

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20162

研究課題名(和文) 母体血mRNAを用いた血管新生関連因子の発現比較による胎盤機能不全の解明

研究課題名(英文) Analysis of cell-free mRNA in first trimester plasma from pregnant women who would develop fetal growth restriction or hepertensive disorders of pregnancy

研究代表者

竹中 慎 (Takenaka, Shin)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：60515211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：のちに妊娠高血圧症候群(HDP)または胎児発育不全(FGR)を発症する症例では妊娠8-11週の時点ですでに母体血中cell-free RNAレベルで変化を生じているのかを確認すること、さらには胎盤機能不全の機序解明につながる知見を得ることを目的に本研究を実施した。妊娠8-11週の母体血からcell-free RNAを抽出し血管新生関連因子を含む6種の遺伝子を対象にHDP発症群・FGR発症群と正常経過群を比較したところ、FGR発症群ではHOXC4のcell-free RNA濃度が有意に高値であった。FGRの発症機序解明や発症予測法の開発においてHOXC4は着目すべき遺伝子の1つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：At 8-11 weeks of gestation, cell-free HOXC4 mRNA level in plasma of pregnant women who would develop fetal growth restriction later was statistically higher than normal pregnant women. It was suggested that HOXC4 was one of the key genes in understanding pathogenesis of fetal growth restriction.

研究分野：周産期

キーワード：胎児発育不全

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (HDP) および胎児発育不全 (FGR) は母体および児の予後に重大な影響を及ぼす妊娠合併症であり、発症頻度は両者とも 5%前後と決して低くない。HDP および FGR 発症の主な原因は、妊娠初期における胎盤形成不全であり、それによる絨毛細胞傷害、絨毛細胞での各種生成物質の母体血中への流入、それらの物質による母体血管内皮細胞傷害であると推測されている。つまりは臨床症状が出現する以前から HDP, FGR の病因形成は完成している。妊娠早期からその変化を捉えることができればその後の発症予防や高次施設での管理を行うことができるため世界中で胎盤形成不全の予知が研究されている。

HDP に関しては、Levine らが血管新生関連因子 (sFlt-1, ENG) の母体血中タンパク量変化を検出することで妊娠高血圧腎症 (PE) の発症を妊娠中期に予測することが可能であることを示した。一方、FGR に関しては、世界中で血管新生関連因子や超音波検査などによる発症予知の研究がなされているが精度の高い発症予知法は発見できていない。両疾患とも妊娠初期における予知精度はいまだ低い。

2. 研究の目的

のちに HDP もしくは FGR を発症する症例では妊娠 8-11 週の時点ですでに母体血中 cell-free RNA レベルで変化を生じているのかを確認すること、さらには胎盤機能不全の機序解明につながる知見を得ることを目的に本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1)対象：本研究への参加に同意した妊婦から妊娠 8-11 週に血液を採取し、遠心分離して得た血漿を -80 で保管した。その後の妊娠経過および分娩予後を確認できた症例を対象とした。さらに対象症例を、妊娠終了後に母児とも異常なく経過した群、HDP を発症した群、FGR を発症した群、の 3 群に分類した。

(2)母体血中の cell-free RNA 測定：血漿から TRIzol Reagent (ambion)、クロロホルム、QIAamp Mini Virus Kit (QIAGEN) を用いて血漿から cell-free RNA を抽出し、TaKaRa PrimerScript RT Master Mix を用いて cDNA 化し定量 PCR 法で遺伝子量を測定した。Real Time PCR では TaKaRa Premix Ex Taq ROX plus を使用した。母体血中の各遺伝子の cell-free mRNA 量を測定した。対象遺伝子は PE の発症予知マーカーとなりうる報告されている遺伝子 (ENG, FLT1, PlGF, PAPP-A) と、我々が以前、胎盤の形成・成熟に伴うエピゲノム変化を確認する目的で実施した研究で、のちに PE を発症する症例

の胎盤において妊娠初期の時点ですでに遺伝子発現が異なる可能性が示唆された遺伝子群 (HOXC4, NCOR2, MAD1L1) とした。

(3)解析：各遺伝子の母体血中 mRNA 断片濃度に関して、「のちに HDP を発症した群 (HDP 発症群)」と「のちに FGR を発症した群 (FGR 発症群)」をそれぞれ「母児ともに異常なく経過した群 (正常群)」と比較解析した。正常グループは、年齢、経産の有無、分娩週数の一致する症例を 1:3 マッチで母児ともに異常なく経過した群より選出した。解析の際の母体血中 mRNA 断片濃度は、母児ともに異常なく経過した単胎妊娠 202 例の中央値より算出した MoM 値を用い、Wilcoxon 法により解析した。

4. 研究成果

(1)対象症例および妊娠・分娩予後：

本研究への参加に同意し、妊娠初期に血液を提供いただいた妊婦 284 名中、その後の妊娠経過および分娩予後を確認できた妊婦は 258 名であった。このうち、7 名 (2.7%) がのちに HDP (妊娠高血圧腎症 2 名、妊娠高血圧症 5 名) を、6 名 (2.3%) がのちに FGR を発症した。

(2)HDP 発症群に関する検討：

PlGF mRNA に関しては HDP 発症群・正常群ともに計測不可である症例が多かったため比較解析の対象から除外した。解析対象とした 6 遺伝子に関しては、正常群と比較し、妊娠初期母体血中 cell-free RNA 量に有意差は認めなかった (図 1-6)。

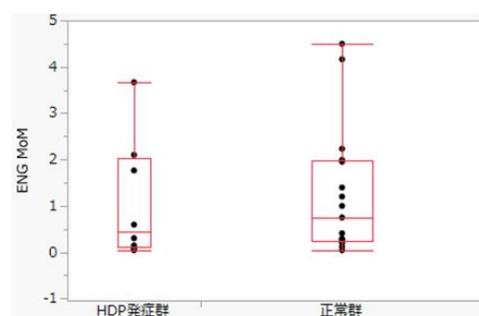


図 1 母体血中 cell-free ENG RNA 量

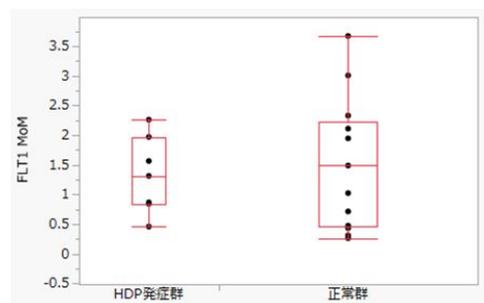


図 2 母体血中 cell-free FLT1 RNA 量

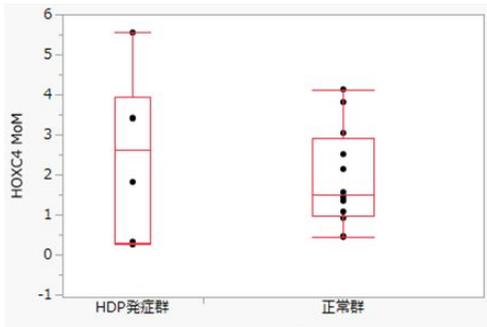


図3 母体血中 cell-free HOXC4 RNA 量

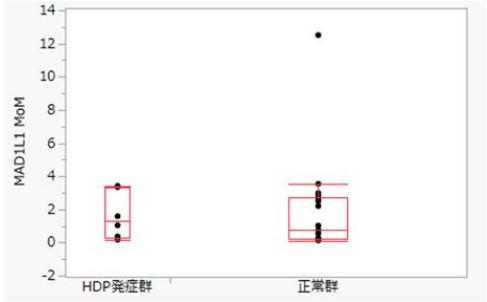


図4 母体血中 cell-free MAD1L1 RNA 量

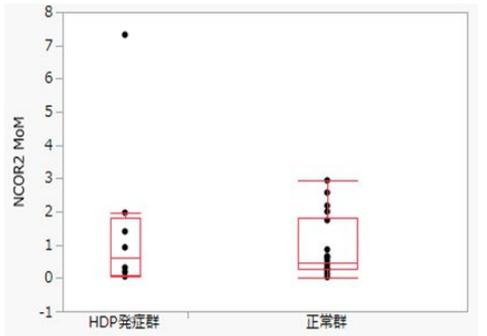


図5 母体血中 cell-free NCOR2 RNA 量

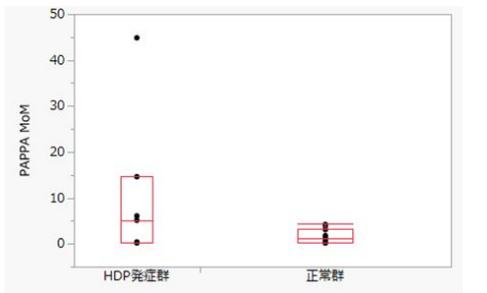


図6 母体血中 cell-free PAPP-A RNA 量

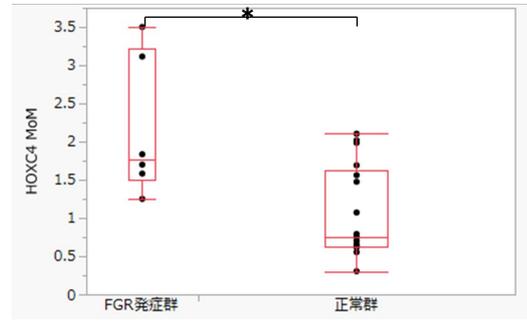


図7 母体血中 cell-free HOXC4 RNA 量

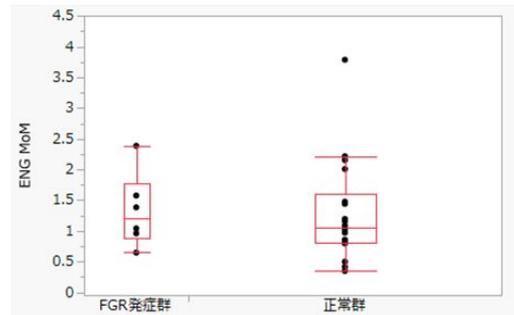


図8 母体血中 cell-free ENG RNA 量

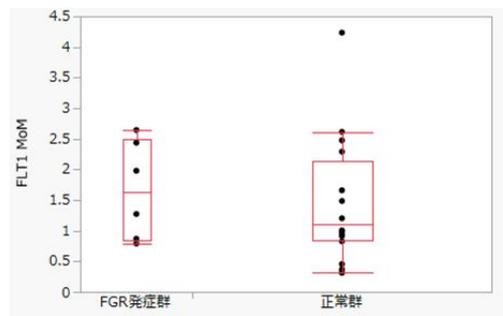


図9 母体血中 cell-free FLT1 RNA 量

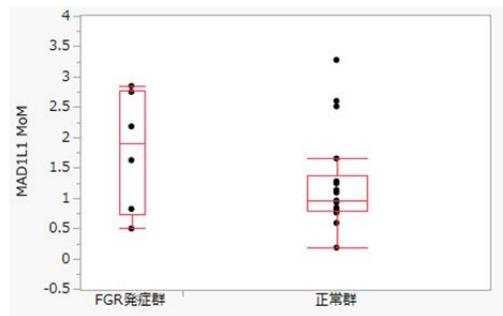


図10 母体血中 cell-free MAD1L1 RNA 量

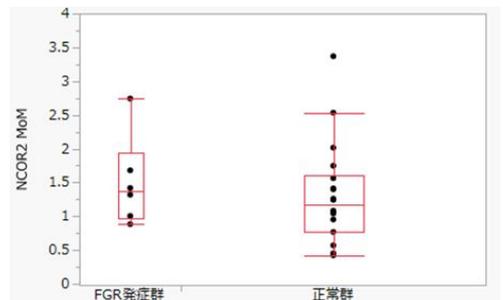


図11 母体血中 cell-free NCOR2 RNA 量

(3)FGR 発症群に関する検討：

PIGF mRNA に関しては FGR 発症群・正常群ともに計測不可である症例が多かったため比較解析の対象から除外した。解析対象とした6遺伝子のうち HOXC4 においては、正常群と比較し、妊娠初期母体血中 cell-free RNA 量は有意に高値であった ($p=0.014$) (図7)。その他の遺伝子に関しては有意差を認めなかった (図8-12)。

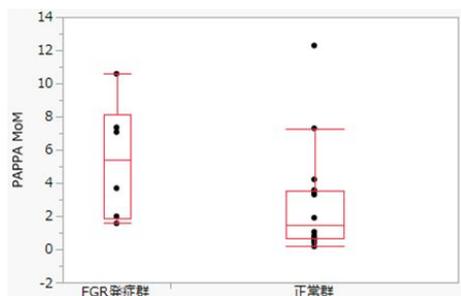


図 12 母体血中 cell-free PAPP-A RNA 量

(4)結論：

のちに胎児発育不全をきたす母体では、妊娠 8-11 週の時点で血中 cell-free HOXC4 mRNA 濃度は有意に上昇していた。胎児発育不全の発症機序解明や発症予測法の開発において、HOXC4 は着目すべき遺伝子の 1 つである可能性が示された。

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)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特記事項なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹中 慎 (TAKENAKA, Shin)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：60515211

(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

小出 馨子 (KOIDE, Keiko)

研究者番号：90384437

関沢 明彦 (SEIKIZAWA, Akihiko)