

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10703

研究課題名(和文) 血清microRNAプロファイルに基づく侵入奇胎の早期診断法確立・成立機序の解明

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis method and elucidation of developing mechanism for invasive moles with serum cell-free microRNA profile

研究代表者

碓井 宏和 (Usui, Hirokazu)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：90375634

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)：侵入奇胎に進展する胞状奇胎と自然寛解する胞状奇胎の違いは不明である。侵入奇胎組織の摘出は臨床的に困難であるため、血清セルフリーmiRNAの検出を試みた。胞状奇胎手術前の血清からは、has-miR-520bおよびhas-517a-3p(胞状奇胎組織で高発現していることが報告されているmiRNA)がほぼ全例で検出された。一方、侵入奇胎診断確定時の血清では、has-miR-520bおよびhas-517a-3pの検出は約30%にとどまった。侵入奇胎の腫瘍マーカーとして有用性のある血清miRNAを同定するためには、病巣の大きい侵入奇胎を用いた解析が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The difference between invasive moles and hydatidiform moles has been unveiled. We cannot resect the focus of invasive moles because the patient would need her uterus for fertility preservation. We tried to detect the serum cell-free miRNA to profile the invasive moles. The miRNAs of has-miR-520b and has-517a-3p which are known to be highly expressed in hydatidiform moles were identified in serum cell-free RNA fraction of almost all pre-evacuated patients with hydatidiform moles. On the other hand, these miRNAs were detected in only 30% of invasive moles patients. To identify the specific miRNA of invasive moles, we need the further analysis of the large volume focus of invasive moles.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：胞状奇胎 セルフリー核酸 侵入奇胎 腫瘍マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

全胎状奇胎のおよそ 20% に続発症が生じるが、部分胎状奇胎・流産ではほとんど発症しないため、真の全胎状奇胎；雄核発生奇胎を正確に診断することは重要である。申請者らは、胎状奇胎に対して Short tandem repeat (STR) 多型解析をルーチンに行い、続発症のハイリスク先行妊娠である雄核発生奇胎の正確な診断に努めてきた (Usui H, et al. 2011, Baasanjav B and Usui H et al. 2010)。これまでに 253 例の DNA 多型解析を行った。雄核発生奇胎(全奇胎)158 例、3 倍体(部分奇胎)37 例、両親由来 2 倍体(流産)が 58 例であったが、続発症 30 例はすべて雄核発生奇胎から生じていた。STR 多型解析により、全胎状奇胎の診断は確実になったが、全胎状奇胎のどの症例が続発症(侵入奇胎)になるのかを予測する方法はない。

侵入奇胎が成立した際に重要な因子を同定するには、侵入奇胎が成立した時の情報が必要であろうと考えた。侵入奇胎は、hCG 産生能・化学療法に対する感受性・転移の好発部位などの点で、生物学的な均一性を有しているため、何らかの、共通の特徴を有しているであろうと考えた。

侵入奇胎患者の大部分は妊孕能温存の希望がある。また、子宮摘出することなく化学療法単独でほとんどの症例は寛解することから、近年では侵入奇胎の病理学的検索例に遭遇する機会はほとんどない。侵入奇胎の組織(筋層病変や肺病変)を使用した研究が困難なため、侵入奇胎成立機序の解明はほとんど進んでいない。

血清中には、腫瘍や胎盤組織由来の miRNA が存在することが明らかにされた (Miura K, et al. 2010)。血清中の miRNA は、cell free RNA、tissue RNA に比べると安定である。血清 miRNA をターゲットとして、初期癌のスクリーニングマーカーを見つけようとする、国家プロジェクト(新エネルギー・産業技術総合開発機構「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発」プロジェクト)も 2014 年 8 月から開始された。

血清・血漿中で安定な cell-free miRNA を解析し、侵入奇胎に特徴的なプロファイルを同定することができれば、発症機序を知る上で有用であろうと考えた。

### 2. 研究の目的

遺伝学的に正確に診断された雄核発生奇胎患者の血清 micro-RNA (miRNA) プロファイリングを行う。侵入奇胎となった奇胎と自然寛解した奇胎とで血清 miRNA を比較し、両者を鑑別可能か検討する。さらにこの中から、侵入奇胎発症予測・鑑別マーカーとして有用な miRNA を探す。鑑別に有用であった miRNA は、侵入奇胎の成立(阻止)に重要と考えられることから、その機能を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 対象症例の選択：遺伝学的に雄核発生奇胎と診断された症例の中で、臨床的に典型的な経過を辿った自然寛解例、侵入奇胎例を選択する。

(2) Cell-free RNA の抽出・検証：EXIQON 社の miRCURY RNA Isolation Kit を用いて、miRNA の抽出を行った。血清 miRNA が抽出されていることを、hsa-miR-23a-3p (血清・血漿中で最も安定発現していることが知られている)の増幅により確認した。雄核発生奇胎組織で高発現しており、血清中にもセルフリー核酸として存在することが報告されている第 19 番染色体上の C19MC cluster 上の miRNA である hsa-miR-517a-3p、hsa-miR-520b の増幅を、侵入奇胎および胎状奇胎患者の血清 miRNA をテンプレートとして検証した。

(3) Cell-free DNA の抽出・検証：絨毛がん患者の治療前・治療後血漿から cell-free DNA を、Norgen 社の Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit を用いて cell-free DNA を抽出した。Qiagen 社 Investigator Hexaplex ESS kit を用いて、患者血液ゲノム DNA・血漿 cell-free DNA の STR 多型を比較した。

### 4. 研究成果

(1) 雄核発生奇胎・侵入奇胎の診断：研究期間に、58 例の新規雄核発生奇胎(全胎状奇胎)をリクルートした。そのうち 8 例が存続絨毛症になった。

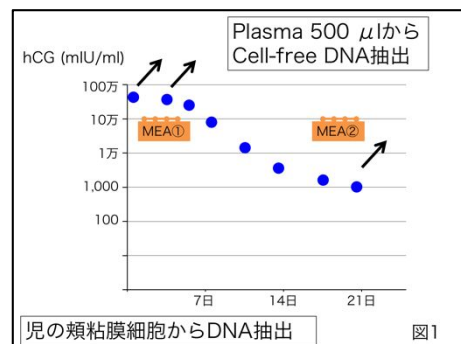
(2) miRNA の発現検討：

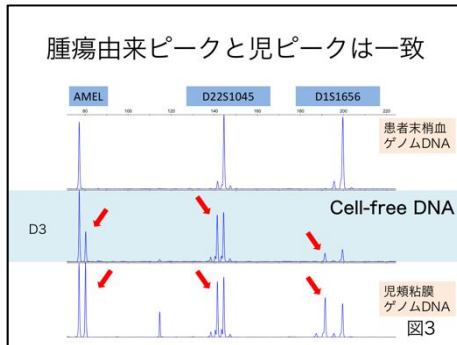
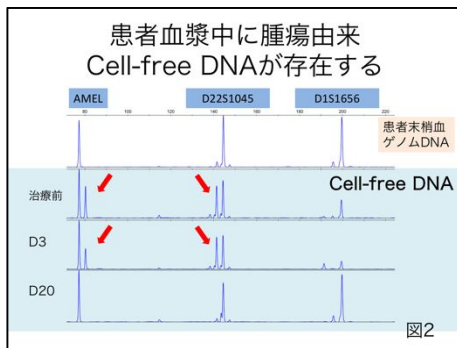
コントロール血清 4 例・全胎状奇胎血清 6 例・侵入奇胎血清 6 例全例で、ヒト血清中で安定発現していると考えられている、hsa-miR-23a-3p の発現が、real-time PCR 法で確認できた。

hsa-miR-517a-3p、hsa-miR-520b の増幅は、胎状奇胎術前血清では、全例で確認できたが、侵入奇胎診断時の血清では検出率は 33%(2/6)であった。

(3) 絨毛癌由来 Cell-free DNA の検証・治療経過による推移の検討：

絨毛癌患者 2 名に対して、治療前・化学療法開始 3 日目、20 日目の血漿 500uL から Cell-free DNA を抽出し(図 1)、患者本人(図 2)・先行妊娠の児(男児：図 3) の STR 多型パターンと比較した。





絨毛癌患者血漿中には、絨毛癌由来の Cell-free DNA が存在する (図1)。治療開始 3 週目には、絨毛癌由来 Cell-free DNA は検出できなくなる。絨毛癌由来 STR アリルは児の STR アリルと一致していた。以上より、診断には有用であるが、寛解判定には有用でない可能性がある。

(4) 研究成果のまとめ：血漿・血清 miRNA を用いて、侵入奇胎に特徴のあるプロファイルの同定を目指したが、侵入奇胎症例が少なかった。胞状奇胎後の 1 次管理を厳重に行っていたためか、病巣の大きい侵入奇胎例が研究期間内には、ほとんど見られなかった。このため、十分な検証ができなかった。侵入奇胎の腫瘍マーカーとして有用性のある血清 miRNA を同定するためには、病巣の大きい侵入奇胎を用いた解析が必要と考えられた。

#### 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 5 件)

Complete hydatidiform moles are composed of paternal chromosomes and maternal mitochondria. Pan Z, Usui H, Sato A, and Shozu M. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 査読あり :1-8, 2017 Oct 17

Presence of the methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism MTHFR C677T in molar tissue but not maternal blood predicts failure of methotrexate treatment for low-risk gestational trophoblastic

neoplasia. Qu J, Usui H, Kaku H, and Shozu M Eur J Pharmacol 査読あり 794: 85-91, 2017

Comparison Between Pathological Diagnosis and Cytogenetic Diagnosis by Short Tandem Repeat Polymorphism Analysis of Suspected Molar Pregnancies. Usui H, Kiyokawa T, Qu J, Nishikimi K, Tate S, Mitsuhashi A, Nakatani Y, and Shozu M J Reprod Med 査読あり 61: 219-223, 2016

Mature cystic teratomas arise from meiotic oocytes, but not from pre-meiotic oogonia. Kaku H, Usui H, Qu J, and Shozu M Genes Chromosomes Cancer 査読あり 55: 355-364, 2016

【周産期管理がぐっとよくなる!ハイリスク妊娠の外来診療パーフェクトブック】産科合併症の管理 絨毛性疾患. 碓井宏和, 佐藤明日香, 鈴木義也, 生水真紀夫 産婦人科の実際 査読なし 65: 1217-1223, 2016

[学会発表](計 12 件)

雄核発生奇胎は母由来ミトコンドリア DNA と父由来核 DNA で構成される 潘籽君, 碓井宏和, 佐藤明日香, 生水真紀夫 第 35 回日本絨毛性疾患研究会 2017 年 11 月 24 日

Investigation of inheritance of the mitochondrial DNA in hydatidiform moles Zijun Pan, Hirokazu Usui, Asuka Sato, Makio Shozu XIX World Congress Gestational Trophoblastic Disease 2017 年 9 月 21 日

妊娠性絨毛癌診断への Cell-free DNA の利用 碓井宏和, 佐藤明日香, 潘籽君, 埴真輔, 松岡歩, 羽生裕二, 錦見恭子, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 第 59 回日本婦人科腫瘍学会 2017 年 7 月 28 日

胞状奇胎と卵巣奇形腫の発生機序 SNP アレイ解析による可視化 碓井宏和 第 58 回 日本臨床細胞学会総会(春季大会) 2017 年 5 月 28 日

妊娠性絨毛癌の診断への Cell-free DNA の利用 碓井宏和, 佐藤明日香, 埴真輔, 松岡歩, 羽生裕二, 錦見恭子, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017 年 4 月 15 日

妊娠性絨毛癌診断への Cell-free DNA の利用 碓井宏和, 佐藤明日香, 潘籽君, 埴真輔, 松岡歩, 羽生裕二, 錦見恭子, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 第 34 回日本絨毛性疾患研究会 2016 年 11 月 25 日

侵入奇胎群先行妊娠の 遺伝学的検討 碓井宏和, 埴真輔, 松岡歩, 錦見恭子, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 第 58 回婦人科腫瘍学会学術集会 2016 年 7 月 8 日 The risk estimation of gestational

trophoblastic neoplasia after cytogenetically defined hydatidiform molar pregnancy: A prospective cohort study Hirokazu Usui 68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology 2016 年 4 月 22 日

絨毛性疾患登録について 碓井宏和, 生水真紀夫 千葉県産科婦人科医学会 平成 27 年度冬期学術講演会 2016 年 2 月 14 日

Short tandem repeat 多型解析による 胞状奇胎の DNA 診断: 臨床応用と Pitfall 碓井宏和, 瞿佳, 生水真紀夫 第 33 回 日本絨毛性疾患研究会 2015 年 11 月 5 日

Comparison between the pathological diagnosis and the cytogenetic classification by short tandem repeat polymorphism analysis of suspicious molar pregnancies Hirokazu Usui, Takako Kiyokawa, Jia Qu, Kyoko Nishikimi, Shinichi Tate, Akira Mitsuhashi, Yukio Nakatani, Makio Shozu XVIII WORLD CONGRESS ON GESTATIONAL TROPHOBLASTIC DISEASES 2015 年 9 月 16 日

The polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in homozygous androgenetic complete moles predicts the failure of methotrexate treatment for low-risk gestational trophoblastic neoplasia Jia Qu, Hirokazu Usui, Makio Shozu XVIII WORLD CONGRESS ON GESTATIONAL TROPHOBLASTIC DISEASES 2015 年 9 月 16 日

〔図書〕(計 1 件)

碓井宏和 絨毛性疾患, 今日の治療指針 2017 年版 福井次矢, 高木誠, 小室一成, 編, 医学書院, 2017:1279.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/gyne/rinsyo/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

碓井 宏和 (USUI, Hirokazu)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 90375634