

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462501

研究課題名(和文) 妊娠初期の胎盤形成に伴う絨毛細胞のDNAメチル化異常と胎盤機能異常に関する研究

研究課題名(英文) The alterations of villous DNA methylation in first trimester associated with the pathogenesis of preeclampsia

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠6週と妊娠10-11週、妊娠後半、PIH発症後の絨毛についてDNAメチル化プロファイルを作成し、比較した。その結果、6週と10-11週でメチル化変化するプロモーターを含む遺伝子領域について、妊娠後半、PIH発症後の絨毛での解析結果をクラスター解析を行ったところ、両者が明瞭に分離することから、妊娠初期の絨毛に起こるDNAメチル化不全が、その後のPIHの病態形成につながっていることを確認した。その上で、喫煙に注目して検討を行った。喫煙者と非喫煙者の初期絨毛における血管新生因子及びアポトーシス関連因子の遺伝子発現を検討したところ、PIGFとHIF1Aの遺伝子発現が有意に高値を示すことを確認した。

研究成果の概要(英文)：We investigated placental DNA methylation in preeclampsia (PE) compared with normal case to understand epigenetic pathogenesis of PE. Placental DNA methylation profiles in 6 weeks, 10-11 weeks, normal cases at third trimester, and cases with PE were made, and they were compared among the groups. In the present study, we targeted CpG sites located on promoters. In comparison of DNA methylation profiles, 246 CpG sites on promoters were detected as the CpG sites that were differentially methylated in PE compared with normal third trimester. The cluster analysis for all samples was done using the 246 CpG sites. We confirmed that not only normal third trimester and PE, but also 6 weeks and 10-11 weeks were classified accurately. DNA methylation pattern physiologically changes in the villous trophoblasts during the placentation. The insufficiency of placental formation and function leads to the onset of preeclampsia when the change is not sufficient in the villi in early gestation.

研究分野：周産期学

キーワード：妊娠高血圧症候群 妊娠絨毛 DNAメチル化

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報告は我々の知る限り存在しない。

一方、二分脊椎などの先天奇形との関与がいられている葉酸は、DNA メチル化に必須の栄養素 (DNA のメチル化基質) であるが、妊娠合併症発症との関与については肯定的な報告がある一方で否定的な報告もあり、一定の結論は出ていない。また、DNA メチル化と酸化ストレスの関与を示唆する論文報告があるが、妊娠合併症である妊娠高血圧症候群 (PIH) の抗酸化剤による発症予防効果については否定的な報告が多くある一方、肯定的な報告も出されている。

我々は、胎盤形成期の遺伝子発現異常が PIH 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 PIH 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 PIH を発症する症例では、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 PIH を発症する胎盤で観察されるものと同じ変化が既に妊娠 11 週の絨毛細胞に生じていることを示しており、PIH の病態が妊娠 11 週の段階

で既に形成されていることを直接示するものである (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 PIH の発症予防ができるかのランダム化比較試験を行った。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 PIH 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の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)。

以上の知見から、これらの生理的な変化が種々の組織の形成に必須のエピジェネティックなメカニズムと関連していると考えた。

2. 研究の目的

DNA メチル化に代表されるエピジェネティクスは、遺伝子発現を調節し、種々の組織の分化や形成を誘導している。しかし

ヒト胎盤の形成過程における DNA メチル化についてはほとんど研究されていない。そこで、妊娠初期の胎盤形成期の DNA メチル化の正常パターンを把握し、その異常が胎盤機能異常の原因となり、妊娠高血圧症候群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、絨毛細胞の妊娠過程に伴う 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、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要因を検討するとともに、新たな発症予知法および予防法についての基礎的な検討を行う。

3. 研究の方法

妊娠初期の胎盤形成期の絨毛細胞、および PIH 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、PIH 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、PIH 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、パイロシークエ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。さらに、DNA メチル化基質の葉酸や抗酸化剤を *in vitro*、*in vivo* に負荷し、DNA メチル化や遺伝子発現への影響をみることで PIH の発症予防への可能性を検討する。

次に、DNA メチル化に影響すると考えられる環境因子の中で、喫煙は PIH の発症に予防的な効果を示すことが知られている。そこで、喫煙に注目して、妊娠初期の喫煙の DNA メチル化への影響を明らかにする。

4. 研究成果

胎児が生存している状態で妊娠中絶を行った症例から絨毛組織を採取した。妊娠 6 週と 11 週で 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、PIH を発症した症例の胎盤と正常に妊娠経過した症例の胎盤でも 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、抽出した CpG サイトについて妊娠 6 週と 11 週のサンプルでもクラスター解析を行ったところ、それらのメチル化状態の変化が妊娠 6 週と 11 週での生理的な変化と一致した。このことは、胎盤形成期の胎盤メチル化における生理的な変化における異常(生理的な変化が起こらないこと)が、胎盤のその後の機能異常の原因になることをエピゲノム変化として初めて確認したことになると同時に、この変化が妊娠 6 週から 11 週の間に行われていることを確認した。

次に、メチレーションに影響の大きい環境因子、喫煙に注目して検討を行った。喫煙者と非喫煙者の胎盤形成期(妊娠 6-8 週)の初期絨毛における血管新生因子及びアポトーシス関連の遺伝子発現への影響について検討したところ、PlGF と HIF1A の遺伝子発現が有意に高値を示すことを確認した。また、その絨毛細胞を培養したところ、酸素濃度の変化により非喫煙者と喫煙者より採取した絨毛で、血管新生因子の遺伝子発現が異なることを確認し、喫煙が妊娠初期の絨毛のエピゲノム変化を介していることを示唆する結果であった。次に、妊娠初期絨毛の初代培養系を作成し、酸素濃度 2% (妊娠 8 週頃の絨毛の酸素濃度) から酸素濃度 8% (妊娠 10-12 週頃の絨毛の酸素濃度) に変化させる実験系を用いて、活性酸素種に対するスカベンジャーとしてビタミン C を添加する検討を行った。急激な酸化ストレスはアポトーシスの誘

導することが知られており、ビタミン C の投与により培養液中の活性酸素種は有意に減少することを電子スピン法で立証した。その上で、ビタミン C が妊娠初期絨毛細胞において生理的低酸素条件ではアポトーシス遺伝子を誘導し、酸素濃度上昇による酸化ストレスに対しては抗アポトーシス遺伝子を誘導することを明らかにした。

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4件)

1. Kawashima A, Koide K, Hasegawa J, Arakaki T, Takenaka S, Maruyama D, Matsuoka R, Sekizawa A. Maternal Smoking History Enhances the Expression of Placental Growth Factor in Invasive Trophoblasts at Early Gestation Despite Cessation of Smoking. PLoS One. 査読有 10(7): 2015 ;e0134181. doi: 10.1371/journal.pone.0134181.
2. Kawashima A, Sekizawa A, Koide K, Hasegawa J, Satoh K, Arakaki T, Takenaka S, Matsuoka R. Vitamin C Induces the Reduction of Oxidative Stress and Paradoxically Stimulates the Apoptotic Gene Expression in Extravillous Trophoblasts Derived From First-Trimester Tissue. Reprod Sci. 査読有 22(7): 2015 ;783-90. doi: 10.1177/1933719114561561.
3. Takenaka S, Ventura W, Sterrantino AF, Kawashima A, Koide K, Hori K, Farina A, Sekizawa A. Prediction of Fetal Growth Restriction by Analyzing the Messenger RNAs of Angiogenic Factor in the

Plasma of Pregnant Women. Reprod Sci. 査読有 22(6): 2015;743-9. doi:10.1177/1933719114557895.

4. Kawashima A, Koide K, Ventura W, Hori K, Takenaka S, Maruyama D, Matsuoka R, Ichizuka K, Sekizawa A. Effects of maternal smoking on the placental expression of genes related to angiogenesis and apoptosis during the first trimester. PLoS One. 査読有 9(8): 2014;e106140. doi: 10.1371/journal.pone.0106140.

[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

関沢 明彦 (Akihiko Sekizawa)

昭和大学医学部(教授)

研究者番号: 10245839

(2)研究分担者

小出馨子(Keiko Koide)

昭和大学医学部（講師）

研究者番号： 90384437

四元 淳子(Junko Yotsumoto)

お茶の水女子大学基幹研究院（助教）

研究者番号： 30553648

(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

川嶋章弘 (Akihiro Kawashima)

昭和大学医学部（助教）

竹中 慎 (Shin Takenaka)

昭和大学医学部（助教）