

令和元年6月11日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10676

研究課題名(和文) 癒着胎盤に関連するmRNA/microRNAの同定と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Relationship between placenta accreta and mRNA/micro RNA

研究代表者

吉田 敦 (YOSHIDA, Atsushi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：50432977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1)妊娠初期の時点で癒着胎盤のリスクを推定するために、妊娠初期の母体血に流入している胎盤特異的mRNA/miRNAを網羅的に同定した。2)前置胎盤症例の妊娠中の超音波検査および術中超音波検査の所見から、子宮摘出を要するような胎盤剥離困難な重度の癒着胎盤の可能性を否定することが可能になった。症例数の不足により、癒着胎盤と関連胎盤特異的mRNA/miRNAを同定することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠初期の時点から分子マーカーを用いて癒着胎盤のリスクをスクリーニングし、妊娠16週以降の超音波検査で癒着胎盤の程度を評価するという新たなアプローチを前方視的に検証することを目的としたが、症例数に限りがあり今回は検討できなかった。今後研究を継続して症例を追加することで、癒着胎盤の非侵襲的な妊婦検診法として受け入れられやすく、将来の臨床応用が十分に期待できる。

研究成果の概要(英文)：1) In order to estimate the risk of placenta accreta at early pregnancy, we comprehensively identified placenta-specific genes flowing into maternal blood at early pregnancy. 2) The findings of intraoperative ultrasonography have made it possible to deny the possibility of adherent placenta that is difficult to remove.

研究分野：周産期学

キーワード：癒着胎盤 術中超音波 胎盤特異的mRNA/miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

・**癒着胎盤における術前評価の重要性**:癒着胎盤は脱落膜の欠如により絨毛が子宮筋層へ侵入した状態であり、分娩時に胎盤剥離が困難な場合あるいは出血のコントロールが不可能な状況下では子宮摘出も考慮される。とくに、前置胎盤を認める妊婦は常に癒着胎盤のリスクを伴っているため、超音波やMRI検査などの画像診断を用いて癒着胎盤を出生前に診断する試みがなされているが、そのリスク予測については困難な状況にある。私どもの検討でも、超音波所見で癒着胎盤と推定したもののうち約半数は胎盤剥離と子宮の温存が可能であった。つまり、母体・胎児にとって極めて重篤な合併症であるにも関わらず、子宮を摘出するような癒着胎盤の有無は分娩時に初めて診断されている現状がある。すなわち、癒着胎盤の有無を推定するマーカーの同定とその臨床応用は、産科領域における最重要課題の一つと考えられる。これまで母体血清中の cell-free DNA などの biological factor がその候補として注目されたが、いずれも有用性が証明されたとはいいがたい。前置胎盤に伴う癒着胎盤のリスクに対する十分な術前準備を可能にするため、癒着胎盤の有無を推定しうる分子マーカーが望まれている。

・**癒着胎盤の分子マーカーに関する知見**:母体血漿中には胎盤由来の cell-free mRNA が流入していることが明らかになった。これらは母体を通じて得られる胎盤の分子情報であることから、妊娠高血圧症候群、癒着胎盤など胎盤の異常で発症する産科合併症の分子マーカーになると期待されている (Lo et al. Nature Rev Genet. 2007)。私どもの研究でも、穿通胎盤の症例における血漿中 cell-free hCG mRNA および cell-free hPL mRNA を定量化することにより、MTX療法に対する cytotrophoblast および syncytiotrophoblast それぞれの細胞効果をリアルタイムにモニターしうることを見出した (Masuzaki H et al. Clinical Chemistry 2005)。すなわち、母体血漿中における胎盤由来 cell-free mRNA 流入量は、胎盤における細胞活性を反映している可能性が示唆された。また、妊娠 29-32 週の母体血漿中における cell-free hPL mRNA 流入量の上昇と前置胎盤との関連を検討したところ、子宮摘出が必要であった前置胎盤症例における cell-free hPL mRNA 流入量は、子宮を温存することが可能であった前置胎盤症例におけるそれと比較して有意に上昇していた (Prenatal Diagnosis 2008)。前者はいずれも組織学的に穿通胎盤あるいは嵌入胎盤と診断された。すなわち、胎盤由来 cell-free mRNA には子宮摘出を必要とするような癒着胎盤を予測する分子マーカーとしての可能性が見出された。

・**cell-free 胎盤特異的 microRNA に関する知見**:私どもは、妊娠に関連する胎盤特異的 microRNA を同定し (Miura K Clin Chem 2010)、胎児発育不全や全胎状奇胎など妊娠に関連した疾患の分子マーカーとして応用可能であることを報告した (Higashijima et al. Prenat Diagn 2013, Hasegawa et al. Clin Chem 2013, Miura K et al. Prenat Diagn 2014)。また、それら胎盤特異的 microRNA 流入量が、陣痛や胎盤重量などと関連することなど、臨床検査として応用する際に重要な知見を報告している (Morisaki et al. Prenat Diagn 2014, Miura K et al. Placenta 2014, Miura K et al. Prenat Diagn in press)。

・**分子マーカーを用いた癒着胎盤のリスク評価の可能性**:私どもは双胎間輸血症候群をのちに発症する群と発症しない群とでは妊娠初期の母体血漿中 cell-free hPL mRNA 流入量に差を認めることを報告し (Miura K et al. Clin Chem 2007, Miura K et al. Prenat Diagn 2014)、双胎間輸血症候群を発症する胎盤において疾患発症前の妊娠初期から既に胎盤特異的 cell-free mRNA 流入量に変化を生じていることを示唆した。

2. 研究の目的

私どもは、cell-free placental mRNA 定量化は、癒着胎盤における化学療法の効果判定あるいは前置胎盤における癒着胎盤のリスク推定に応用可能であることを報告している (Masuzaki H et al. Clin Chem 2005, Miura K et al. Prenat Diagn 2008)。本研究では、これまでの研究成果を発展させて、分子診断を取り入れた癒着胎盤評価法の確立を目指した。期間内の明確なターゲットとして、以下の4項目を挙げた。

(1)妊娠初期の時点で癒着胎盤のリスクを推定するために、妊娠初期の母体血に流入している胎盤特異的遺伝子を網羅的に同定する。(2)癒着胎盤の病態は妊娠初期から既に存在しているとの仮説を検証する。(3)癒着胎盤の検出率が高いマーカーセットを決定する。(4)分子マーカーセットを用いた癒着胎盤の術前診断の可能性を明らかにし、術中超音波検査と組み合わせた癒着胎盤の管理評価法を確立する。

3. 研究の方法

(1)**検体集積**:長崎大学病院を受診した妊婦のうち、同意を得た症例について妊娠中経時的(妊娠12週、16週、20週、24週、28週、32週、36週、38週および産褥)に母体血漿を集積保存した。前置胎盤については40例を収集した。

(2)**cell-free mRNA/microRNAの抽出**:妊娠初期の母体血漿1.6ccよりQiagen RNeasy KitとInvitrogen lsoGenを用いてcell-free mRNAを抽出した。

(3)**RNAの抽出**

母体末梢血と絨毛組織を一組とし、妊娠初期の計3組をアレイおよび次世代シーケンズ解析に用いた。

同意を得て採取した絨毛は RNA later ですぐに安定化され、正常核型であることを G-banding 法で確認するまで、-80℃フリーザーに保存した。

母体末梢血 4cc および絨毛組織 5g より、それぞれ Quiagen RNeasy kit を用いて RNA を抽出した。

rRNA が分解されることなく抽出されていることを電気泳動で確認し、RNA 濃度を NanoDropND-1000 で計測したのち、マイクロアレイ解析を開始するまで -80℃フリーザーに保存した。

(4)cDNA マイクロアレイ解析と母体血漿中における胎盤特異的遺伝子の同定

3組の絨毛および母体血それぞれより抽出した RNA 5g を cDNA マイクロアレイ解析に用いた。

母体白血球と絨毛におけるそれぞれのアレイ解析結果を比較検討することにより、胎盤組織で発現しているが母体白血球では発現を認めない胎盤特異的 mRNA を同定した。

(5)胎盤特異的 microRNA の同定

まず、英国サンガー研究所の miRNA database を利用して、胎盤のみで発現している miRNA を選択した。次いで、選択された miRNA が母体血漿中で同定可能な miRNA なのか、microRNA TaqMan probe (アプライドアシテム)を用いて定量解析して検討した。定量可能な miRNA を母体血中胎盤特異的 miRNA として、癒着胎盤の推定に応用可能か否か検討した。

(6)TaqMan プローブの作成および条件設定

GenBank と UCSC Human Genome Browser を用いて、その遺伝子配列を同定して TaqMan プローブを作成した。

(7)胎盤特異的 cell-free mRNA/miRNA の臨床的意義の評価

コントロールにおける結果と比較検討して、個々の cell-free mRNA/miRNA の臨床的意義を検討した。この際に、コントロールの cff-mRNA/miRNA レベルと比較して疾患群におけるそれが統計学的有意差 ($p < 0.05$) を持って変化しているものは癒着胎盤の分子マーカーとして選定した。

(8)癒着胎盤のスクリーニングに有用な分子マーカーセットの選別 (前置胎盤を伴う症例において、6で選定された各 cell-free mRNA/miRNA マーカーについて妊娠初期の血漿中における cell-free mRNA/miRNA レベルと付着胎盤、後方視的に病理診断で確認された嵌入胎盤および穿通胎盤との相関の有無の検討を試みた。

(9)妊娠末期の画像診断；子宮摘出のリスクが高いと予想される症例について超音波検査を用いて癒着胎盤の程度を評価した。超音波検査は超音波専門医(吉田)が行い、胎盤が前壁へ付着し内子宮口を覆うものなのか否か、胎盤の不整なラクナ像、胎盤と接する子宮筋層の非薄化、胎盤後方のクリアスペースの消失、子宮漿膜・膀胱間に認める血管像の増加の5項目について癒着胎盤の程度を評価する。5項目いずれも認めるものを穿通胎盤あるいは嵌入胎盤の可能性が高いと評価した。

(10)術中(帝王切開)の評価；術中超音波により脱落膜の有無を確認した。

(11)術後の病理診断；子宮摘出群では病理組織検査を行い癒着胎盤の有無を診断した。子宮温存群では胎盤の病理診断により子宮筋層の有無を確認して癒着胎盤の有無を確認した。

4. 研究成果

(1)妊娠初期の時点で癒着胎盤のリスクを推定するために、妊娠初期の母体血に流入している胎盤特異的 mRNA/miRNA を網羅的に同定した。

(2)前置胎盤症例の妊娠中の超音波検査および術中超音波検査の所見から、子宮摘出を要するような胎盤剥離困難な重度の癒着胎盤の可能性を否定することが可能になった。症例数の不足により、癒着胎盤と関連胎盤特異的 mRNA/miRNA を同定することはできなかった。

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〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：三浦 清徳

ローマ字氏名：MIURA, Kiyonori

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00363490

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。