

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461647

研究課題名(和文) 常位胎盤早期剥離の出生前診断に向けた胎盤組織のマイクロアレイ・SNP解析の応用

研究課題名(英文) Methylation and SNP analysis for prediction of placental abruption

研究代表者

小川 正樹 (Ogawa, Masaki)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50312707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：常位胎盤早期剥離を来した胎盤組織を用いて検討した。1) MMP-1遺伝子のメチル化率に関する検討ではMMP-1遺伝子promoter領域のメチル化率に有意差は認められなかった。2) ゲノムワイドな網羅的メチル化解析では、疾患群でメチル化率に有意な差を認める遺伝子が複数、同定された。3) ゲノムワイドな網羅的SNP解析において疾患群に特異的なSNPは同定されなかった。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide methylation and SNP analysis was carried out to prediction of placental abruption. Placental DNA from abruption was assayed, and then some specific methylated genes were identified, however, any SNP detected abruption was not identified. In placental abruption, gene methylation in placental DNA has been responsible for its onset.

研究分野：周産期医学

キーワード：常位胎盤早期剥離 メチル化 SNP 周産期死亡

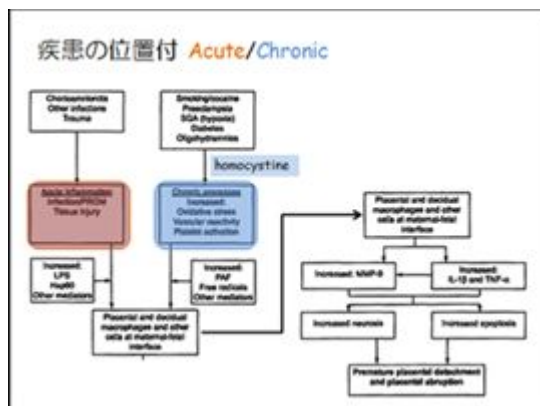
1. 研究開始当初の背景

常位胎盤早期剥離は、胎盤絨毛と子宮脱落膜との接着が、何らかの要因で破綻することで発症する。前置胎盤でも同様の機序により胎盤が剥離することが知られており、この場合警告出血などの症状を来すとされる。現在では両疾患を包括して placental separation syndrome と捉える傾向にあり、病理学的には同様の機序であると考えられている。しかし、外出血が主体である前置胎盤と内出血が主体の常位胎盤早期剥離では、表現型に大きな差異を生じる。特に常位胎盤早期剥離は、母体に対する影響よりも、出産児への影響が重篤で、本邦の周産期死亡の3割を占めている。

我々は、これまで、日本産科婦人科学会の周産期データベースを用いて常位胎盤早期剥離についての多症例数の後方視的な検討を行い、以下の疫学的事項を明らかにした。すなわち、**発症後1時間以内での娩出により児の救命が期待できる、超音波断層法検査などの画像診断は本症の早期診断ツールとしての有用性が低い、母体の妊娠高血圧症候群や切迫早産などの胎盤を取り巻く環境要因が本症発症の有意な危険因子である**、などである (Matsuda Y, Ogawa M, et al. BMC pregnancy and childbirth. 2013)。

このことから、リスク因子を有する患者に対する、より早期の診断と介入が周産期予後の改善に必須であると推定されている。

Ananth CV らの疫学的検討では、本症は、切迫流早産を背景に妊娠中期に発症する急性発症型(acute onset)と、妊娠高血圧症候群を背景に妊娠後期に発症する慢性発症型(chronic onset)の2群に大別される。前者は感染等の炎症が主体で、後者は細血管の内皮における変化が主体である。いずれの機序においてもサイトカインが誘導され、タンパク分解酵素であるマトリックス・メタロ・プロテアーゼ活性が亢進することにより、常位胎盤早期剥離が発症すると考えられている(下図参照)。



一方、遺伝子には組織や臓器によりその修飾程度を変化させるエピジェネティックな制御機構が存在し、臓器特異性や組織特異性

をもたらししていることがわかってきた。妊娠中の卵膜に関してもその部位(羊膜、絨毛膜)あるいは妊娠週数や早産などの病的状況では遺伝子の修飾程度は異なることが指摘されている。

申請者は、同一患者から採取された**羊膜と絨毛膜の MMP-1 遺伝子 promoter 領域の CpG 部位のメチル化の検討を行い、一部のメチル化がこの二つの組織で大きく異なる**ことを証明している(Hum Mol Genet 2008)。

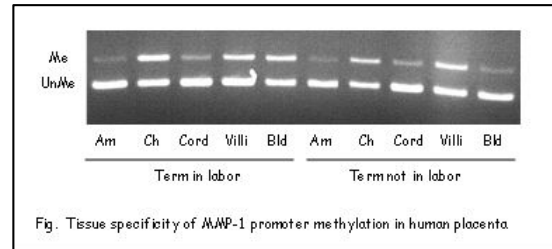


Fig. Tissue specificity of MMP-1 promoter methylation in human placenta

上図は、陣痛開始前と開始後の産婦より得られた胎盤組織において、MMP-1 遺伝子 promoter 領域の約-1300bp に位置する CpG 部位のメチル化の程度を、申請者が開発した COBRA 変法により解析した結果を示している。Lane1 および 6 の羊膜 MMPI と、Lane2・7 の絨毛膜 MMP-1 のメチル化は明らかに異なっている事が示されている。その他の臍帯 (Lane3・8) および絨毛組織 (Lane4・9) 血液 (Lane5・10) においても同様に組織特異性が認められている。これらの結果より、胎盤絨毛では、他の遺伝子でも、妊娠週数や環境によりメチル化パターンは大きく変化することが推定される。

この結果、常胎盤早期剥離の発症原因となるタンパク分解酵素活性は異なると予想され、組織の反応も大きく異なる、と考えられる。

さらに、常位胎盤早期剥離では、胎児が男児である場合に女児である場合の1.2倍の頻度で発症する疫学的な事実があり、本症発症における男性胎児由来のY染色体の関与、またはX染色体の不活化の関与が指摘されている。この遺伝的な関与を明らかにする目的でY染色体上の遺伝子発現程度を明らかにすること、およびX染色体の不活化パターンとその発症との関連について明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

常位胎盤早期剥離は、遺伝学的要因と環境要因の双方が共同して発症に関わることが知られている。臨床的に本症は、周産期死亡の主要な原因を占め、母児ともに重篤な状態を来すことから、周産期医学上の解決すべき喫緊の課題の一つである。疫学的な検討により本症は、早期に診断し早期の介入を行う事で、児の intact survival が得られることが判明している。したがって、リスク因子を有す

る患者を適切な管理下に置き、早期介入を図ることが得策である。

本研究は、本症発症のリスク因子を、遺伝学およびエピジェネティック因子にもとめ明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

遺伝学的な要因である SNP については、次世代シーケンサーを用いた SNP マイクロアレイを行う。特に、胎盤が剥離する直前の共通カスケードであるコラーゲン分解酵素である MMP-1、MMP-8、MMP-9、HSP47 などの蛋白分解酵素を解析主体とした絨毛膜での SNP アレイを行う。また Y 染色体上の 10 数個の既報の遺伝子発現をマイクロアレイで解析する。さらに、エピジェネティックな制御が行われているかを明らかにする目的で、母体由来の上記各遺伝子の promoter 領域 CpG 部位におけるメチル化の程度と SNP アレルを明らかにする。また X 染色体不活化パターンと発症との関連をエピジェネティックな解析を通じて明らかにする。

以上の検討は、すべて常位胎盤早期剥離を発症した胎盤を用いて検討する。また病理学的に同様の発症機序を有している警告出血を伴った前置胎盤症例の胎盤も検討する。コントロールとして、正常胎盤付着を示した陣痛発来以前の選択的帝王切開分娩症例での胎盤とする。

実際には、1)常位胎盤早期剥離症例の胎盤を用いて、絨毛の候補遺伝子の SNP マイクロアレイを行うこと、2)コラーゲン分解酵素遺伝子の promoter 領域 CpG 部位のメチル化程度を解析すること、3)同遺伝子 promoter 領域における特異的 SNP アレルの型分類解析を行うこと、を通じて、遺伝学およびエピジェネティック的要因を明らかにするものである。

4. 研究成果

常位胎盤早期剥離を来した 10 症例より胎盤組織を収集した。またコントロール胎盤として、早産に至った症例、正期産で出産した症例など約 200 症例より胎盤を収集した。

1) MMP-1 遺伝子のメチル化率に関する検討

MMP-1 遺伝子を主に検討した。1)特定領域の詳細分析としては、収集した胎盤組織の絨毛組織より抽出した DNA を用いて MMP-1 遺伝子 promoter 領域の -1299CpG 部位および -930CpG 部位のメチル化を COBRA 変法による解析した。その結果、分娩週数をマッチさせた集団群では、各部位のメチル化率に有意差は認められなかった。

2) ゲノムワイドな網羅的メチル化解析

常位胎盤早期剥離の疾患群 5 例と、週数をマッチさせたコントロール群 5 例の DNA においてビーズアレイ解析を行った。結果、2 群間でメチル化率に有意な差を認める遺伝子が複数、同定された。

3) ゲノムワイドな網羅的 SNP 解析

常位胎盤早期剥離の疾患群 5 例と、週数をマッチさせたコントロール群 5 例の DNA において網羅的 SNP 解析を行った。結果、疾患群に特異的な SNP は同定されなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1) Ogawa M, Matsuda Y, Nakai A, Hayashi M, Sato S, Matsubara S: Standard curves of placental weight and fetal/placental weight ratio in Japanese population: difference according to the delivery mode, fetal sex, or maternal parity. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016 Nov;206:225-231. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.09.004. Epub 2016 Oct 5.

2) Tsuchiyama F, Ogawa M, Konno J, Matsuda Y, Matsui H: Effects of Fetal Gender on occurrence of Placental Abruption. EC Gynaecology 2016;2(3): 208-212.

3) Ogawa M, Matsuda Y, Konno J, Mitani M, Matsui H: Preterm placental abruption: Tocolytic therapy regarded as a poor neonatal prognostic factor. Clin Obstet Gynecol Reprod Med 2015 Jun;1(1). doi: 10.15761/COGRM.1000107

[学会発表](計 2 件)

1) 金野潤, 小川正樹, 三谷穰, 牧野康男, 松井英雄: 常位胎盤早期剥離の発症における網羅的 methylation 解析 第 68 回日本産科婦人科学会(東京) 2016 年 4 月 24 日

2) 金野潤, 小川正樹, 三谷穰, 牧野康男, 松井英雄: 常位胎盤早期剥離絨毛における matrix metalloproteinase-1 遺伝子 CpG メチル化率に関する検討 第 67 回日本産科婦人科学会(横浜) 2015 年 4 月 12 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 正樹 (Ogawa, Masaki)

東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：50312707

(2)研究分担者

松井 英雄 (Matsui, Hideo)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：70190395

金野 潤 (Konno, Jun)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：80722652