

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：2018～2022

課題番号：18K09265

研究課題名(和文) 胎児機能における羊水由来間葉系幹細胞・エクソソームの役割と臨床的意義に関する研究

研究課題名(英文) Amniotic fluid derived mesenchymal stem cells and exosomes in fetal function

研究代表者

三浦 生子 (MIURA, SHOKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：00404301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題により、妊娠16週と妊娠38週とで羊水中への流入量が有意に変化するmRNAならびにmicroRNAが検出された。これらは胎児成熟度を評価する新たな分子マーカーである可能性ある。抽出されたmicroRNAとmRNAとの関係をTarget Scan Humanで検索したところ、432-5pは食道や腎臓、脳に発現しているMAL遺伝子を、193-5pは肺や消化管などに発現している3つのmRNAをターゲットとしていた。MALやサーファクタントタンパク質BやCなどのmRNAが、妊娠38週の羊水中で有意に流入量が上昇していた。これらは胎児成熟度を評価する新たな分子マーカーである可能性ある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により、現時点の臨床ですでに可能な胎児の肺成熟の評価に加え、全身臓器の胎児成熟を評価し得る分子マーカーを同定した。今後、正常妊娠群と産科疾患群あるいは胎児疾患群とで胎児成熟と関連する遺伝子発現量を比較することで、分子マーカーによる胎児成熟評価法の開発のみならず、産科疾患や胎児疾患の重症度評価に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, mRNAs and microRNAs that significantly change in the amniotic fluid at 16 and 38 weeks' gestation were detected. These may be new molecular markers for evaluating fetal maturity. Target Scan Human search for the relationship between the extracted microRNAs and mRNAs revealed that 432-5p targeted the MAL gene expressed in esophagus, kidney, and brain, and 193-5p targeted three mRNAs expressed in lung and gastrointestinal tract. mRNAs such as surfactant proteins B and C had significantly elevated influxes in amniotic fluid at 38 weeks gestation. These may be new molecular markers for assessing fetal maturity.

研究分野：産婦人科学

キーワード：胎児機能 胎児成熟 羊水細胞 エクソソーム 間葉系幹細胞 mRNA microRNA

1. 研究開始当初の背景

・**胎児機能評価とその限界**: 現在の産婦人科臨床で用いられている検査法では、羊水を用いて胎児肺成熟度を評価することはできるが、一般的に、胎児神経系の発達度や胎児消化管の成熟度など、肺以外の胎児機能の成熟度を評価することは難しい。胎児神経、内分泌代謝や消化管などの臓器の発達・成熟度などの胎児機能が出生前に正確に評価可能になれば、より詳細な胎児モニタリングが可能になり、周産期医療の向上に寄与するばかりか、子宮内での胎児機能確立のメカニズム解明に大いに貢献すると期待される。

・**羊水と母体血漿中のエクソソーム**: 様々な胎児臓器機能を評価するターゲットとして、羊水および母体血漿中のエクソソームに内包された胎児由来 mRNA/microRNA が注目される (Mitchell et al. AJOG 2015;173-181)。エクソソームは、様々な細胞から分泌される膜小胞体 (直径 40-100nm) で、mRNA/microRNA などの情報伝達物質を内包し、体液中でも RNase による分解を免れ安定して存在することができることから、血液などに存在して体内を循環することで、生体内における細胞間コミュニケーション機能の一端を担っている (Valadi et al. Nature Cell Biology 2007 ; 654-659)。エクソソームプロファイルは母体を通じて得られる胎児情報であり (Salmon C et al. PLoS One. 2014;9:e98667)、胎児機能検査法の確立に応用可能と期待される。そのためには、羊水・母体血漿中のエクソソームに内包された mRNA/microRNA プロファイルの妊娠経過に伴う推移を明らかにし、胎児成熟と関連するエクソソームプロファイルの同定が必要である。また、羊水や母体血中エクソソーム内の mRNA/microRNA がどのように生体内で機能し妊娠維持や産科疾患の分子病態形成に関与するのか未だ不明であり、その解明にはエクソソームと産科疾患との関連について胎児由来細胞レベルでの分子解析が必要である。

・**羊水由来間葉系幹細胞**: 胎児由来細胞として、羊水由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) は、自己増殖能、多分化能のみならず、パラクライン効果による免疫調節能、血管新生能を有することから、近年、再生医療の医療資源として注目されている。動物実験では、二分脊椎の胎仔を妊娠したラットの羊水中に羊水由来 MSC を注入することにより、二分脊椎胎仔の皮膚再生が促進されるなど羊水由来 MSC を用いた胎内治療の可能性が報告されている (Dionigi et al. J Pediatr Surg 2015;50:69-73)。また、羊水由来 MSC では、オキシトシンレセプターなどの子宮収縮に関与する遺伝子の発現レベルが妊娠経過に伴い高くなることが報告され (Tsai et al. Stem Cells 2007;25:2511-2523)、羊水由来 MSC の妊娠経過に伴う胎児由来 mRNA/microRNA プロファイルの推移を明らかにすると胎児成熟と関連する mRNA/microRNA プロファイルの同定につながると期待される。妊娠初期の胎盤絨毛において、低酸素環境に応答した MSC から分泌されたエクソソームが血管新生を促進したという報告があり (Salomon et al. PLoS One 2013;8:e68451)、MSC は活性分子の供給源としても注目される。しかし、研究発展への解決すべき課題として、羊水由来 MSC の妊娠経過に伴う RNA プロファイルの推移、培養条件や妊娠背景 (産科疾患の有無など) が羊水由来 MSC のパラクライン効果や免疫調節能に及ぼす影響に関する知見の集積が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、羊水由来 MSC と胎児由来 mRNA/microRNA を内包して羊水および母体血漿中に浮遊しているエクソソームに着目し、様々な胎児臓器の成熟と関連する mRNA/microRNA を同

定し、羊水検査ならびに母体の血液検査による総合的な胎児機能評価法の確立ならびに周産期の再生医療として羊水由来 MSC を用いた胎児治療に向けた新知見の獲得を目指す。

3. 研究の方法

1) 羊水由来 MSC やエクソソームを含む羊水中の RNA プロファイルについて、妊娠経過（妊娠 16 週ならびに妊娠 38 週）に伴う経時的変化を明らかにして、胎児成熟と関連した microRNA 発現パターンを同定する：まず、妊娠 16 週の羊水検査ならびに妊娠 38 週の予定帝王切開時に採取した羊水を一組とした。それぞれ羊水由来 MSC を分離培養し、RNA シークエンス解析を行い、妊娠経過に伴い発現量の変化を示す microRNA を胎児成熟に関連する microRNA の候補としてスクリーニングした(図 1)。次いで、胎児成熟に関連する microRNA の候補を変化の大きいものから順に選定し、リアルタイム RT-PCR 法で確認解析を行った(図 2)。リアルタイム RT-PCR 法の外部コントロールには cel-miR-39、内部コントロールには U6-snRNA を用いた。

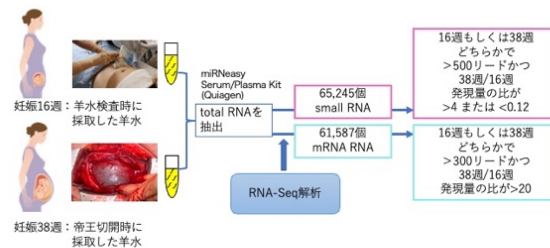


図 1. RNAシークエンス解析による胎児成熟と関連したmRNA/microRNAのスクリーニング

(in preparation)

2) 胎児成熟と関連した microRNA の標的遺伝子(mRNA)を同定する：エクソソームを含む羊水中の RNA プロファイルについて、RNA シークエンス法を用いて解析した(図 1)。そして、前述の microRNA スクリーニングならびに標的遺伝子についてデータベース検索した結果と一致した mRNA/microRNA について、リアルタイム RT-PCR 解析で確認解析を行った(図 2)。また、各 mRNA の機能から成熟の評価対象となる胎児臓器(脳神経系、消化器など)を推定し分類した。

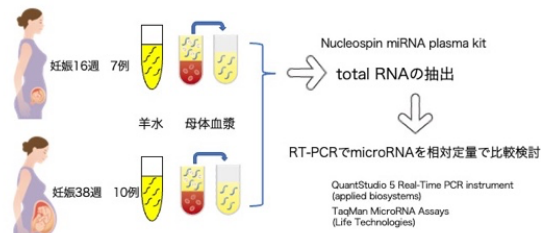


図 2. 羊水中ならびに母体血漿中におけるcell-free mRNAおよびcell-free miRNAの抽出

(in preparation)

4. 研究成果

妊娠経過と共に羊水中で発現量が変化していた microRNA は 11 種類抽出され、そのうち 3 つは C14MC 領域の microRNA であり、胎児成熟を反映しているものと考えられた(表 1)。

表 1. RNA-Seq解析によって抽出されたmicroRNA

microRNA	妊娠16週(TPM)	妊娠38週(TPM)	比 38w/16w	染色体の所在
miR-215-5p	37704.13	213.34	0.006	1q41
miR-192-5p	28099.62	809.23	0.029	11q13.1
miR-3195	529.13	18.17	0.034	20q13.33
miR-194-5p	7341.62	351.11	0.048	1q41
miR-31-5p	685.35	44.13	0.064	9p21.3
miR-449a	872.27	77.24	0.089	5q11.2
miR-127-3p	11357.71	1011.20	0.089	14q32.2
miR-1247-5p	13093.17	1523.83	0.116	14q32.31
miR-432-5p	8317.39	973.95	0.117	14q32.2
miR-193b-5p	545.17	2268.19	4.161	16p13.12
miR-184	227.15	1516.81	6.677	15q25.1

TPM: transcripts per million

(in preparation)

一方、妊娠経過と共に羊水中で発現量が変化していた mRNA は 21 種類であった(表 2)。妊娠 16 週では検出されず妊娠 38 週で検出された mRNA は 6 種類あり、この中には肺からのみ発現しているサーファクタントプロテイン C が含まれており、シー

表 2. RNA-Seq解析によって抽出されたmRNA

mRNA	妊娠16週(TPM)	妊娠38週(TPM)	比 38w/16w	発現部位
APP1	21.30	473.56	22.51	多臓器(脳)
CALML5	0	442.30	-	多臓器(皮膚、唾液腺、食肉)
COX6C	16.11	354.18	21.97	多臓器(心臓、大腸)
CRST1M1	14.61	382.22	26.15	腎、十二指腸
FIS1	11.26	440.37	39.10	多臓器(心臓、甲狀腺)
IFTM2	2.25	408.61	181.56	多臓器(心臓、脾臓)
IFTM3P6	0	310.72	-	多臓器(脳脊、甲狀腺、唾液腺)
IGT5	31.96	894.37	27.98	多臓器(唾液腺、脾臓)
MAPL	47.49	1058.79	22.29	免疫、腎臓、目
NAA10	0	452.17	-	多臓器(心臓、虫歯)
PSCA	5.95	351.70	60.11	腎、膵臓、前立腺
PSMA7	17.73	442.08	24.93	多臓器(脳脊、虫歯)
RPTN	18.21	389.35	21.37	皮膚
RTL8A	1.31	317.98	241.26	多臓器(脳脊、脂肪)
SCGB1A1	2.41	352.69	145.80	肺
SCGB3A1	133.12	6288.04	47.22	肺、唾液腺、胃
SFTA2	0	311.42	-	肺
SFTPB	0.25	539.36	2140.32	肺
SFTPC	0	1192.46	-	肺
SLC25A3	16.33	432.71	26.49	多臓器(心臓)
SMM29	0	348.85	-	多臓器(脳、皮膚)

TPM: transcripts per million * 16w発現なし

(in preparation)

クエンスの妥当性が確認された。また、消化器や中枢神経に発現している mRNA も含まれており、肺以外の臓器の評価も可能になることが示唆された。

抽出された microRNA と mRNA との関係を Target Scan Human で検索したところ、432-5p は食道や腎臓、脳に発現している MAL 遺伝子を、193-5p は肺や消化管などに発現している 3 つの mRNA をターゲットとしていることがわかった (表 3)。

表3. Target Scan Humanを用いたmicroRNAとmRNAとの関連検索

microRNA	38w/16w ratio	染色体の局在	microRNAのターゲットmRNA	38w/16w ratio	mRNAの発現部位
miR-432-5p	0.117	14q32.2	MAL	22.2936643	食道、腎臓、脳
miR-193b-5p	4.161	16p13.12	SCGB3A1 SFTPB SLC25A3	47.22 2140.32 26.49	肺、唾液腺、胃 肺 多臓器(心臓に多い)

次にシーケンスで検出された microRNA ならびに mRNA の羊水中での流入量を複数検体で確認した。シーケンスで妊娠 38 週よりも妊娠 16 週で流入量が多かった microRNA は全ての microRNA で同様に流入量が有意に低値という結果であった (図 3)。

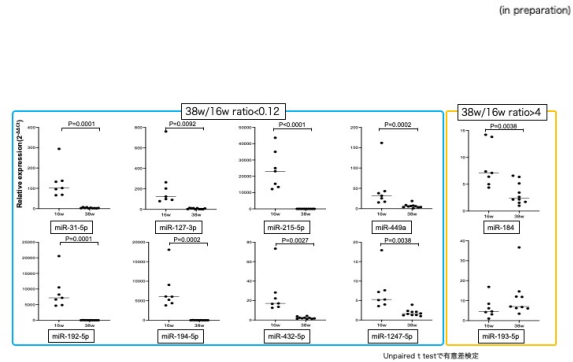


図3. 羊水中cell-free microRNA流入量

しかし、これらの microRNA について母体血漿中での流入量を検討したが、有意差は認められず (図 4)、母体血漿中には反映されていないことが示唆された。

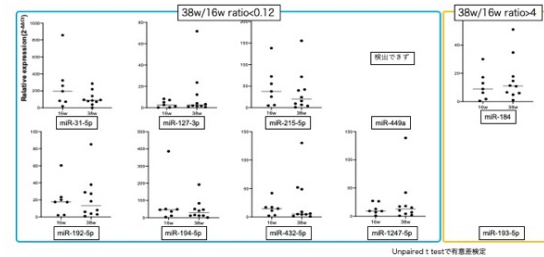


図4. 母体血漿中cell-free microRNA流入量

mRNA について、MAL やサーファクタントタンパク質 B や C などの mRNA が、妊娠 38 週で有意に流入量が上昇していた (図 5)。

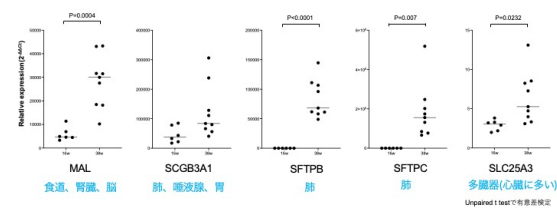
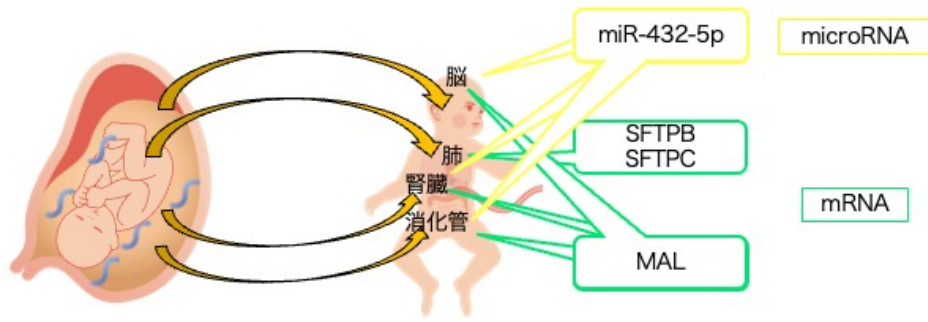


図5. 胎児成熟と関連する羊水中cell-free mRNA流入量

以上より、羊水中の cell-free microRNA および mRNA を検出し定量することが可能であり、妊娠 16 週と妊娠 38 週とで羊水中への流入量が有意に変化する mRNA ならびに microRNA が検出された。これらは胎児成熟度を評価する新たな分子マーカーである可能性ある。本研究課題の成果により、現在の周産期医療で用いられているマイクロバブル検査やシェイク検査による胎児肺成熟の評価に加え、羊水中 cell-free mRNA/microRNA を用いて胎児の全身臓器について成熟度を評価に反映できる可能性が示唆された。

まとめ



羊水中の胎児由来cell-free microRNAおよびmRNAは
胎児成熟を評価できる分子マーカーとなり得る

(in preparation)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 6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 OHASHI KAZUAKI、LI TAO-SHENG、MIURA SHOKO、HASEGAWA YURI、MIURA KIYONORI	4. 巻 42
2. 論文標題 Biological Differences Between Ovarian Cancer-associated Fibroblasts and Contralateral Normal Ovary-derived Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1729 ~ 1737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15649	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 Shigeno Riyoko, Horie Ichiro, Miwa Masaki, Ito Ayako, Haraguchi Ai, Natsuda Shoko, Akazawa Satoru, Nagata Ai, Hasegawa Yuri, Miura Shoko, Miura Kiyonori, Kawakami Atsushi, Abiru Norio	4. 巻 68
2. 論文標題 Bihormonal dysregulation of insulin and glucagon contributes to glucose intolerance development at one year post-delivery in women with gestational diabetes: a prospective cohort study using an early postpartum 75-g glucose tolerance test	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 919 ~ 931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ20-0795	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 三浦 生子、長谷川 ゆり、三浦 清徳	4. 巻 76
2. 論文標題 合併増大号 今月の臨床 産婦人科医が知っておきたい臨床遺伝学のすべて 周産期 羊水検査・絨毛検査の適応と実施法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 62 ~ 68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1409210564	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 三浦 生子、三浦 清徳	4. 巻 75
2. 論文標題 増刊号 産婦人科患者説明ガイド-納得・満足を引き出すために 周産期 出生前診断の検査と処置 絨毛検査を行うにあたっての患者説明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 36 ~ 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1409210291	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 三浦 生子、三浦 清徳	4. 巻 51
2. 論文標題 胎児形態異常、胎児染色体異常の既往	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 577-582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tezuka Kenta, Fuchi Naoki, Okuma Kazu, Tsukiyama Takashi, Miura Shoko, Hasegawa Yuri, Nagata Ai, Komatsu Nahoko, Hasegawa Hiroo, Sasaki Daisuke, Sasaki Eita, Mizukami Takuo, Kuramitsu Madoka, Matsuoka Sahoko, Yanagihara Katsunori, Miura Kiyonori, Hamaguchi Isao	4. 巻 130
2. 論文標題 HTLV-1 targets human placental trophoblasts in seropositive pregnant women	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 6171 ~ 6186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI135525	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 三浦清徳、三浦生子、増崎英明	4. 巻 73
2. 論文標題 NIPTで性染色体数的異常は検出できるか?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 253-257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高尾真未、長谷川ゆり、三浦生子、宮田海香子、松本 正、吉浦孝一郎、三浦清徳
2. 発表標題 IRUDにおける遺伝カウンセリングの検討
3. 学会等名 第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松祐輔、長谷川ゆり、三浦生子、宮田海香子、三浦清徳
2. 発表標題 婦人科悪性腫瘍に対してがんゲノム検査を行った2例
3. 学会等名 第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田海香子、長谷川ゆり、三浦生子、高尾麻未、松本 正、吉浦孝一郎、三浦清徳
2. 発表標題 IRUDにより腎尿管形成不全症と確定した家族との関わり
3. 学会等名 第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦生子、阿部修平、宮田海香子、長谷川ゆり、三浦清徳
2. 発表標題 再発子宮体癌に対しコンパニオン診断としてのMSI検査を施行した一例
3. 学会等名 第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川ゆり、三浦生子、宮田海香子、三浦清徳
2. 発表標題 当院で行っているNIPTに関する遺伝カウンセリングの現状
3. 学会等名 第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 灯, 三浦 清徳, 長谷川 ゆり, 三浦 生子, 増崎 英明
2. 発表標題 BRCA遺伝子検査で病的意義が不明と判定された一例
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 ゆり, 渡名喜 海香子, 原田 亜由美, 阿部 修平, 大橋 和明, 嶋田 貴子, 三浦 生子, 増崎 英明, 三浦 清徳
2. 発表標題 腹膜癌に対する全ての標準治療が無効になりがんゲノム検査を施行した1例
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 灯, 長谷川 ゆり, 永田 典子, 大橋 和明, 阿部 修平, 東島 愛, 松本 加奈子, 三浦 生子, 北島 道夫, 増崎 英明, 三浦 清徳
2. 発表標題 妊婦の心肺停止に対して死戦期帝王切開術を施行した一例
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部 修平, 長谷川 ゆり, 東島 愛, 大橋 和明, 三浦 生子, 増崎 英明, 三浦 清徳
2. 発表標題 巨大児、羊水過多、巨舌の臨床所見により出生前にBeckwith-Wiedemann症候群が疑われた1例
3. 学会等名 第55回日本周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Miura S and Miura K	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. Chapter 22 Gene Disorders and Genetic Counseling	

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学産婦人科 https://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