

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K19880

研究課題名(和文) 非遺伝母組織適合性抗原(NIMA)免疫寛容と妊娠高血圧腎症発症に関する探索的研究

研究課題名(英文) An Exploratory Study of Non-Inherited Maternal Histocompatibility Antigen (NIMA) Immune Tolerance and the Development of Preeclampsia

研究代表者

菅原 準一 (Sugawara, Junichi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60280880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、三世代コホート参加者を対象として、長鎖型シークエンサーによるHLA-G領域情報解析を進めた。その結果、妊娠高血圧腎症の母児ペアに特徴的にみられる新規対立遺伝子を発見した。加えて、妊娠高血圧腎症とHLA-G*01:01:01:01対立遺伝子の下流領域内に存在するTストレッチとの間に関連性を見出した。加えて、三世代コホート参加者の妊婦、夫、児、祖父母のいわゆるヘプタファミリー161組の末梢血DNAを用いたジャポニカアレイ解析結果を検証した。さらに、それらをもとにHLA タイピングを確認検証し、NIMA の特定、妊婦の周産期情報との関連解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧腎症(Preeclampsia: PE)は、遺伝環境相互作用による原因不明の多因子疾患であり、母体・胎児死亡の原因として、周産期医学上の大きな課題となっている。また、本疾患に罹患した母児の長期予後を見ると、その後の生活習慣病の発症リスクが高いことが、多く報告されている。本研究は、胎児のNIMA(非遺伝母組織適合性抗原)と妊娠高血圧腎症発症との関連解析結果が得られることにより、将来的に母体血による妊娠高血圧腎症発症リスク予測法開発の端緒を開く意義を有する。

研究成果の概要(英文)：We found a novel HLA-G allele characteristically found in mother-infant pairs with Preeclampsia using a long-chain sequencers. In addition, we found an association between preeclampsia and a T-stretch in the downstream region of the HLA-G*01:01:01:01 allele. In addition, we validated the results of Japonica array analysis using 161 pairs of peripheral blood DNA from the so-called heptafamily of pregnant women, husbands, children, and grandparents of the three-generation cohort participants. Furthermore, based on these results, we confirmed and validated HLA typing, identified NIMAs, and conducted association analysis with perinatal information of pregnant women.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠高血圧腎症 妊娠高血圧症候群 HLA NIMA 非遺伝母組織適合性抗原

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症 (Preeclampsia:PE) PE の発症・進展には、遺伝的背景および子宮内環境などの環境因子の複雑な相互作用が関連していると考えられている。これまでの研究により、PE については、全体で 55%程度が遺伝的素因に基づくと考えられており、母方の遺伝的関与が全体の 35%、胎児の遺伝子による影響が 20%、両親の遺伝的素因の相互作用が 13%と推定され、PE 発症の免疫学的要因がクローズアップされている。最近、妊婦と胎児の間にはお互いの微量の有核細胞が長期間生着する母子間マイクロキメリズムが成立しており、胎児の非遺伝母組織適合性抗原 (NIMA) に対する免疫学的寛容が、その後の世代の妊娠成立に大きな影響を与えることが明らかになった (Cell 2015)。具体的には、児に生着した母体有核細胞の抗原に対する CD4+CD25+制御性 T 細胞活性が、次世代の妊娠予後に大きく影響することが明らかとなった。その結果、従来メンデル遺伝で説明されてきた妊婦と夫 (児) との遺伝学的適合性解析手法の概念が大きく覆されようとしている。

HLA 遺伝子群は、移植などの主要な適合性抗原として重要であるが、集団遺伝学的検討や疾患との関連解析が精力的に行われてきた。また、近年の次世代シーケンサーの普及により、HLA 遺伝子全領域の多型解析が加速している。

疾患感受性遺伝子群の同定には、数々の参照パネルが用いられてきたが、遺伝子群によるリスクが人種間で大きく異なることも報告されている。そのため、人種的な背景を十分に考慮したゲノム解析が求められている。現在まで使用可能な参照パネルは、主に欧米で開発されたものであり、日本人の遺伝的背景が反映されていないものがほとんどであった。我々はこれらの課題を克服するため、日本人ゲノム解析ツールである「ジャポニカアレイ®」を開発した。このアレイ®を用いた遺伝子型インピュテーション技術は、安価な全ゲノムシーケンス復元を可能とし、日本人最適化された約 66 万 SNP から最大 2,000 SNP が取得可能である。以上の背景から、新しい NIMA 免疫寛容を基盤として、ジャポニカアレイ®を用いた高精細ハプロタイピングを行い、三世代コホートから得られる検体を用いて、PE 罹患家族の遺伝学的適合性を明らかにするための探索的研究を立案した。

2. 研究の目的

妊娠高血圧腎症は原因不明の多因子疾患であり、母体・胎児死亡の原因として、周産期医学上の大きな課題となっている。PE の病因として遺伝学的因子の寄与が報告されているが、いまだ詳細不明である。

最近の研究により、妊婦と胎児の間にはお互いの微量の有核細胞が長期間生着する母子間マイクロキメリズムが成立しており、胎児の NIMA に対する免疫学的寛容が、その後の世代の妊娠成立に大きな影響を与えることが明らかになった。具体的には、NIMA 免疫寛容が次世代の妊娠予後に多く関与することが明らかとなり、妊婦の NIMA と児 (夫) の HLA 適合度により妊娠合併症の発症頻度が異なることが推定される。

従来の全ゲノム解析研究において、疾患感受性遺伝子群の同定には、数々の参照パネルが用いられてきた。一方、人種間における SNP の差異が多く報告されており、疾患感受性遺伝子群に

よるリスクが人種間で大きく異なることも報告されている。そのため、人種的な背景を十分に考慮したゲノム解析が求められている。現在まで使用可能な参照パネルは、主に欧米で開発されたものであり、日本人の遺伝的背景が反映されていないものがほとんどであった。これらの課題を克服するため、本研究では、我々が開発した日本人ゲノム解析ツールである「ジャポニカアレイ®」を使用して研究を実施する。この SNP アレイを用いると遺伝子型インピュテーション技術により、安価に全ゲノム配列の復元シーケンスが可能である。

本研究は、我々の実施している三世代コホートから得られる PE 患者家族のサンプルから、高解像度ハプロタイプ解析を行い、NIMA 免疫寛容に基づいた HLA 遺伝子群の適合度を探索することで、PE の遺伝的要因解明の端緒を切り拓くことを目的としている。具体的には、祖父母 妊婦 夫 児の HLA 領域(4 座程度を予定)タイピングし、PE 発症リスクと妊婦と児(夫)の HLA ハプロタイプ適合度を探索する。

3. 研究の方法

(1) 三世代コホート(東北大学医学系研究科倫理委員会承認 2013-4-103)

宮城県在住の妊婦を中心とした三世代コホート研究が開始しており、妊婦 21,655 人の登録がなされ、夫婦・児・母方祖父母の全てが登録されている家族は 359 組に達している。PE の発症率を 5-7% とすると、少なくとも 18-25 組の PE 罹患三世代家族が得られる。

(2) 解析対象

妊娠高血圧腎症: PE 罹患妊婦、夫、児、妊婦祖父母 各 20 例 合計 100 例 (20 家系)

対照群: 正常妊娠による妊婦、夫、児、妊婦祖父母 各 20 例 合計 100 例 (20 家系)

合計 200 例

A. 妊娠高血圧腎症の適応基準(日本妊娠高血圧学会診断基準を適応):

登録時に 20-45 歳。単胎妊娠。

妊娠 20 週以降に初めて高血圧が発症しかつ蛋白尿を伴う。分娩後 12 週時に症状がない。

高血圧: 収縮期血圧 140 mmHg 以上あるいは拡張期血圧 90 mmHg 以上。

蛋白尿: 原則として 24 時間尿を用いた定量法で判定し、300 mg/日以上。

B. 対照妊婦の適応基準:

登録時に 20-45 歳。単胎妊娠。循環器系、内分泌系、自己免疫系疾患等の既往を有さない。

(3) HLA 領域ゲノム解析

計画 1. HLA インピュテーションによる三世代ハプロタイプピング

PE 罹患妊婦、夫、児(臍帯血) 母方祖父母の末梢血から DNA を抽出、ジャポニカアレイによる SNP スキャンを行う。

インピュテーション技術によるゲノム復元を行い、HLA 遺伝子群の高精細 DNA タイピングを行う。場合により、特定の HLA 領域(A, B, C, DRB-1 の 4 座を予定)に設計されたプライマーを用い、Pacific bioscience 社の長鎖型シーケンサーを用いてゲノム解読を行う。対照妊婦家族においても同様の解析を行う。

計画 2. NIMA ハプロタイプの決定と適合度解析

祖父母・妊婦の HLA ハプロタイプ解析から、妊婦の NIMA ハプロタイプを決定する。

妊婦の NIMA ハプロタイプと児の IPA(Inherited Paternal Antigen)ハプロタイプを比

較することで両者の適合度を解析する。

4 . 研究成果

本研究では、東北メディカル・メガバンク機構の推進する三世代コホート参加者を対象として、HLA-G 領域にプライマーを設計し、罹患妊婦および対照妊婦と児の組み合わせにおいて、長鎖型シーケンサーによる情報解析を進めた。その結果、妊娠高血圧腎症の母児ペアに特徴的にみられる新規対立遺伝子を発見した。加えて、妊娠高血圧腎症と HLA-G*01:01:01:01 対立遺伝子の下流領域内に存在する T ストレッチ (チミンの繰り返し: 本研究では 17 ~ 43 bp) との間に関連性を見出した (Sci Rep. 2020 Nov 18;10(1):20027. doi: 10.1038/s41598-020-77081-3.)。加えて、三世代コホート参加者の妊婦、夫、児、祖父母のいわゆるヘプタファミリー161 組(1127 検体)の末梢血 DNA を用いたジャポニカアレイ解析結果を検証した。さらに、それらをもとに HLA タイピングを確認検証し、NIMA の特定、妊婦の周産期情報との関連解析を実施した。

現在、検証解析を進めており、胎児の NIMA(非遺伝母組織適合性抗原)と妊娠高血圧腎症発症との関連解析結果が得られることにより、将来的に母体血による妊娠高血圧腎症発症リスク予測法開発の端緒を開く意義を有する。

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 Nishizawa Ayako, Kumada Kazuki, Tateno Keiko, Wagata Maiko, Saito Sakae, Katsuoka Fumiki, Mizuno Satoshi, Ogishima Soichi, Yamamoto Masayuki, Yasuda Jun, Sugawara Junichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of HLA-G long-read genomic sequences in mother?offspring pairs with preeclampsia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-020-77081-3	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0件

〔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
---------	---------