

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861510

研究課題名(和文) 双胎妊娠からみた絨毛細胞DNAメチル化異常と胎児発育不全についての研究

研究課題名(英文) Alteration of villous DNA methylation associated with fetal growth restriction

研究代表者

竹中 慎 (Takenaka, Shin)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：60515211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：二絨毛膜二羊膜双胎の胎盤絨毛DNAメチル化プロファイルを作成し解析した。1児は正常発育でもう一方の児は胎児発育不全(以下FGR)であった双胎間でDNAメチル化の程度に有意差を認め、かつ2児ともに発育が正常であった双胎間でDNAメチル化の程度に有意差を認めなかったCpG siteは250ヶ所あった。このうち1児は正常発育でもう一方の児はFGRであった2症例で共通の傾向を示したCpG siteは123ヶ所であった。胎盤絨毛細胞における、これらのCpG siteのDNAメチル化異常はFGR発症に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Villous DNA methylation profiles in dichorionic diamniotic twins were analyzed. 123 CpG sites were extracted as CpG site whose DNA methylation status altered in fetus with fetal growth restriction compared with the twin sibling grew up normally and was not significantly different in the twin siblings who both grew up normally. It was suggested that the alteration of villous DNA methylation at the CpG sites extracted in this study were associated with the pathogenesis of fetal growth restriction.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胎児発育 胎盤 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

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・分化の過程で、多くの遺伝子に集中的に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) が報告されている。また、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いる (Placenta, 2005)。

胎児発育不全 (FGR) は児の予後に重大な影響を与える妊娠合併症の一つである。発症の原因となりうる因子は1つではなく、染色体異常・遺伝子疾患・胎盤モザイク・胎盤機能不全・母児感染・母体の喫煙や薬物摂取・多胎妊娠などが挙げられる。しかし、胎盤機能不全といってもその病態は様々であり、胎盤におけるインプリンティング遺伝子の発現異常との関連が報告されるなど、エピジェネティクスの分野からの病態解明が期待されている。

日常臨床で管理している FGR 症例の多くは、児には染色体異常を疑うような奇形を認めず、母体因子も認めない一方、胎盤は平均よりも小さい症例が少なくなく、胎盤形成時の異常による機能不全が原因になると考えられる。

双胎妊娠は FGR の原因の一つであるが、2児とも正常発育児 (AGA) である症例や、1児は AGA でもう一方が FGR の症例も少なくない。この胎児発育の違いの原因が胎盤機能にあるとした場合、二絨毛膜二羊膜双胎の2つの胎盤間の DNA メチル化を比較することで、胎児発育や胎盤形成に影響する DNA メチル化サイト (CpG site) の抽出ができると考えた。さらに、一般的に DNA メチル化の変化に影響する因子の一つとして“環境因子”が挙げられるが、その要因を除外して検討できる点も、双胎妊娠に焦点をあてるメリットであると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

FGR は児の予後に重大な影響を及ぼす病態で、胎盤機能不全がその主要な原因と考えられるが、その病態は不明である。我々はすでに胎盤形成期の絨毛細胞の網羅的エピゲノム比較解析を行い、胎盤の形成・成熟に伴

う生理的なエピゲノム変化を確認している。

今回、二絨毛膜二羊膜双胎の胎盤を用いることで環境因子の影響を排して、2つの胎盤での DNA メチル化プロファイルの違いを検討することで、胎児発育不全に関連する胎盤絨毛の DNA メチル化異常を抽出することを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

破水や陣痛発来の有無、分娩様式と DNA メチル化の状態との相関はさまざまな報告があり、現時点では一定の見解は得られていない。そこでこれらの影響を除外する目的で、未破水かつ未陣痛発来で分娩もしくは妊娠中断目的で昭和大学病院にて帝王切開術施行に至った二絨毛膜二羊膜双胎症例を研究対象とした。

2児とも胎児発育が正常であった3症例 (6胎盤) と、1児は正常発育であったがもう一方の児は胎児発育不全 (FGR) であった2症例 (4胎盤) の胎盤から絨毛組織を採取 (それぞれの児を維持していた胎盤から別々に絨毛組織を採取。よって1妊婦から得られた絨毛組織は2検体。) し、RNA later (QIAGEN) を用いて処理し、-80 で保存した。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。

DNA 抽出には QiAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を、DNA メチル化アレイは Illumina Infinium® Human Methylation450 BeadChip (illumina) を使用した。

(1) 「環境因子の影響を排除して比較することで FGR の発症に関連する DNA メチル化異常を発見する」ために、はじめに、1児は正常発育であったがもう一方の児は FGR であった2症例の DNA メチル化プロファイルをそれぞれの双胎間で比較、解析した。次に、2児とも胎児発育が正常であった3症例の DNA メチル化プロファイルを双胎間で比較し、DNA メチル化の程度に有意差を認めなかった CpG site を抽出した。

(2) 「環境の影響によるものではなく、かつ、胎児発育には影響を及ぼすものではない DNA メチル化変化を明らかにする」ために、2児とも胎児発育が正常であった3症例において双胎間で DNA メチル化プロファイルを比較した。

4. 研究成果

(1) 1児は正常発育であったがもう一方の児は FGR であった2症例の DNA メチル化プロファイルをそれぞれの双胎間で比較した結果、双胎間で DNA メチル化の程度が近似している CpG site と有意差を認める CpG

site が存在することが確認された。

1 児は正常発育であったがもう一方の児は FGR であった双胎間で DNA メチル化の程度に有意差があった CpG site 群から、2 児ともに胎児発育が正常であった 3 症例では双胎間で DNA メチル化の程度に有意差を認めなかった CpG site のみを抽出した結果、250 ケ所の CpG site が抽出された。

このうち、1 児は正常発育でもう一方の児は FGR であった 2 症例のいずれにおいても、FGR 児のほうが正常発育児と比較し DNA メチル化が高かった (β 値の差が 0.2 以上を有意と設定) CpG site は 51 sites であった。抽出された CpG site が遺伝子発現に關与している遺伝子群 (51 遺伝子) には、胎盤発育への關与が示唆されている CSF1 (colony stimulating factor 1) 細胞粘着や細胞遊走との關連が示唆されている ADAM7 (ADAM metalloproteinase domain 7) などが含まれていた。

一方、FGR 児のほうが正常発育児と比較し DNA メチル化が低かった (β 値の差が 0.2 以上を有意と設定) CpG site は 72 sites であった。抽出された CpG site が遺伝子発現に關与している遺伝子群 (72 遺伝子) には、tumor suppressor の働きを有するとの報告のある DUSP26 (dual specificity phosphatase 26) などが含まれていた。

今回抽出された 123 の CpG site の絨毛 DNA メチル化異常は、胎児発育不全の発症に關連している可能性が示唆された。

(2) 2 児ともに胎児発育が正常であった 3 症例において双胎間で DNA メチル化プロファイルを比較した結果、DNA メチル化の程度が近似している CpG site が多く確認されたが、有意差を認める CpG site も存在した。

3 症例のうち、少なくとも 1 症例で双胎間に DNA メチル化の程度に差を認めた (β 値の差が 0.2 以上を有意と設定) CpG site は 9,890 sites 存在した。

これらの CpG site の絨毛 DNA メチル化変化は、環境の影響によるものではなく、かつ、胎児発育に影響を及ぼすものではないと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

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

(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

小出 馨子 (KOIDE Keiko)
昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90384437

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