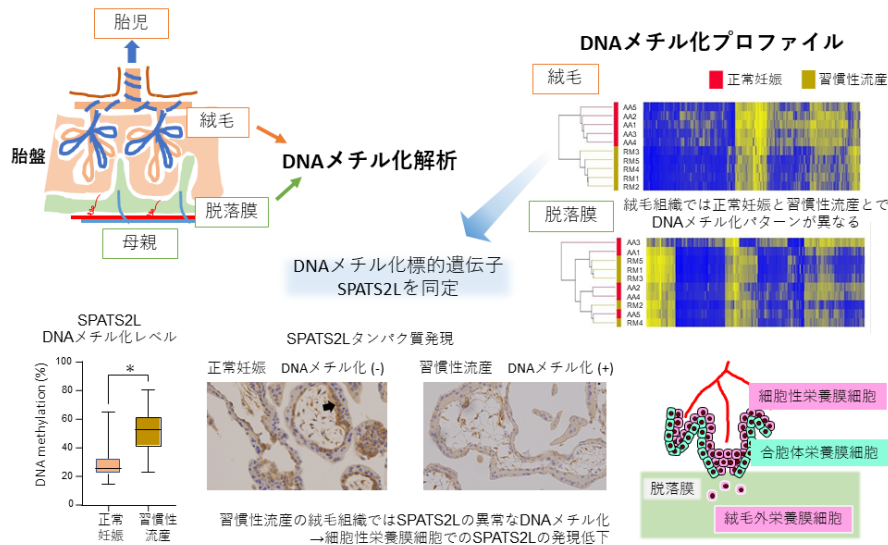


原因不明習慣流産患者の絨毛のDNAメチル化プロファイルにおける
正常妊娠との違いの解明
— 習慣性流産と関連する新たな現象を発見！ —



原因不明習慣流産患者の絨毛の DNA メチル化プロファイルにおける
正常妊娠との違いの解明
— 習慣性流産と関連する新たな現象を発見！ —

名古屋大学大学院医学系研究科・腫瘍生物学分野の近藤豊（こんどう ゆたか）教授、新城恵子（しんじょう けいこ）講師、名古屋市立大学大学院医学研究科・産科婦人科学分野の杉浦真弓（すぎうら まゆみ）教授、松本洋介（まつもと ようすけ）病院助教（筆頭著者）らの研究グループは原因不明習慣流産患者の絨毛^{※1}の DNA メチル化^{※2}プロファイルは、正常妊娠と異なっていることを発見しました。

習慣流産は3回以上連続する流産であり、その頻度は1.1%とされています。少子化の現代において、習慣流産の原因究明とその予防は喫緊の課題です。本研究ではエピジェネティクス^{※2}の観点から、胎盤組織において絨毛（胎児由来）と脱着膜^{※3}（母体由来）を同時に、網羅的にDNAメチル化解析を行いました。

まず階層型クラスター分析を行い、脱着膜ではなく絨毛において、習慣流産群と正常妊娠群でDNAメチル化プロファイル（様式）が異なっていることがわかりました。習慣流産群と正常妊娠群でDNAメチル化の異なる代表的な遺伝子としてSPATS2Lを同定し、習慣流産群の絨毛においてmRNAの発現とタンパク質の発現が低下していることを発見しました。また、SPATS2Lを人為的に抑制（ノックダウン）すると、細胞性栄養膜細胞の浸潤能・遊走能が低下し、胚の正常な発育が阻害されることが示唆されました。これらのことから、習慣流産の原因の一つとして、エピゲノム^{※2}異常が存在する可能性が示唆されました。今回の対象となった習慣流産患者5人全員がその後に生児獲得できていることから、従来原因不明と説明していた患者に、研究的にはエピゲノム異常による流産が存在し、その場合は次回妊娠において生児獲得が期待できると説明できます。

本研究は、JSPS 科研費（19K18701、20K20598、20H03511）、文部科学省共同利用・共同研究拠点 Distinctive Joint Research Center Program（JPMXP0621467963）のサポートのもとでおこなわれたもので、英科学誌「Scientific Reports」（2022年7月27日付（英国時間 午前10時））に掲載されました。

ポイント

- DNA メチル化は遺伝子の発現を調節する DNA の化学修飾で、正常な発生を進める上で不可欠です。
- 習慣流産は 3 回以上連続する流産であり、その頻度は 1.1% です。これまでは絨毛（胎児）染色体検査を含め種々の精査を行っても、約 25% の症例で原因は不明のままでした。
- 私たちは原因不明習慣流産患者の流産時に採取した絨毛（胎児由来）と、脱落膜（母体由来）を全ゲノムで DNA メチル化解析し、脱落膜（母体由来）ではなく、絨毛（胎児由来）において DNA メチル化様式が習慣流産群で、正常妊娠群とは異なっていることを発見しました。
- 習慣流産群と正常妊娠群で DNA メチル化の異なる代表的な遺伝子として SPATS2L を同定しました。さらに習慣流産群の絨毛の細胞性栄養膜細胞では、SPATS2L タンパク質の発現が低下していることを発見しました。また SPATS2L を人為的に抑制すると、栄養膜細胞の浸潤能・遊走能が低下することを発見し、胚の正常な発育が阻害されることが示唆されました。
- 習慣流産の原因となりうる一つの因子として、絨毛の DNA メチル化異常が示唆されました。これまで原因不明と説明していた患者に、研究的にはエピゲノム異常による流産が存在し、研究対象の習慣流産患者 5 人全員がその後生児獲得できていることから、その場合は次回妊娠での生児獲得の期待値が高いと説明できます。

1. 背景

習慣流産は 3 回以上連続する流産と定義されており、その頻度は 1.1% です。その原因には、抗リン脂質抗体症候群（自己免疫疾患）、先天子宮異常、カップルの染色体異常、胎児（絨毛）染色体異数性がありますが、25% は原因が明らかではありません。流産を何度も繰り返すことは非常に辛い経験であり、少子化の現代で習慣流産の原因究明とその予防は喫緊の課題です。胚発生において、受精が成立後早期の段階でエピジェネティック・リプログラミングと呼ばれるダイナミックな DNA メチル化の変化が起こり、種々の組織へ分化・成長していくことがわかっています。近年、このエピジェネティクスに着目し習慣流産の原因を究明しようとした研究が散見されますが、胎児由来である絨毛と、母体由来である脱落膜を同時に解析した研究はありません。今回私たちは、胎児要因と母体要因のどちらがより大きな影響を及ぼすか調べるために、習慣流産患者の流産時に絨毛と脱落膜を採取し、同時に網羅的な DNA メチル化解析を行いました。

2. 研究成果

対象として習慣流産患者 5 名、コントロールとして人工妊娠中絶女性（正常妊娠）5 名を抽出し、胎盤組織を胎児由来である絨毛と、母体由来である脱落膜とに分け、網羅的な DNA メチル化を解析しました。習慣流産群とコントロール群で DNA メチル化率に差のあった遺伝子のプローブを抽出し、階層型クラスター分析を行ったところ、絨毛では 2 群間できれいにクラスターが分かれたのに対し、脱落膜ではクラスターが分かれず 2 群間の症例が入り交じっていました（図 1）。

そこで、2 群間でメチル化率の差が大きい遺伝子を抽出し、症例数を各群 19 例に増やして個別領域の DNA メチル化を解析しました。SPATS2L を代表とする 3 つの遺伝子のエンハンサー^{※4}領域において、2 群間で有意に DNA メチル化率が異なっていました。SPATS2L の DNA メチル化

率は驚くべきことに妊娠週数と相関していました（図 2）。

図1 絨毛と脱着膜のDNAメチル化プロファイル

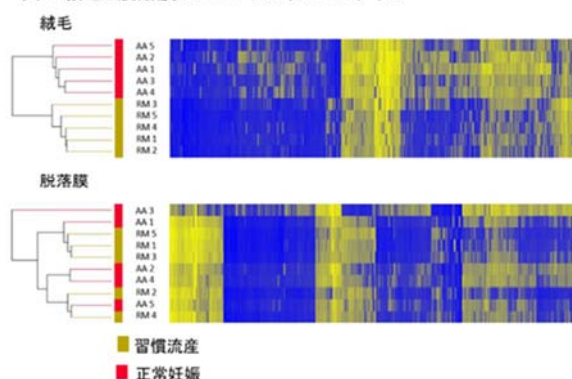
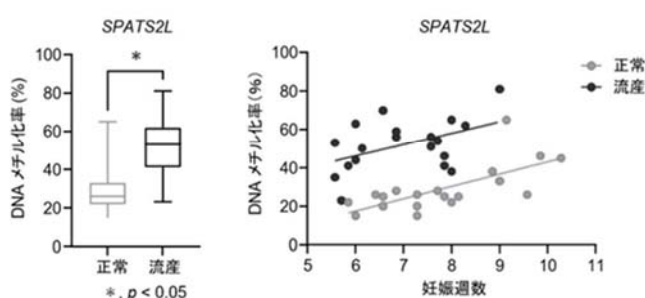


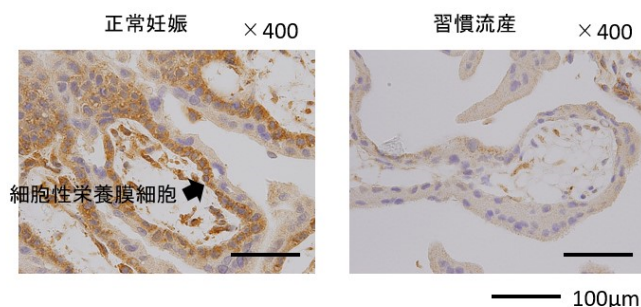
図2 パイロシーケンス法によるSPATS2LのDNAメチル化解析



次に、絨毛組織で SPATS2L の免疫染色を行いました。2 層構造を取る絨毛膜の内側を構成する、細胞性栄養膜細胞の細胞質において、習慣流産群で SPATS2L 蛋白の発現が低下していることを発見しました。（図 3）

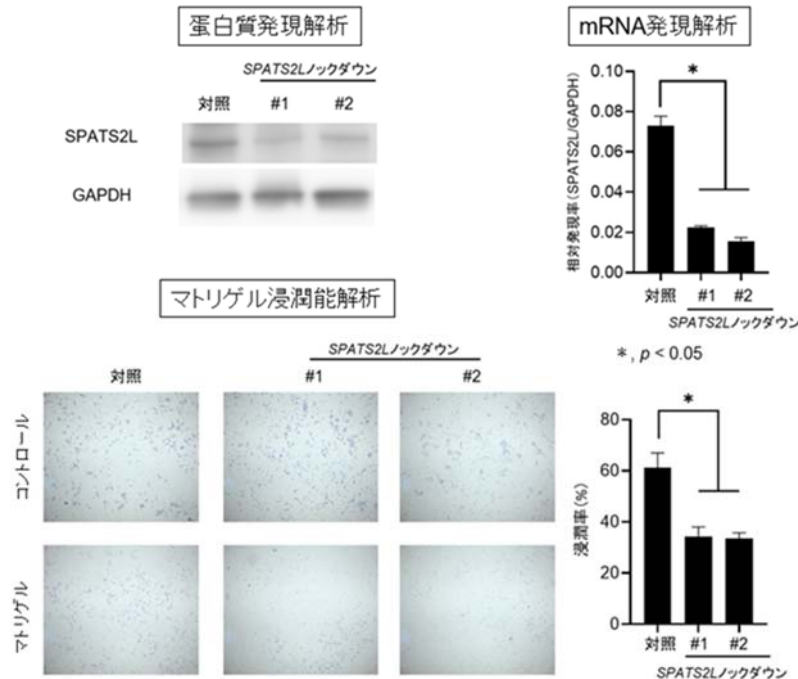
さらに、栄養膜細胞の細胞株を用いて SPATS2L をノックダウンしたところ、その浸潤能、遊走能が低下しました。SPATS2L タンパク質の発現低下により、胚の正常な発育が阻害される可能性が示唆されました（図 4）。

図3 絨毛におけるSPATS2Lの免疫染色



本研究は、原因不明習慣流産患者の脱着膜ではなく絨毛において、DNA メチル化プロファイルが正常妊娠群と異なっていることを世界で初めて発見しました。SPATS2L の DNA メチル化異常だけで流産の原因になるとは断定できないものの、複数の遺伝子の DNA メチル化異常が重なることで、結果として流産が起こりうることを示唆されました。今回、網羅的に DNA メチル化を解析した 5 例の習慣流産患者は、全員その後の妊娠で最終的に生児を獲得できています。これにより、従来原因不明と説明していた習慣流産患者に、研究的にはエピゲノム異常で流産となる症例が存在し、その場合は後の生児獲得の期待値が高いことを説明できるようになります。このことは、精神的苦痛を数多く経験している習慣流産患者にとって、大きな精神的な支えになることが期待されます。

図4 絨毛外栄養膜細胞のSPATS2Lノックダウン



3. 今後の展開

近年、特定の SNP と DNA メチル化異常との関連が指摘されており、習慣流産患者の症例数を増やして SNP 多型解析を行い、SPATS2L のメチル化率と多型との関連があるか検討する予定です。

4. 用語説明

※1 絨毛

胎児の付属物である胎盤を構成する組織で、妊娠初期では細胞性栄養膜細胞と合胞体栄養膜細胞の2層構造となっています。胚の着床の時期に脱落膜に侵入し、母体血が流入して母体と胎児間の栄養交換の場所となります。

※2 DNA メチル化、エピジェネティクス、エピゲノム

DNA の塩基配列を変えずに、遺伝子の発現を調節する仕組みをエピジェネティクスといいます。

発現する遺伝子をコントロールする機序として、DNA メチル化（DNA の化学修飾）や、DNA が巻き付いているヒストンタンパク質の化学修飾などがあり、これらの修飾を総称してエピゲノムと呼びます。

※3 脱落膜

脱落膜は、妊娠の成立に伴い変化し、妊娠の終結に伴い胎盤とともに剥脱する子宮内膜組織の一部と定義されます。子宮内膜間質細胞が胚の着床に伴い形態学的および機能的に分化をする過程を脱落膜化といい、この分化過程は絨毛細胞の浸潤の制御、さらには胎盤形成に重要な役割を果たしています。

※4 エンハンサー

特定の遺伝子の発現量を増加させる作用を持つ DNA 領域のこと。遺伝子本体から遠く離れた場所にも存在することがあり、エンハンサーに転写因子が結合することで遺伝子の発現を促します。

5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Scientific Reports

論文タイトル : Characteristic DNA methylation profiles of chorionic villi in recurrent miscarriage

著者 :

Yosuke Matsumoto¹, Keiko Shinjo², Shoko Mase¹, Masaki Fukuyo³, Kosuke Aoki⁴,
Fumiko Ozawa¹, Hiroyuki Yoshihara¹, Shinobu Goto¹, Tamao Kitaori¹, Yasuhiko Ozaki¹,
Satoru Takahashi⁵, Atsushi Kaneda³, Mayumi Sugiura-Ogasawara¹ & Yutaka Kondo²

所属名 :

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, Japan.
2. Division of Cancer Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan.
3. Department of Molecular Oncology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670, Japan.
4. Department of Neurosurgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan.
5. Department of Experimental Pathology and Tumor Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, Japan.

DOI : 10.1038/s41598-022-15656-y

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Sci_220728en.pdf