

令和元年6月19日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15710

研究課題名(和文) 胚培養液中における受精胚由来microRNAの同定とその臨床的意義に関する研究

研究課題名(英文) Human embryos-associated microRNAs in culture media and their clinical usefulness

研究代表者

村上 優子 (MURAKAMI, Yuko)

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：80739912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：受精胚を培養した培養液中で検出可能な受精胚由来microRNAを同定した。胚培養液中のmicroRNAを定性解析することで、良好胚をスクリーニング出来る可能性が示唆された。胚培養液中のmicroRNAを用いた受精胚機能検査法の開発を試みたが、胚培養液中から抽出されるRNA量が微量であること、ならびにTaqMan PCR法によるmicroRNA定量精度が不安定であることから、今回は開発できなかった。今後症例数を増やし研究データの正確性をさらに高める必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義
培養液中に発現している受精胚特異的microRNAとしてを同定し、それを用いた受精胚の機能検査法を開発することを目的としたが、症例数に限りがあり今回は開発できなかった。今後症例数を追加することで分子マーカーによる受精胚の機能解析が可能になれば、より正確な良好胚の選択が可能になり、着床率ならびに生児獲得率の向上につながり、少子化対策に大いに貢献する。

研究成果の概要(英文)： Human embryos-associated microRNAs can be detected in in vitro fertilization(IVF) culture media, which could be useful for screening successful(live-birth)samples.

Larger samples are needed to determine whether measurement of human embryos-associated microRNAs can be used as a novel, noninvasive biomarker for assessing embryonic health .

研究分野：産婦人科学

キーワード：生殖補助医療 胚培養液 受精胚 microRNA 分子マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1). 解決すべき課題：現在の生殖補助医療では、体外受精した受精胚が良好胚であるかどうかの判断には、受精胚の形態を指標としたグレード分類(Veek 分類 / Gardner 分類)が用いられているが、受精胚自体の機能を推定する分子マーカーは同定されていない。受精胚の機能解析が可能になれば、より正確な良好胚の選択が可能になり、着床率ならびに生児獲得率の向上につながり、少子化対策に大いに貢献する。また、着床前診断では割球採取に伴う胚への侵襲が懸念される。

(2). 受精胚と培養液：近年、受精胚自体の機能が明らかになり、胚培養液中には様々な受精胚から放出された microRNAs が検出されることが報告されている (Fertil Steril 2014;101:1493-1500)。これら microRNA の中には、受精胚の機能と関連しているものが存在していると期待される。

(3). 胎児・胎盤由来 microRNA: 私どもは、母体血漿中に流入する胎盤特異的 mRNA の網羅的解析は、abnormal placentation と関連した妊娠高血圧症候群や癒着胎盤などの疾患発症を推定する分子マーカーとなり得ることを報告し (Prenat Diagn. 2008 and 2010)、特許を取得した (三浦清徳、増崎英明、三浦生子、山崎健太郎、新川詔夫「胎盤機能の網羅的かつ非侵襲的評価方法および検査用試薬」特許第 5487555 号 2014 年 3 月 7 日)。さらに、私どもは妊娠に関連する胎盤特異的 microRNA を網羅的に同定し (Clin Chem.2010)、chromosome14 microRNA cluster region(C14MC)の microRNAs は胎児と胎盤絨毛組織で、一方 C19MC は胎盤特異的に発現していた。そして、母体血漿中におけるそれらの定量化と様々な産科疾患 (胎児発育不全、妊娠高血圧腎症、前置胎盤) や異常妊娠 (胞状奇胎) との関連を報告している (Prenat Diagn. 2013, Clin Chem. 2013, J Obstet Gynaecol Res. 2015, Reprod Sci. in press)。また、私どもは、胎盤重量や子宮収縮の有無と母体血漿中の胎盤特異的 mRNA/microRNA 流入量との関連を見出し、母体血漿中の胎盤特異的 mRNA/microRNA を定量することで、妊娠中の胎盤の状態を評価し得る可能性を見出した (Clin Chem. 2004, Clin Chem.2006, Prenat Diagn.2015)。双胎間輸血症候群などでは、母体血漿中の胎盤特異的 mRNA 流入量は、症状発症前から変化しており、疾患リスクの推定に有用であることが見出された (Clin Chem. 2007, Prenat Diagn. 2014)。すなわち、私どもは、母体血漿中の胎児・胎盤由来 microRNA 流入量も同様に、産科疾患や異常妊娠が顕在化する以前から変化しており、その定量値は妊娠の状態を反映していると考えられた。また、母体血漿中に流入する胎児由来 DNA を用いた胎児染色体診断は、NIPT として既に臨床に応用されている。

以上より、本研究では、これまでの母体血漿中に流入している胎児・胎盤由来 microRNA (C14MC ならびに C19MC-microRNAs) の定量に関する研究成果を技術移転して、生殖補助医療における胚培養中の受精胚の分子機能を客観的に評価しうる検査法の開発を目指す。

2. 研究の目的

現在の生殖補助医療では、体外受精した受精胚が良好胚であるかどうかの判断には、受精胚の形態を指標としたグレード分類(Veek 分類 / Gardner 分類)が用いられているが、受精胚自体の機能を推定する分子マーカーは同定されていない。近年、受精胚自体の機能が明らかになり、胚培養液中には様々な受精胚から放出された microRNAs が検出されることが報告されている (Fertil Steril 2014;101:1493-1500)。本研究では、受精胚で発現している胎児・胎盤由来 DNA/microRNA に着目し、私どもの研究成果を発展させて、胚培養液中でそれらを定量することで受精胚機能検査法の開発を目指す。期間内の具体的な目標を以下に 3 つ挙げる。(1) 培養液中で定量可能な胎児・胎盤特異的 miRNA を受精胚特異的 microRNA として同定する、(2) それらの胚培養液中における基準値を決定する、(3) 培養液中の受精胚由来 DNA/microRNA を用いた受精胚の機能検査法を開発する。

3. 研究の方法

(1). 検体集積：受精胚を培養した受精 3 日目と受精 5 日目の培養液を一組として計 32 組を集積した。

(2) 臨床データの調査: 臨床データについては、受精 3 日目の Veek 分類と受精 5 日目の Gardner 分類のデータ、胚移植の有無、胚移植後の妊娠生率の有無、生児獲得の有無について調査した。

(3). 受精胚を培養した Day3 ならびに Day5 の培養液中で検出可能な miRNA の同定：胎盤特異的に発現する microRNA である chromosome 19 microRNAs cluster region(C19MC 領域)の miR-517c、miR-518 ならびに胎児・胎盤で有意に発現している C 14MC 領域の miR-323-3p の培養液中における発現の有無を定性的に解析した。

(4). 培養液を用いた受精胚機能検査キットの開発：受精胚特異的 microRNA について、Veek 分類 / Gardner 分類 (形態的分類) との関連を解析した。受精胚特異的 microRNA について、妊娠成功例と妊娠不成立例とを最も区別しうる受精胚特異的 microRNA マーカーセットを ROC 解析で選定し、胚培養液を用いた受精胚機能検査法を開発した。

4. 研究成果

受精胚を培養した培養液中で検出可能な受精胚由来 miRNA を同定した。胎盤特異的に発現する microRNA である chromosome 19 microRNAs cluster region(C19MC 領域)の miR-517c、miR518b ならびに胎児・胎盤で有意に発現している C14MC 領域の miR-323-3p の培養液中における発現の有無を定性的に解析した。受精胚を培養した Day3 ならびに Day5 の培養液を集積し、それぞれの培養液から miRNA を抽出して、発現パターンを解析した。11 例の培養液中の miRNA の発現パターンは、DAY5 の培養液中に miR-517c ならびに miR-323-3p の発現を検出し得たものは 3 例であり、いずれの胚もその後の妊娠成立ならびに生児を得たことが確認された。いずれの microRNA

の発現も認めなかった 2 例は、胚移植後の妊娠は確認されなかった。いずれか一方の microRNA の発現が認められた 6 例のうち、2 例は胚移植後の妊娠成立と生児の獲得が確認された。Day3 の培養液中には miR-518b が検出されるサンプルが含まれていたが、miR-323-3p は全てのサンプルで検出されなかった。一方、Day5 の培養液中には miR-518b と miR-323-3p とを検出できるサンプルが含まれていた。Day3 の培養液で miR-518b 陽性ならびに Day5 のそれで miR-518b と miR-323-3p とが陽性のとき、妊娠に至る受精胚が含まれている傾向が認められた。一方、Day3 あるいは Day5 の培養液に miR-518b の発現を検出できないとき、凍結胚できる受精胚が含まれていない傾向が認められた。胚培養液中の miRNA を定性解析することで、良好胚をスクリーニング出来る可能性が示唆された。胚培養液中の microRNA を用いた受精胚機能検査法の開発を試みたが、胚培養液中から抽出される RNA 量が微量であること、ならびに TaqMan PCR 法による microRNA 定量精度が不安定であることから、今回は開発できなかった。今後症例数を増やし研究データの正確性をさらに高める必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) . Murakami Y, Miura K, Sato S, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Yoshiura KI,

Masuzaki H.

Reference values for circulating pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy. (査読有)

J Obstet Gynaecol Res. 2018 May;44(5):840-851. doi: 10.1111/jog.13610. Epub 2018 Mar 8.

(2) . Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Fuchi N, Tsukamoto O, Abe S, Hasegawa Y,

Miura S, Masuzaki H.

Circulating Levels of Pregnancy-Associated, Placenta-Specific microRNAs in Pregnant Women With Placental Abruption. (査読有)

Reprod Sci. 2017 Jan;24(1):148-155. doi: 10.1177/1933719116653837. Epub 2016 Sep 27.

(3) . Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Tsukamoto O, Hasegawa Y, Abe S, Fuchi N,

Miura S, Kaneuchi M, Masuzaki H.

Circulating chromosome 19 miRNA cluster microRNAs in pregnant women with severe pre-eclampsia. (査読有)

J Obstet Gynaecol Res. 2015 Oct;41(10):1526-32. doi: 10.1111/jog.12749. Epub 2015 Jul 30.

〔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。