

令和 2 年 6 月 12 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：17K11252

研究課題名(和文) 絨毛検査で採取した初期絨毛の遺伝子解析を通じた妊娠高血圧症候群の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of hypertensive disorder of pregnancy through DNA methylation analysis of villous trophoblasts in first trimester

研究代表者

関沢 明彦 (Sekizawa, Akihiko)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：10245839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠初期の絨毛は早期には細胞増殖能が強く、その後は絨毛としての機能を担うように分化していく。この機能分化にDNAメチル化が主要な役割を担っているとの仮説を基に研究を行った。正常な妊娠経過を示している妊娠6～8週、妊娠10-11週、妊娠後期、および妊娠高血圧症候群を発症した後の絨毛を採取し、そのDNAメチル化をプロファイリングするとともに、絨毛の遺伝子発現との相関について検討した。その結果、細胞増殖に関連する遺伝子の関与が推定され、それらの遺伝子に存在するCpGサイトの妊娠経過に伴う生理的なDNAメチル化不全が、妊娠高血圧症候群の胎盤で認められることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠初期絨毛の生理的な機能変化にDNAメチル化の変化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。妊娠初期の生理的なDNAメチル化が起こらないことが、絨毛細胞の機能的な変化につながり、それが妊娠高血圧腎症の病態のもとを形成している可能性が示唆された。DNAメチル化の異常はさまざまな環境因子の影響を受けると推察され、そのメチル化異常の防止がHDPの発症予防につながる可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The villus trophoblasts at 1st trimester of pregnancy have a strong cell proliferation ability especially in the early stages, and then differentiate to function as villi in the placenta. We conducted research based on the hypothesis that DNA methylation plays a major role in this functional differentiation. We collected villus tissues at 6-8 weeks, 10-11 weeks, and late gestation. We also collected the tissues in pregnancy with hypertensive disorder of pregnancy (HDP). Their methylation was profiled by microarray and compared each other. As a result, the involvement of genes related to cell proliferation was presumed, and it was confirmed that deficiency of physiological DNA methylation in the villous trophoblasts at 1st trimester is associated with the pathogenesis of HDP.

研究分野：周産期学

キーワード：妊娠高血圧症候群 絨毛 胎盤 DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとは、ゲノム配列変化に依存しない DNA や染色体ヒストン蛋白質への化学修飾変化に基づく遺伝子発現調節の機構である。中でもエピジェネティックな調節を受け、片親由来の遺伝子のみが働くインプリンティング機構は胎盤を有する哺乳類が獲得した高度なメカニズムであり、DNA メチル化はその主体として胎盤の形成や機能の維持に働いている (Genome Res, 2008)。しかし、ヒトの絨毛細胞分化や胎盤形成、胎盤機能維持との関連で、DNA メチル化を網羅的に検討した研究は限定的である。

一方、葉酸は、DNA メチル化に必須の栄養素 (DNA のメチル化基質) であるが、二分脊椎などの先天奇形との関与がいわれている一方、妊娠合併症発症との関与については一定の見解は示されていない。

我々は、胎盤形成期の遺伝子発現異常が妊娠高血圧症候群 (HDP) の発症に関与するかを検討する目的で、妊娠 11 週に行った絨毛検査の 5 症例から余剰絨毛を採取し、その後に HDP を発症した 2 症例と正常に経過した 3 症例で絨毛の遺伝子発現を比較した。その結果、その後に HDP を発症した症例では、抗酸化因子である heme oxygenase-1 (HO-1) や superoxide dismutase (SOD) の発現が低下 (絨毛細胞の抗酸化能が低下) し、抗血管増殖因子である Flt-1 や Endoglin 発現が上昇していることを見いだした。これは、妊娠後期に HDP を発症した胎盤で観察される生理的な変化が、既に妊娠 11 週の絨毛細胞に生じていることを示しており、HDP の病態が妊娠 11 週の段階で既に形成されていることを示すものである (Prenat Diagn, 2008; Reprod Sci, 2009; Prenat Diagn 2009; Prenat Diagn. 2011)。

次に、11 週の絨毛の抗酸化能が低下していたことから、胎盤形成期の酸化ストレスが胎盤形成に不利に働くとの仮説をもとに、妊娠 8-10 週に、血液の SOD 活性を測定し、活性が低く酸化ストレスがあると考えられる妊婦を対象に、抗酸化剤を投与して HDP の発症予防ができるかについてランダム化比較試験 (RCT) を行った。具体的には、抗酸化剤としてはビタミン C (1g/day) と E (400U/day) を妊娠 12 週から分娩開始まで投与した。その結果、重症 HDP の発症は減少しなかったものの、軽症例はオッズ比 0.372 と有意に減少した。さらに注目すべきは、投与開始 4 週間後の血液検査 (細胞成分由来 RNA 発現の評価) で絨毛細胞の HO-1 と SOD 発現はプラセボ群に比し有意に高値を示し、同時に Endoglin 発現は低値を示した。これより、投与した抗酸化剤による酸化ストレスの軽減により、絨毛機能が改善し、その結果が抗血管増殖因子である Endoglin の産生抑制につながったと考えられ、妊娠初期の胎盤形成期の絨毛の酸化ストレスがその分化・発育に重要な影響を及ぼしていると考えられた。

さらに、人工妊娠中絶時に採取した正常妊娠経過を示す初期絨毛組織の遺伝子発現の検討では、正常な妊娠経過に伴い、抗酸化因子や血管増殖関連遺伝子などの多くの遺伝子発現がダイナミックに変化することを見出している (Reprod Sci, 2012)。これらの生理的な胎盤機能の変化は喫煙などの環境因子の影響を受けるなどもあり、胎盤 (絨毛) の DNA メチル化の変化と深くかかわっていると考え、胎盤形成と胎盤機能発現に関わる生理的な胎盤機能獲得における DNA メチル化の関与とその異常に伴う HDP 発症について検討することとした。

2. 研究の目的

妊娠初期の胎盤形成期から妊娠中期に向けての DNA メチル化における変化を把握し、その異常が胎盤形成異常の原因となり、HDP などの病態形成に繋がると仮説し、その証明を目的とする。

具体的には、絨毛細胞の妊娠経過(妊娠 6 週~12 週)に伴う DNA メチル化プロファイルを作成するとともに、妊娠合併症症例の初期絨毛の DNA メチル化プロファイルと比較することで、妊娠合併症の発症の病態メカニズムを解明する。さらに、胎盤形成過程における妊娠合併症に特異的な DNA メチル化異常を見だし、そのメチル化を惹き起こすキーとなる遺伝子、CpG メチル化サイトを抽出することで、妊娠初期に母体血を用いて胎盤由来の CpG サイトの DNA メチル化を測定することで、新たな分子マーカーを開発する。

3. 研究の方法

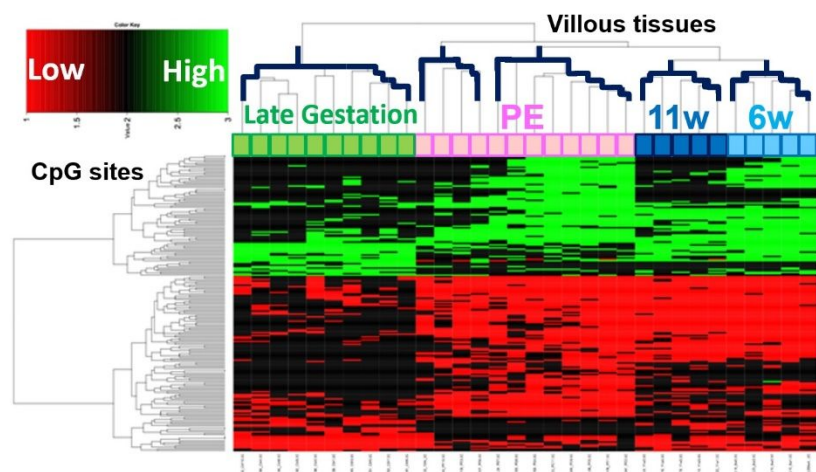
妊娠初期の胎盤形成期の絨毛細胞、および HDP を発症した胎盤と正常胎盤から採取した絨毛細胞での DNA メチル化のマイクロアレイ解析の結果をクラスター解析することで、HDP の絨毛で起こっている DNA メチル化異常は胎盤形成期に起こっていることを立証する。このクラスター解析の結果を踏まえ、HDP の病態形成に主要な役割を果たしていると考えられる CpG サイトを、パイロシーケンサーを用いて定量化し、また、遺伝子発現は TaqMan PCR を用いて定量化し、抽出する。

4. 研究成果

胎児心拍が確認できている状態で人工妊娠中絶を行った症例から、説明同意のもと絨毛組織を採取した。妊娠 6 週と 11 週に限定して、手術直後に絨毛組織を採取し、凍結保存した。その後 DNA 抽出を行って DNA メチル化についてメチレーションアレイを用いて全ゲノム上の 45 万 CpG サイトを分析し、DNA メチル化をプロファイリングした。

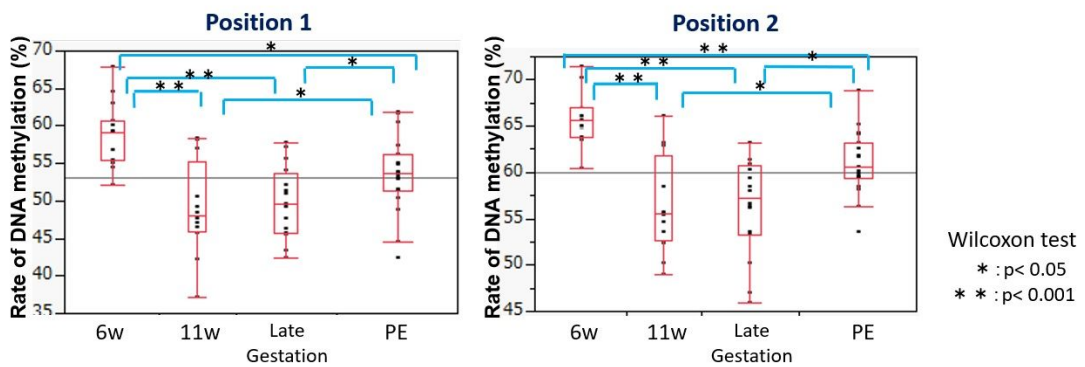
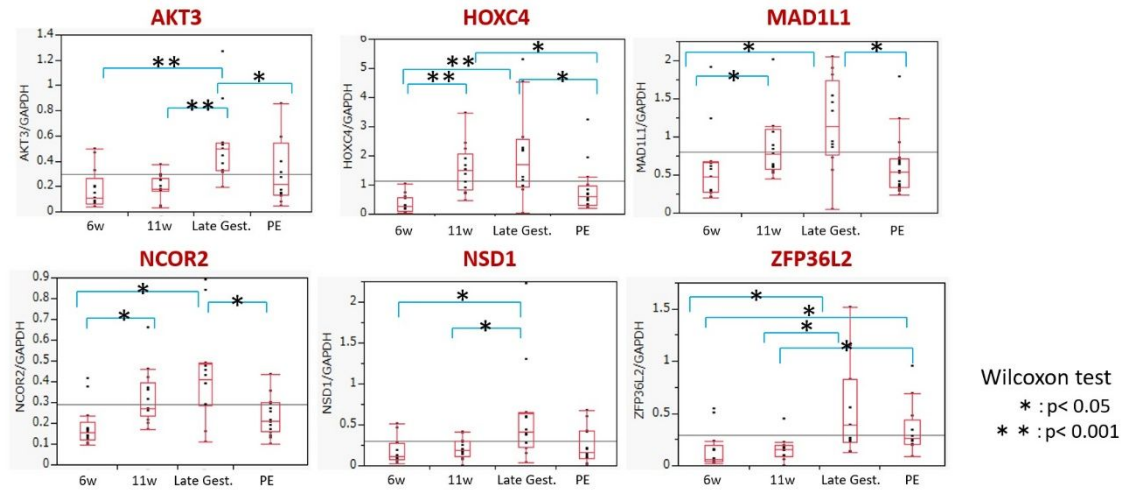
さらに、HDP を発症した症例(症例は全て妊娠高血圧腎症 PE である)の胎盤と正常に妊娠経過した症例(ともに帝王切開を実施)の胎盤でも DNA メチル化のプロファイリングを行って両群間で違いがあった CpG サイトを抽出した。その上で、妊娠後期の正常と HDP 発症で DNA メチル化状態が有意に異なった 206 の CpG サイトを抽出した。この 206CpG サイトについて妊娠 6 週と 11 週のサンプルでの結果をクラスター解析したところ、妊娠 6 週と 11 週のサンプルが完全に分離した。

さらに、逆に、妊娠 6 週と 11 週の DNA メチル化状態に差のあった 1723 の CpG サイトについても妊娠後期と HDP の絨毛での結果をクラスター解析したところ、同様に、妊娠後期の正常と HDP は完全に分類された。これらの結果は、妊娠 6 週から 11 週の間にかかる DNA メチル化不全がその後の HDP の病態形成に主要な役割を果たしていることを示す興味深い成果である。



次に、正常妊娠後期と HDP の比較から抽出された 206 の DNA メチル化サイトの中で、細胞増殖に関連する 6 種類の遺伝子(HOXC4, MAD1L1, NSD1, ZFP36L2, AKT3, NCOR2)に注目し、その遺伝子の発現を正常経過の妊娠 6 週、11 週、妊娠後期と HDP 発症後の絨毛で定量し、

発現量の変化を多数例で比較した。その結果、それら遺伝子発現は妊娠経過に伴って生理的に発現が上昇し、正常経過の妊娠後期発現量は HDP に比して有意に高値を示すことが確認された。



さらに、HOXC4 の 2 か所の DNA メチル化サイトについて、Pyrosequencing 法でメチル化の程度を定量化したところ、両サイトともメチル化率は妊娠経過とともに低下していくこと、また、HDP 症例ではメチル化率が高いことがわかった。さらに、メチル化率と遺伝子発現量との相関をみたところ、ともに有意な負の相関を示し、遺伝子発現を DNA メチル化が制御していることを確認した。

この結果から、妊娠初期絨毛の生理的な機能変化に伴う DNA メチル化の変化が起こらないことが、絨毛細胞の機能的な変化につながり、それが妊娠高血圧腎症の病態のもとを形成している可能性が示唆される。DNA メチル化の異常はさまざまな環境因子の影響を受けると推察され、そのメチル化異常の防止が HDP の発症予防につながる可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Suzumori Nobuhiro, Sekizawa Akihiko, Ebara Takeshi, et al.	4. 巻 224
2. 論文標題 Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma for the prediction of hypertensive disorders of pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 165 ~ 169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejogrb.2018.03.048	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 -
1. 著者名 Kawashima Akihiro, Oba Tomohiro, Yasuhara Rika, Sekiya Bunbu, Sekizawa Akihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytokine profiles in maternal serum are candidates for predicting an optimal timing for the delivery in early onset fetal growth restriction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Prenatal Diagnosis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pd.5679	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 -
1. 著者名 Chaemsaitong Piya, Pooh Ritsuko K., Zheng Mingming, Ma Runmei, Chaiyasit Noppadol, Tokunaka Mayumi, Shaw Steven W., Wataganara Tuangsit, Yeo George S.H., Wright Alan, Leung Wing Cheong, Sekizawa Akihiko, Hu Yali, Naruse Katsuhiko, Saito Shigeru, Sahota Daljit, Leung Tak Yeung, Poon Liona C.	4. 巻 221
2. 論文標題 Prospective evaluation of screening performance of first-trimester prediction models for preterm preeclampsia in an Asian population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 650.e1 ~ 650.e16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajog.2019.09.041	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 -
1. 著者名 Chaemsaitong Piya, Sahota Daljit, Pooh Ritsuko K., Zheng Mingming, Ma Runmei, Chaiyasit Noppadol, Koide Keiko, Shaw Steven W., Seshadri Suresh, Choolani Mahesh, Panchalee Tachjaree, Yapan Piengbulan, Sim Wen Shan, Sekizawa Akihiko, Hu Yali, Shiozaki Arihiro, Saito Shigeru, Leung Tak Yeung, Poon Liona C.	4. 巻 -
2. 論文標題 First trimester pre eclampsia biomarker profiles in Asian population: a multicenter cohort study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ultrasound in Obstetrics & Gynecology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/uog.21905	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 -

1. 著者名 Arakaki Tatsuya, Hasegawa Junichi, Nakamura Masamitsu, Takita Hiroko, Hamada Shoko, Oba Tomohiro, Matsuoka Ryu, Sekizawa Akihiko	4. 巻 33
2. 論文標題 First-trimester measurements of the three-dimensional ultrasound placental volume and uterine artery Doppler in early- and late-onset fetal growth restriction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine	6. 最初と最後の頁 564 ~ 569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14767058.2018.1497601	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 -

1. 著者名 Katsuragi Shinji, Kanayama Naohiro, Nakata Masahiko, Murakoshi Takeshi, Yoshimatsu Jun, Osato Kazuhiro, Tanaka Kayo, Sekizawa Akihiko, Ishiwata Isamu, Ikeda Tomoaki, on behalf of the Maternal Death Exploratory Committee in Japan and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists	4. 巻 32
2. 論文標題 Analysis of preventability of hypertensive disorder in pregnancy-related maternal death using the nationwide registration system of maternal deaths in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine	6. 最初と最後の頁 3420 ~ 3426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14767058.2018.1465549	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 関沢明彦
2. 発表標題 妊娠高血圧症候群：胎盤形成期の絨毛細胞の病態
3. 学会等名 第40回日本妊娠高血圧学会学術集会 (招待講演)
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
研究分担者	川嶋 章弘 (Kawashima Akihiro) (10783376)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	四元 淳子 (Yotsumoto Junko) (30553648)	昭和大学・医学部・特別研究生 (32622)	