

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791723

研究課題名(和文) エピジェネティクスに基づく妊娠高血圧症候群の病態把握マーカー知見の獲得

研究課題名(英文) Placental DNA methylation pattern in preeclampsia

研究代表者

小出 馨子 (KOIDE, Keiko)

昭和大学・医学部・助教

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、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠経過に伴う絨毛DNAメチル化の生理的变化と妊娠高血圧腎症(以下PE)症例での正常変化からの逸脱を明らかにする目的で本研究を行った。胎児心拍を確認後に人工流産となった症例、周産期合併症なく経過した症例、PE症例を対象とした。絨毛DNAメチル化プロファイルを作成し網羅的解析を施行し、PEの病態形成への関連が示唆される遺伝子を抽出しさらなる検討を行った。その結果 胎盤の正常な発生・成熟はDNAメチル化によりコントロールされていること、絨毛におけるDNAメチル化異常がPEの発症に関与していること、その異常が胎盤形成期である妊娠6週から11週の時点ですでに生じている、以上3点の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Normal placentation and placental development require changes of DNA methylation status in some specific genes and the responsible genes differ with stage in pregnancy. It was suggested that the alterations of villous DNA methylation caused between 6 to 11 weeks were associated with the pathogenesis of preeclampsia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：DNAメチル化 妊娠高血圧腎症

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (Pregnancy induced hypertension: PIH) は母児の予後に多大な影響を与える妊娠合併症の一つで、病態解明・予知・予防といったさまざまな点で研究がすすめられている。PIH は胎盤形成の際に認める、絨毛細胞のラセン動脈でのリモデリング異常が原因であり、“胎盤形成異常による疾患”とされているが、詳細な発症機序は不明な点が多かった。2003年にMaynardらによりPIHを発症した母体血中のsFlt-1値やsEng値が有意に上昇していることが報告され(J Clin Invest, 2003, N Engl J Med, 2006)以降、これらの抗血管増殖因子とPIHとの関係についての研究が進み、この結果を支持する報告が多数なされた(Nat Med, 2006, Placenta, 2008)また、PIH症状を認める前から母体血中のこれらの蛋白量は有意に上昇していることも確認され、母体血中のsFlt-1値やsEng値の異常高値がPIHの病態に大きく関与していることはすでにコンセンサスを得ているが、これらの蛋白が異常に産生される原因や機序については未だ解明されていない。

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)の存在が明らかにされ、特に個体の発生や組織の成熟・分化の過程において、各遺伝子に大きなエピジェネティック変化が生ずることがわかってきた(Nature, 2007)。さらにヒトゲノム全域のDNA修飾解析(エピゲノム解析)により、ゲノム上のどの遺伝子領域がDNAの修飾(エピゲノム修飾)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)エピゲノム修飾パターンに依存して細胞や組織特有の遺伝子発現が決定されていること、さらにこれにより細胞特有の機能発現(分化)が決定されること(Genome Res, 2008)が明らかにされ、とりわけ胎盤では特有の振る舞いをする遺伝子(ゲノム刷込み遺伝子)のエピジェネティック変化が報告されてきたが(Placenta, 2005)胎盤において、どのような遺伝子にエピジェネティックな変化がみられるかを網羅的に解析した例はなかった。

申請者は、予備的な研究として、PIHの発症前(妊娠12週)に、胎盤において、FLT1遺伝子が異常高発現を呈することを明らかにし、研究協力者の関与とともにPIHの発症予測に有用な胎盤マーカーとして報告した(Prenat Diagn, 2008)。一方、「胎盤は胎児の成長とともに、質・量ともに大きく変容する臓器であり、このため種々の遺伝子に発現変化がみられるゆえ、緻密な遺伝子発現制御

がなされているのではないか」、「このような発現制御システムの異常が胎盤形成異常の原因となっているのではないか」、さらに「この制御にエピジェネティックなシステムが関わっているのではないか」と考え本研究を計画した。

2. 研究の目的

妊娠高血圧症候群は全妊娠の3-5%に認められる妊娠合併症である。発症すると母児ともにリスクが高いため、発症予知やその予防が周産期予後の改善に大きく貢献可能であり、その方法の開発が期待されてきた。このような背景の下、妊娠高血圧症候群の主要因が胎盤形成異常であることや胎盤における遺伝子の発現異常、母体血中での発症前からの遺伝子産物量の上昇が明らかにされてきた。しかし「遺伝子発現異常を来すメカニズム」は不明であった。そこで申請者らは、妊娠経過に伴う絨毛DNAメチル化の生理的変化と妊娠高血圧腎症症例での正常変化からの逸脱を明らかにし、これにより「エピジェネティクスに基づく妊娠高血圧症候群の病態把握マーカー」の礎となる知見を獲得する。

3. 研究の方法

昭和大学病院および連携病院で胎児心拍を確認後に人工流産となった症例、周産期合併症のない帝王切開分娩症例、妊娠高血圧腎症(以下PE)と診断され帝王切開術にて分娩となった症例を対象に胎盤(絨毛)を採取した。帝王切開症例は全て未陣発・未破水症例に限定した。

(1) 妊娠6週5例、妊娠10-11週5例、正常妊娠後期10例(26-38週、中央値37週、平均35週)、PE症例11例(27-37週、中央値31週、平均32週)の絨毛組織からDNAを抽出し、各症例のDNAメチル化プロファイルを作成した。アレイはIllumina Infinium® Human Methylation450 BeadChipを使用した。妊娠6週群と11週群、妊娠11週群と正常妊娠後期群を比較し、正常妊娠における絨毛DNAメチル化の生理的変化について検討した。PE群と正常妊娠後期群を比較した。

(2) (1)で、PEでメチル化異常を認めるCpG群として抽出された1,317 CpG sitesのうち、CpG islandに存在する206 CpG sitesの結果を用い、DNAメチル化プロファイルを作成した全ての症例を対象にクラスター解析を施行した。

(3) (2)で確認された、「PE絨毛でDNAメチル化異常を認め、かつ妊娠6週から妊娠10-11週でもDNAメチル化率が有意に変化するCpG sites群(アレイでのDNAメチル化パターン: 妊娠6週-高メチル化、妊娠10-11週-中メチル化、正常妊娠後期-中メチル化、PE-高メチル化)」から細胞増殖など

との関連が報告されている遺伝子 (AKT3、HOXC4、MAD1L1、NCOR2、NSD1、ZFP36L2) を選出し、遺伝子発現量について検討した。対象は妊娠 6 週群、妊娠 11 週群、正常妊娠後期群、PE 群で各群につき 10 症例ずつとした。絨毛組織から mRNA を抽出し、各遺伝子の mRNA 量を RT-PCR 法で測定し各群間で比較した。

4. 研究成果

(1) 妊娠 6 週群と 11 週群との比較でメチル化に有意差を認められたのは 15,153 CpG sites、11 週群と正常妊娠後期群では 29,422 CpG sites であった。妊娠 6 週群と 11 週群、妊娠 11 週群と正常妊娠後期群の両方の比較で有意に変化を認められたのは、このうちの 638 CpG sites のみであった。この結果より、胎盤の正常な発生・成熟は DNA メチル化によりコントロールされていること、さらにその責任を担っている CpG site は妊娠時期により異なる可能性が示された。正常妊娠後期群と比較し PE 群で有意差を認められたのは 1,317 CpG sites で、このうち PE でメチル化傾向であったのは 547 CpG sites、脱メチル化傾向であったのが 770 CpG sites であった。PE でメチル化異常を認める CpG に比べ、胎盤の正常な発生・成熟に伴い生理的に DNA メチル化が変化する CpG のほうがはるかに多いことが分かった。また、PE で DNA メチル化異常を認める CpG の中には生理的な変化を認める CpG が含まれていることも分かった。

(2) クラスター解析の結果、解析に用いた 206 CpG sites における DNA メチル化パターンは、妊娠 6 週、妊娠 10-11 週、正常妊娠後期、PE (2 パターン存在) でそれぞれ明らかな異なることが分かった。この結果は、PE で DNA メチル化異常を認める CpG のなかには、妊娠 6 週から妊娠 10-11 週にかけて DNA メチル化率が変化する部分が含まれていることを示すものである。

(3) 検討した全ての遺伝子において、妊娠初期には低発現で、妊娠の経過に伴い発現が増加する傾向であった。PE 群では正常後期群と比較し低発現であり、特に HOXC4 や MAD1L1 では妊娠 6 週と同程度に低発現であった。この遺伝子発現の傾向は、アレイで得られた DNA メチル化の結果から予想された遺伝子発現傾向と全て一致していた。この結果より、これらの遺伝子は DNA メチル化により遺伝子発現がコントロールされている可能性が示唆された。

以上より、胎盤の正常な発生・成熟は DNA メチル化によりコントロールされていること、絨毛における DNA メチル化異常が PE の発症に関与していること、その異常が胎盤形成期である妊娠 6 週から 11 週の時点ですでに生じている可能性が示された。

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 1 件)

小出 馨子、関沢 明彦、竹中 慎、鈴木 稚子、岡井 崇

【メタボリックシンドロームと周産期管理】
プログラミングに果たす胎盤の役割
周産期医学 42 巻、7 号 855-859

[学会発表] (計 4 件)

小出 馨子、関沢 明彦、宮上 哲、四元 淳子、仲村 将光、大石 親護、岡井 崇
妊娠高血圧症候群と胎盤の DNA methylation に関する研究.

第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会
2012 年 4 月 13 日、神戸

小出 馨子

シンポジウム 2 (周産期) 妊娠高血圧症候群の基礎と臨床 - 予防・治療の新戦略に向けて -

ヒト初期絨毛遺伝子の変化に着目した妊娠高血圧症候群発症の予知と予防.

第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会
2013 年 5 月 11 日、北海道

Keiko Koide, Kyoko Hori, Satoshi Miyagami, Shin Takenaka, Akihiro Kawashima, Hiroshi Chiba, Akihiko Sekizawa
Placental DNA methylation pattern in preeclampsia.

International Society For the Study of Hypertension in Pregnancy World Congress
2013 年 9 月 12 日、カナダ (ウィスラー)

小出 馨子、堀 恭子、竹中 慎、丸山 大介、松岡 隆、市塚 清健、関沢 明彦
絨毛における DNA メチル化異常と preeclampsia の発症に関する検討.

第 34 回妊娠高血圧学会学術集会
2013 年 10 月 04 日、富山

[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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 馨子 (KOIDE, Keiko)
昭和大学・医学部・助教
研究者番号：90384437

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

関沢 明彦 (SEKIZAWA, Akihiko)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：10245839

竹中 慎 (TAKENAKA, Shin)
昭和大学・医学部・助教
研究者番号：60515211