012; 28:73-7.

(8) 森岡一朗, 万代ツルエ, 香田翼, 松尾希世美, 横田知之, 藤岡一路, 他. 長期予後からみた出生前診断症例における周産期管理の再評価 長期予後からみた出生前診断と治療 母体及び胎盤・臍帯要因で極低出生体重児として出生した重度胎児発育不全児の3歳時の精神運動発達. 周産期学シンポジウム. 査読無, 2012; (30):53-9.

(9) 藤岡一路. キングスカレッジ・プログラム留学報告書. 日本未熟児新生児学会雑誌. 査読無, 2012;24(2):115-22.

(10) 藤岡一路. 一般小児科外来診療におけるトラベルメディスンの意義. 日本渡航医学会誌. 査読有, 2012; 5(1):40-4.

[学会発表] (計 12 件)

(1) 藤岡一路. 全く予期されていなかった先天性風疹症候群の一例. 第8回周産期新生児感染症研究会, 神戸, 2013年3月30日

(2) 藤岡一路, 他. Twin to Twin Transfusion Syndrome (TTTS) に対する Fetoscopic laser photocoagulation (FLP) 施行例の出生時NT-pro BNP 値の検討. 第26回近畿小児科学会, 大阪, 2013年3月24日

(3) 藤岡一路, 他. 体内治療的帝王切開術 (Ex utero intrapartum treatment: EXIT) による気道確保を行った胎児頸部腫瘍の1例. 第258回日本小児科学会兵庫県地方会, 尼崎, 2013年2月23日

(4) Fujioka K, Morioka I., et al. A vascular endothelial growth factor polymorphism is associated with the development of chronic lung disease in Japanese premature newborns. The Asian Society for Pediatric Research Conference, Kuching, Sarawak, Malaysia, May 9 to 12, 2013

(5) Fujioka K, Morioka I., et al. Association between rennin-angiotensin systems gene polymorphisms and intrauterine growth restriction in a Japanese population. The Asian Society for Pediatric Research Conference, Kuching, Sarawak, Malaysia, May 9 to 12, 2013

(6) Fujioka K, et al. Increased levels of serum N-terminal prohormone brain natriuretic peptide at birth in monochorionic twins with selective intrauterine growth restriction. The Asian Society for Pediatric Research Conference, Kuching, Sarawak, Malaysia, May 9 to 12, 2013

(7) 藤岡一路, 坂井仁美, 他. 一絨毛膜二羊膜双胎のselective IUGRにおける出生時

NT-proBNP値の検討. 第57回日本未熟児新生児学会, 熊本, 2012年11月25-27日

(8) 藤岡一路. 留学体験記 英国滞在中で気づいたこと. 第57回日本未熟児新生児学会, 熊本, 2012年11月25-27日

(9) 藤岡一路, 森岡一朗, 他. 子宮内胎児発育遅延とレニン・アンジオテンシン系遺伝子多型の関連. 第48回日本周産期・新生児医学会, 大宮, 2012年7月8-10日

(10) 藤岡一路, 森岡一朗, 他. 新生児慢性肺疾患とVEGF遺伝子多型の関連. 第48回日本周産期・新生児医学会, 大宮, 2012年7月8-10日

(11) Fujioka K., Morioka I., et al. Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms in newborns with intrauterine growth restriction. The Society for Pediatric Research Conference, Boston, USA, April 28 to May 1, 2012.

(12) 藤岡一路, 森岡一朗, 他. 子宮内胎児発育遅延とVEGF遺伝子型の関連. 第56回日本未熟児新生児学会, 東京, 2011年11月13-15日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤岡 一路 (FUJIOKA KAZUMICHI)

神戸大学・医学部附属病院・臨床研究員

研究者番号: 20568810