

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09609

研究課題名(和文) 母体血漿中DNA/RNAを用いた妊娠高血圧症候群の予知法の開発

研究課題名(英文) Development a method to predict preeclampsia using maternal plasma DNA/RNA

研究代表者

小出 馨子 (Koide, Keiko)

昭和大学・医学部・講師

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

研究成果の概要(和文)：妊娠11-13週に絨毛検査目的で採取された余剰な絨毛組織を対象とし、妊娠経過正常例とのちにPEを発症する症例とで胎盤DNAメチル化状態に差異のある遺伝子を抽出した。のちにPEを発症する初期絨毛でプロモーター領域が高メチル化にある遺伝子は841遺伝子確認された。これらの遺伝子群について遺伝子オントロジー解析を行ったところ、細胞のストレス応答、細胞分化、免疫系の発生に関連していることが分かった。この結果より、のちにPEを発症する妊婦では、妊娠11-13週時点で絨毛細胞での細胞のストレス応答、細胞分化、免疫系の発生に関連する遺伝子の発現が低下している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子オントロジー解析の結果をみると、本研究により抽出された遺伝子群は妊娠高血圧腎症の病態形成に関与している可能性があり、妊娠高血圧腎症の発症予知への活用の可能性のある分子マーカー候補を抽出できたと考える。

妊娠高血圧腎症は母児に対して重大な影響を及ぼす妊娠合併症の一つである。本研究成果は、周産期医学における課題の一つである「妊娠高血圧腎症の克服」に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a prediction method for the development of preeclampsia(PE) at 11-13 weeks gestation. We extracted DNA from surplus villus tissue collected as chorionic villus sampling and attempted to reveal genes that differ in the methylation status of placental DNA between normal pregnancies and cases that later develop PE. We identified 841 genes whose promoter regions were hypermethylated in early trophoblasts that later developed PE. Gene ontology analysis of these genes revealed that they were associated with cellular stress response, cell differentiation, and immune system development. The results indicate that pregnant women who later develop PE may have decreased expression of genes associated with cellular stress response, cell differentiation, and immune system development in trophoblastic cells at 11-13 weeks gestation.

研究分野：産婦人科

キーワード：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(HDP)は妊婦の2-8%が罹患し(Duley L. Semin Perinatol, 2009)、世界中で76,000人の妊産婦がHDPで死亡しており(FIGO report, 2019)その克服は産科医療にとって最大の課題の一つである。この疾患は環境因子、遺伝因子、免疫因子などによって妊娠初期の胎盤形成期の絨毛細胞の母体脱落膜内への浸潤不全や母体ラセン動脈の血管内皮への置換不全によって胎盤循環不全が持続することが病態と考えられている。我々は妊娠11週に行った絨毛染色体検査時の余剰絨毛を凍結保存し、その後の妊娠経過でHDPの一つである妊娠高血圧腎症(PE)を発症した症例の絨毛と正常に経過した絨毛における遺伝子発現を比較した。その結果、血管増殖関連因子であるFLT-1, Endoglin, VEGFの遺伝子発現が有意に高値を示し、PlGFは逆に低値を示した。また抗酸化因子であるHeme Oxygenase-1, Superoxide dismutaseの発現は低値を示していた(Farina A, Sekizawa A, et al. Prenat Diagn 2008)。ここで認められた遺伝子発現変化は妊娠後期のHDP胎盤で認める変化と同様であり、その後のHDP発症に向けた病態が胎盤循環の開始される妊娠11週の段階で既に形成されていることを示している。このことは、この時期にHDPの発症予知が可能であることを示唆している。

HDPの病態形成に主要な役割を果たしていると考えられているのが絨毛で産生されるFLT-1とEndoglinである。母体血清中でこれらの蛋白濃度を定量することで、HDPの発症予測の可能性が検討されたが、これらの蛋白濃度は発症の5週間前ころから上昇するが、妊娠前半期にはその変化を把握することは難しいことが示された(Levine et al. N Engl J Med 2004)。発症予測については妊娠11-13週の平均動脈圧、子宮動脈 Pulsatility Index(PI)および母体血清PlGF濃度を組み合わせることで、10%偽陽性率水準で妊娠34週末満および37週末満のPEをそれぞれ90%、75%検出可能なことが示されており(ACOG, Obstet Gynecol. 2015)、それが低用量アスピリンを用いた発症予防にも活用され、その有用性が示されている(Rolnik DL, et al. N Engl J Med. 2017)。しかし、この予知法における子宮動脈PI測定は測定者間および測定時期での差も大きく、精度管理が難しいともいえる。

我々は母体血漿中cfDNA/RNAを用いてHDPの発症予知について検討してきた。その中で母体血漿中cfRNAとしてFLT-1, Endoglinなどを妊娠15~20週に定量することで、5%偽陽性水準でその後のPEの84%が検出できることを報告しており(Purwosunu Y, Sekizawa A, et al. Am J Obstet Gynecol. 2009;200:386.e1-7.2008)、蛋白に比して鋭敏なマーカーになることを確認している。このように、母体血漿中cfDNA/RNAを用いる検査は精度管理が可能であり、既存の超音波検査を用いた検査に比べて安定で感度の高い検査が実現できる可能性が高い。さらに、我々はHDPの発症に環境因子の影響があること、妊娠初期の絨毛細胞の機能が浸潤能の旺盛な状態から機能を発揮する状態にダイナミックに変化することから、絨毛細胞にはエピジェネティックな変化が起こっていると検討を行ってきた。その結果、妊娠6週と妊娠11週のDNAメチル化に変化のみられた1,726サイトについて妊娠後期の正常な絨毛とHDPを発症した症例の絨毛でクラスター解析を行ったところ、両者が明確に分離できた。さらに、逆に正常妊娠後期とHDPの絨毛でDNAメチル化に変化のみられた206サイトについても同様にクラスター解析すると妊娠6週と妊娠11週の絨毛が明確に分離された。このことは妊娠6週から11週の間に起こる生理的なDNAメチル化不全が、妊娠後期まで継続することがHDPの病態形成につながると考えられ、そのような変化を妊娠初期から母体血漿中cfDNAの検査で検出することが発症予知につながる可能性がある。また、microRNA(miRNA)もcfRNAと比較して安定性が高いことからその可能性について評価する価値は十分にあると考える。

## 2. 研究の目的

「妊娠初期(11-13週)に妊娠高血圧腎症(PE)の発症を高感度に予測する分子マーカーを確立すること」を目的に本研究を計画した。研究の対象は胎盤絨毛で、妊娠初期にDNAメチル化が進行するCpGサイトのメチル化状態を標的にして、母体血漿中cfDNAを用いた予知の可能性を探索的に検討する。加えて、前述の絨毛穿刺組織を用いてmiRNA発現を検討し、その後のPE発症に関連するmiRNAを抽出し、その母体血漿中cfRNA中の標的miRNAを用いた予知の可能性を探索的に検討する。

## 3. 研究の方法

課題1: 妊娠高血圧腎症(PE)発症予知の分子マーカーとなりうる因子の抽出

凍結保存されている、絨毛染色体検査目的で採取された絨毛組織の余剰組織を検体として用いた。絨毛穿刺後の妊娠経過が母児ともに順調であった症例と、その後にPEを発症した症例の凍結絨毛組織についてReduced-representation bisulfite sequencingにて網羅的メチル化解析を行い、DNAメチル化を比較し、PE発症予知マーカーとなりうる因子を抽出した。また、次世代シーケンサー(NGS)を用いてmiRNAについても比較し、候補因子の抽出を試みる。

課題2: 妊娠11-13週の新たなPE発症予知システムの開発

妊娠 11-13 週での PE 発症予知システムへの応用の可能性を探索する目的で、妊娠 11-13 週の血液検体で、のちに PE を発症した PE 群と非発症群を 1:5 マッチさせて課題 1 で抽出された分子マーカーを定量して比較し、発症予知により可能性の高いマーカーを選別する。上記の分子マーカーの定量で、統計学上で導きだされるリスク値がどの程度の PE 発症予知精度を有するかを検討を行うことで、妊娠 11-13 週の新たな PE 発症予知システムの開発を行う。

#### 4 . 研究成果

課題 1 : 周産期合併症を発症することなく順調に経過し分娩に至った症例 ( 正常群 : n=4 ) と、のちに早発型妊娠高血圧腎症を発症した症例 ( PE 群 : n=2 ) とでメチル化解析の結果を比較し、プロモーター領域の平均メチル化率が 10% 以上差のある遺伝子を抽出した。PE 群においてプロモーター領域が高メチル化にある遺伝子は 841 遺伝子であった。これらの遺伝子群について遺伝子オントロジー解析を行ったところ、細胞のストレス応答、細胞分化、免疫系の発生に関連している遺伝子が含まれていることが分かった。この結果より、今回抽出された遺伝子群は妊娠高血圧腎症の病態形成に関与している可能性があり、妊娠高血圧腎症の発症予知への活用の可能性のある分子マーカー候補を抽出できた可能性はあると考えている。miRNA に関する検討は現在計画中である。

課題 2 : PE 発症予知システムに活用するには、課題 1 で抽出された遺伝子群からさらに「血球系細胞で低メチル化かつ初期絨毛で血球系細胞より高メチル化の遺伝子 ( )」を選別する必要があると考え、初期絨毛のデータには課題 1 での正常群のデータを、血球系細胞のデータには ENCODE プロジェクトのデータを用いて選別作業を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	関沢 明彦  (Sekizawa Akihiko)  (10245839)	昭和大学・医学部・教授   (32622)	
研究分担者	川嶋 章弘  (Kawashima Akihiro)  (10783376)	昭和大学・医学部・講師   (32622)	

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