

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11283

研究課題名（和文）異所性妊娠の鑑別診断に有用な分子マーカーの同定と臨床応用に関する研究

研究課題名（英文）Identification of molecular markers for ectopic pregnancy

研究代表者

増崎 英明（Masuzaki, Hideaki）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・名誉教授

研究者番号：00173740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、母体血漿中胎児・胎盤特異的microRNAを用いた異所性妊娠の分子診断法の確立を目指した。具体的には、1)まず、妊娠初期の母体血漿中で検出される胎児・胎盤特異的microRNAを網羅的に同定した。2)そして、それらの母体血漿中における定量値と異所性妊娠との関連について検討し、3)最終的に異所性妊娠と関連するmicroRNA定量法の臨床検査としての有用性を評価した。胎盤特異的なC19MC microRNAならびに胎児・胎盤由来のC14MC microRNA (miR-323-3p)は異所性妊娠の可能性を推定する新たな分子マーカーとして期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、妊娠初期に異所性妊娠を非侵襲的かつ高精度に鑑別診断し、妊婦の健康向上に大いに貢献すると期待される。また、母体末梢血を用いた検査法は、異所性妊娠の分子病態メカニズムをリアルタイムに解明する手がかりになりうる。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we aimed to establish a molecular diagnostic method for ectopic pregnancy using fetal and placental microRNAs in maternal plasma. Specifically, we 1) comprehensively identified fetal and placental microRNAs detected in maternal plasma in early pregnancy, 2) examined their quantitative values in maternal plasma in relation to ectopic pregnancy, and 3) finally evaluated their usefulness as clinical tests for quantifying microRNAs associated with ectopic pregnancy. Finally, we evaluated the usefulness of microRNA quantification as a clinical test in relation to ectopic pregnancy. Placenta-specific C19MC microRNA and C14MC microRNA (miR-323-3p) from the fetus and placenta were expected to be new molecular markers to estimate the likelihood of ectopic pregnancy.

研究分野：産婦人科学

キーワード：異所性妊娠 分子マーカー microRNA C19MC C14MC 母体血

## 1. 研究開始当初の背景

・**妊娠初期における臨床的課題**：妊娠初期の妊婦検診で、尿中 hCG 陽性にもかかわらず、子宮内に胎嚢が確認できないとき、異常妊娠（異所性妊娠、流産、あるいは胎状奇胎）あるいは正常妊娠なのか鑑別診断する必要がある。それらの鑑別は、臨床的には、血清 hCG 値や血清プロゲステロン値の測定と経膈超音波検査とを用いて行われているが、いずれの感度・特異度ともに低率である。特に、異所性妊娠は妊娠初期における妊産婦死亡の原疾患のひとつであり、異所性妊娠と流産や正常妊娠とを鑑別する分子診断法の開発が望まれる。

・**胎盤特異的 microRNAs と産科疾患**：microRNAs は、19-25bp のタンパク質をコードしない単鎖 RNA であり、ターゲットになる mRNA の 3'側非転写領域に結合してターゲット遺伝子の発現を調節している。このメカニズムは、個体の発育・分化、アポトーシス、腫瘍化など様々な病態に関連している。したがって、母体血漿中における胎児・胎盤特異的 miRNA の同定は、遺伝子調節因子をターゲットにした分子マーカーの同定につながる。

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)、そ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 (胎状奇胎) 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、その定量値は異常妊娠の状態を反映していると期待している。一方、妊娠初期の異常妊娠では、すでに妊娠が成立した時点で、正常妊娠と比較して、胎盤絨毛成分と胎児成分の両方あるいはいずれかに異常を来していると考えられる。

以上より、本研究では、これまでの私どもの研究成果を発展させて、妊娠 4-5 週に母体血漿中で検出される胎児・胎盤由来 microRNA のなかに、異常妊娠 (異所性妊娠、流産あるいは胎状奇胎) と関連する microRNA が存在し、その定量化により異所性妊娠の分子診断が可能であるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、母体血漿中における胎児・胎盤由来 microRNA 流入量を指標とした異所性妊娠の分子診断法の開発を目指す (図 1)。目的完遂のため、期間内の検討項目として以下の 3 点を挙げる。

1. 異所性妊娠のリスクを推定するために、妊娠初期の母体血漿中で定量可能な胎児・胎盤由来 microRNA を網羅的に同定する。
2. 異所性妊娠の病態は妊娠 4-5 週に評価できるとの仮説を検証して、異所性妊娠の検出率が高

い microRNA マーカーセットを決定する。

3. 2. の microRNA マーカーセットを用いた異所性妊娠の早期診断の可能性を明らかにし、異常妊娠の管理評価法を確立する。

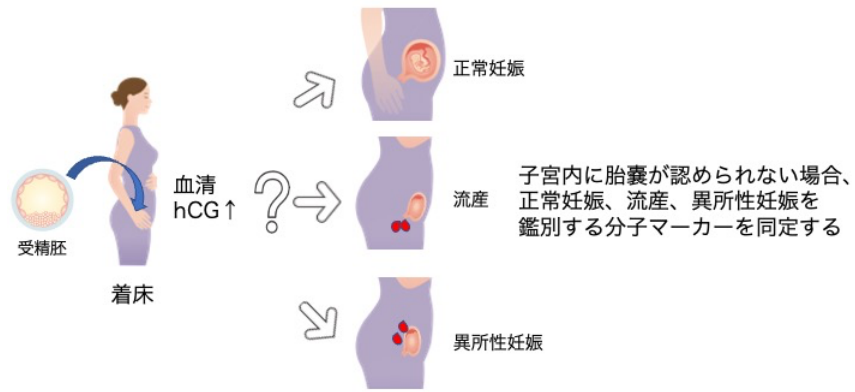


図1. 研究目的

### 3. 研究の方法

妊娠初期の母体血漿中で定量可能な胎児胎盤由来 microRNA を同定するため、妊娠初期の母体血球と比較して絨毛組織で有意に発現量が多い microRNA を選択した。そして、正常妊娠 26 例、流産 12 例、異所性妊娠 16 例の母体血漿を 6-10 週に採取し、C19MC 領域の microRNA (miR-515-3p, 517a, 517c, 518b) および C14MC 領域の microRNA (miR-323-3p) を定量した (図 2)。

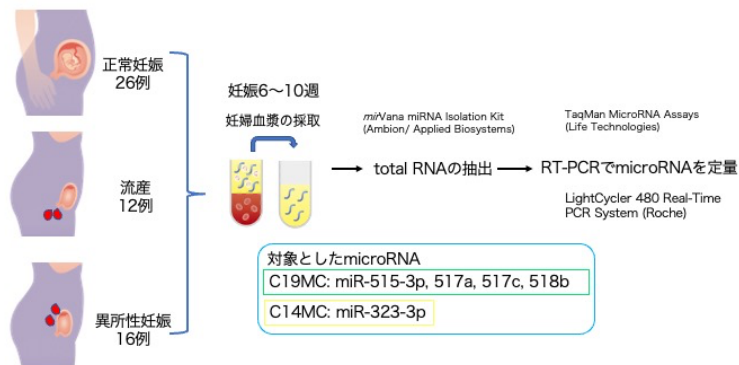


図2. 研究方法

### 4. 研究成果

妊娠初期の母体血球と比較して絨毛組織で有意に発現量が多い microRNA として、C19MC 領域に存在する miR-515-3p、miR-517a、miR-517c ならびに miR-518b、そして C14MC 領域に存在する miR-323-3p を選択した。C19MC microRNA (miR-515-3p、miR-517a、miR-517c ならびに miR-518b) は絨毛成分の発現量を、一方で C14MC (miR-323-3p) は胎児成分の発現量を反映していると考え、両者を組み合わせて、正常妊娠と異常妊娠との鑑別を試みた。その結果、C19MC microRNA は、正常妊娠と比較して、異常妊娠 (異所性妊娠および流産) で有意に流入量が減少しており、両者の鑑別は可能と考えられた (表 2)。しかし、異常妊娠である異所性妊娠と流産との間には有意差は認められなかった。そこで、これらの microRNA のうちの microRNA が流産と異所性妊娠とを鑑別できるのか検討するため ROC 曲線を用いて検討したところ、C14MC 領域の microRNA である miR-323-3p が、血清 hCG や他の microRNA よりもより高い精度で流産と異所性妊娠を鑑別可能であった (AUC 0.7454, 95% CI (0.5558-0.9349))。





表 1. 流産、異所性妊娠、正常妊娠における母体血漿中hCGとmicroRNA濃度

	流産 (SA) (n=12)	異所性妊娠 (EP) (n=18)	正常妊娠 (NP) (n=26)	Kruskal- Wallis test	p value		
					EP vs SA*	EP vs NP*	SA vs NP*
妊娠週数(平均)	7.52	7.89	8.31	NS	NS	NS	NS
hCG(mIU/mL) <sup>a</sup>	2943.5	5032.0	75044.0	<0.001	NS	<0.001	<0.001
miR-323-3p(MoM) <sup>a</sup>	0.6528	1.5499	1.00	0.044	NS	NS	NS
miR-515-3p(MoM) <sup>a</sup>	0.2208	0.0432	1.00	<0.001	NS	<0.001	<0.001
miR-517a(MoM) <sup>a</sup>	0.0693	0.0459	1.00	<0.001	NS	<0.001	<0.001
miR-517c(MoM) <sup>a</sup>	0.1823	0.2672	1.00	<0.001	NS	0.021	0.003
miR-518b(MoM) <sup>a</sup>	0.5898	0.4600	1.00	0.009	NS	NS	NS

SA: spontaneous abortion, EP: ectopic pregnancy, NP: normal pregnancy  
a: median \* : Bonferroni correction

以上、本研究課題の成果により、まず絨毛成分の機能を反映する C19MC microRNA で正常妊娠と異常妊娠とを鑑別し、ついで胎児成分の機能を反映する C14MC microRNA (miR-323-3p) で流産と異所性妊娠とを高精度に鑑別できることから (表 2)、これらは妊娠初期の正常妊娠と異所性妊娠とを鑑別できる分子マーカーセットになり得ると期待された。

表 2. 母体血漿中の胎児・胎盤由来microRNAを用いた正常妊娠と異常妊娠との鑑別

		絨毛	胎児	C19MC	C14MC
正常妊娠		+	+	○	○
流産		+	-	△	△
異所性妊娠		+	±	△	○
全胎状奇胎		++	-	◎	×

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzumori Nobuhiro, Sekizawa Akihiko, and, Masuzaki Hideaki (41人中14番目) et al.	4. 巻 256
2. 論文標題 Retrospective details of false-positive and false-negative results in non-invasive prenatal testing for fetal trisomies 21, 18 and 13	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 75 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejogrb.2020.10.050	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitajima Michio, Matsumoto Kanako, Murakami Naoko, Kajimura Itsuki, Harada Ayumi, Kitajima Yuriko, Masuzaki Hideaki, Miura Kiyonori	4. 巻 7
2. 論文標題 AMH Concentrations in Peritoneal Fluids of Women With and Without Endometriosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Surgery	6. 最初と最後の頁 600202-600202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fsurg.2020.600202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitajima Michio, Matsumoto Kanako, Murakami Naoko, Harada Ayumi, Kitajima Yuriko, Masuzaki Hideaki, Miura Kiyonori	4. 巻 19
2. 論文標題 Ovarian reserve after three step laparoscopic surgery for endometriomas utilizing dienogest: A pilot study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 425 ~ 431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konno Hiroko, Murakoshi Takeshi, Miura Kiyonori, Masuzaki Hideaki	4. 巻 23
2. 論文標題 The Incidence of Dichorionic Diamniotic Twin Pregnancy After Single Blastocyst Embryo Transfer and Zygosity: 8 Years of Single-Center Experience	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Twin Research and Human Genetics	6. 最初と最後の頁 51 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/thg.2020.5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashita Sayaka, Matsuda Katsuya, Kondo Hisayoshi, Kitajima Yuriko, Hasegawa Yuri, Shimada Takako, Kitajima Michio, Miura Kiyonori, Nakashima Masahiro, Masuzaki Hideaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Significance of p53-Binding Protein 1 Nuclear Foci in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions: Association With High-Risk Human Papillomavirus Infection and P16INK4a Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Control	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1073274819901170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi Masashi, Kitajima Michio, Abe Shuhei, Murakami Naoko, Kitajima Yuriko, Miura Kiyonori, Masuzaki Hideaki	4. 巻 39
2. 論文標題 Huge uterine fibroid arising from primary uterine cervical diverticulum: a case report and review of the literatures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology	6. 最初と最後の頁 1186 ~ 1187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01443615.2019.1588237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Naoko, Kitajima Michio, Ohyama Kaname, Aibara Nozomi, Taniguchi Ken, Wei Mian, Kitajima Yuriko, Miura Kiyonori, Masuzaki Hideaki	4. 巻 495
2. 論文標題 Comprehensive immune complexome analysis detects disease-specific immune complex antigens in seminal plasma and follicular fluids derived from infertile men and women	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 545 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2019.05.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzumori N, Sekizawa A, Takeda E, Samura O, Sasaki A, Akaishi R, Wada S, Hamanoue H, Hirahara F, Kuriki H, Sawai H, Nakamura H, Yamada To, Miura K, Masuzaki H	4. 巻 39
2. 論文標題 Classification of factors involved in nonreportable results of noninvasive prenatal testing (NIPT) and prediction of success rate of second NIPT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prenatal Diagnosis	6. 最初と最後の頁 100 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pd.5408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzumori Nobuhiro, Sekizawa Akihiko, Ebara Takeshi, Samura Osamu, Sasaki Aiko, Akaishi Rina, Wada Seiji, Hamanoue Haruka, Hirahara Fumiki, Izumi Haruna, Sawai Hideaki, Nakamura Hiroaki, Yamada Takahiro, Miura Kiyonori, Masuzaki Hideaki	4. 巻 224
2. 論文標題 Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma for the prediction of hypertensive disorders of pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 165 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejogrb.2018.03.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Yuko, Miura Kiyonori, Sato Shuntaro, Higashijima Ai, Hasegawa Yuri, Miura Shoko, Yoshiura Koh-ichiro, Masuzaki Hideaki	4. 巻 44
2. 論文標題 Reference values for circulating pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 840 ~ 851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fuchi Naoki, Miura Kiyonori, Tsukiyama Takashi, Sasaki Daisuke, Ishihara Kaori, Tsuruda Kazuto, Hasegawa Hiroo, Miura Shoko, Yanagihara Katsunori, Masuzaki Hideaki	4. 巻 217
2. 論文標題 Natural Course of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral DNA Levels in Carriers During Pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiy017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura K, Hasegawa Y, Yamada M, Higashijima A, Miura S, Kaneuchi M, and Masuzaki H	4. 巻 39
2. 論文標題 Expression levels of C19MC and C14MC microRNAs in complete hydatidiform moles and ovarian mature cystic teratomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Gynaecological Oncology	6. 最初と最後の頁 277-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12892/ejgo4014.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fuchi N, Miura K, Doi H, Li TS and Masuzaki H	4. 巻 62
2. 論文標題 Fetiform teratoma was a parthenogenetic tumour arising from a mature ovum	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 803-808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/jhg.2017.45	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Miura K, Higashijima A, Miura S, Hasegawa Y, Masuzaki H
2. 発表標題 Decreased cell-free but not exosomal miR-518b in maternal plasma is caused by amniocentesis
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦清徳、尾崎 守、長谷川ゆり、三浦生子、増崎英明
2. 発表標題 母体血を用いた胎児染色体検査で13トリソミー偽陽性であった1例
3. 学会等名 第25回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hideaki Masuzaki	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 354
3. 書名 Fetal Morph Functional Diagnosis	

〔産業財産権〕



〔その他〕

長崎大学産婦人科  
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/gyneclogy/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三浦 清徳  (MIURA KIYONORI)  (00363490)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授    (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------