

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791150
 研究課題名（和文） 母体血中胎児DNAが自己免疫疾患の原因か？－マイクロキメリズムからのアプローチ
 研究課題名（英文） Do fetal DNAs in maternal blood cause autoimmune disease?
 研究代表者 山崎 健太郎（YAMASAKI KENTARO）
 長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教
 研究者番号：90380899

研究成果の概要（和文）：哺乳類の生殖において、母体と胎児の間にはマイクロキメリズムが生じる。本研究では、マイクロキメリズムと自己免疫疾患や妊娠中の免疫調節の間に関連があるか調べた。そのため、自己免疫疾患患者や不育症患者血清中のキメラ細胞由来の DNA および mRNA 流入量を定量した。その結果、強皮症患者からはマイクロキメリズムが検出され、その他の疾患からはほとんど検出されなかった。マイクロキメリズムは強皮症と関連がある。

研究成果の概要（英文）：Fetal microchimerism is derived from cell transfers between mother and the fetus during pregnancy. We evaluated the relationship with fetal microchimerism and autoimmune diseases. We performed quantitative PCR which targeted Y-chromosome specific genes in cell free DNAs in plasmas of autoimmune disease patients and RT-PCR which targeted Y-chromosome specific genes in their blood. The PCR products targeted to DYS1 gene were detected from cell free DNA in systemic sclerosis patients, but not in other autoimmune diseases. There was relationships between microchimerism and systemic sclerosis, however other autoimmune diseases which contains systemic lupus, antiphospholipid antibody syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学、マイクロキメリズム、自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は一般に男性よりも女性に多く、生殖年齢において好発することが知られ

ている。その原因は現在のところ不明であるが、研究開始当初、様々な自己免疫疾患においてマイクロキメリズムとの関連が示唆され

ていた (Nelson JL, Arthritis and Rheumatism, 2002)。マイクロキメリズムの成因としては輸血、他家臓器移植、妊娠などが主なものと考えられている。通常、胎児と母体間には胎盤-母体血液関門が存在し、両者の間では低分子の物質のみが互いに輸送されているが、ごく少量の細胞も互いの血液中に存在することが示されている。母体血中にも胎児細胞が流入しており、その正確な頻度は明らかではないが、胎児由来細胞が母体の様々な臓器に生着することが知られており、いったん生着した細胞は妊娠終了後も存続すると考えられている。この状態がマイクロキメリズムであり、男児の分娩歴がある女性で肝臓に Y 染色体を持つ細胞が確認された例 (Stevens AM et al., Laboratory Investigation, 2004) や多型紅班を呈した妊婦の皮膚に胎児由来の細胞が存在していること (Aractingi S et al., Lancet, 1998) など、いくつかの報告がある。医源性のマイクロキメリズムとしては移植手術があげられるが、移植術後に発生する慢性移植片対宿主病 (chronic graft-versus-host disease; chronic GVHD) の症状は自己免疫疾患のシェーグレン症候群や強皮症に似た症状を呈する。このようなことからマイクロキメリズムが自己免疫疾患と関連性があることは以前から指摘されていた。

2. 研究の目的

研究開始当初において、出生前診断の材料として妊娠母体血漿中の胎児 DNA/RNA が有用であると注目されていた (Lo YMD and Chiu WK, Nature Reviews Genetics, 2007)。我々は研究開始以前に、妊娠母体血漿中の胎児 DNA を用いて、その主な供給源の一つが胎盤であることを明らかにしている (Masuzaki H et al., J Med Genet., 2004)。また母体血漿中胎児 DNA を用いた出生前診断が胎児が男児であることに制限があるのに対して、胎盤特異的に発現している遺伝子をターゲットにし、母体血漿中の mRNA を胎盤特異的な分子マーカーとして用い、双胎間輸血症候群の予測因子としての有用性について検討している (Miura K et al., 2007)。これらの研究における極少量の核酸の定量および識別法を応用し、自己免疫疾患患者血清中のキメラ細胞由来の DNA および mRNA 流入量を定量し、マイクロキメリズムと自己免疫疾患の関連を明らかにすることおよび、キメラ細胞由来の DNA と mRNA が自己免疫疾患の新たな分子マーカーとしての有用性について検討すること、そして自己抗体や自己免疫が原因と考えられる習慣性流産および不育症患者における分子マーカーとしての可能性を探ることが本研究の主な目的である。

3. 研究の方法

(1) 胎児由来細胞のマイクロキメリズムと自己免疫疾患の関連

自己免疫疾患の患者血清中からの DNA (cell-free DNA; cf-DNA) を用いて、Y 染色体上のターゲット遺伝子を PCR を用いて検出し、キメラ細胞由来の cf-DNA が患者血清中で確認する。

(2) 上記研究方法(1)と同様に Y 染色体上の遺伝子をターゲットにして、患者血清中から抽出した cf-DNA および患者全血中から抽出した mRNA を定量的 PCR を用いて、定量を行う。

(3) 疾患、妊娠歴、臨床症状とその流入量の関連を明らかにする。また、従来使用されている自己免疫疾患の病態を現す臨床検査データと比較し、同疾患の新たな分子マーカーとしての有用性について検討する。

(4) 習慣性流産、不育症の分子マーカーとしての有用性について検討する

4. 研究成果

(1) 長崎大学病院の皮膚科および内科膠原病班の協力を得て、該当科外来で研究産科の同意を得た方から血液を採取した。患者血清は強皮症 40 例、強皮症以外の自己免疫疾患例 22 例を集積した。

集積した検体について、Y 染色体上の DYS1 遺伝子および SRY 遺伝子をターゲットにして conventional な PCR を行い、cf-DNA 中にターゲット遺伝子が存在するかどうか検証した。その結果、conventional な PCR による遺伝子増幅法と肉眼的な DNA 検出方法では、PCR による増幅産物が、陰性コントロールと比べて有意に増幅されていることを証明できなかった。

(2) そこで、同 DYS1 遺伝子および SRY 遺伝子をターゲットとした TaqMan プローブを作成し、Roche Applied Science 社の Light Cycler 480 で定量的 PCR を行った。その結果、DYS1 をターゲットとしたプローブで 62 例中、10 例においてマイクロキメリズム由来の DNA が検出された。その 10 例は全て強皮症の症例であり、強皮症以外の自己免疫疾患では患者血清から抽出した cf-DNA からは Y 染色体由来の遺伝子増幅産物は検出されなかった。また、SRY をターゲットとしたプローブでは検出された検体はなかった。

DYS1 プローブで増幅された遺伝子産物は全て、検出限界付近であり、正常男性の血清中 DNA (cf-DNA) 中の遺伝子量と比較すると、相対的に 1/8 以下の量しか存在しなかった。

Y 染色体上に存在する minor

histocompatibility antigen (mHA) をコードする SMCY 遺伝子の TaqMan プローブをデザインし、患者全血中から抽出した mRNA を用いて、定量的 PCR を行ったが、同プローブでは増幅産物は検出されなかった。そのため、ターゲットを変更して、mHA の一つである DBY 遺伝子のプローブも作成したが、結果は同様であった。

(3) 疾患としては、上記に述べたように強皮症例においてのみ、マイクロキメリズム由来の遺伝子産物が検出された。DYS1 プローブで検出された例における、妊娠分娩歴との関連は、妊娠分娩歴がない者が 1 名存在し、当患者の母親由来のマイクロキメリズムの存在や症状に自覚のない流産歴の存在が考えられた。

(4) 長崎大学病院産婦人科において、同意の得られた習慣性流産と不育症の方の患者血清を 23 例集積した。この検体についても cf-DNA を用いて、DYS1 プローブで定量的 PCR を行ったが、DYS1 遺伝子産物は検出されなかった。

上記結果から、胎児由来細胞のマイクロキメリズムは強皮症の症例では確認できたが、強皮症以外の自己免疫疾患では検出されなかった。また、マイクロキメリズムが検出された例においても、母体血清中のマイクロキメリズム由来 DNA はごくわずかで、定量的実験を行うには、多量の母体血清が必要とすることが分かった。

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 7 件)

- 1) Shimada T, Yamaguchi N, Nishida N, Yamasaki K, Miura K, Katamine S, Masuzaki H., Human Papillomavirus DNA in Plasma of Patients with HPV16 DNA-positive Uterine Cervical Cancer. Jpn J Clin Oncol. 2010 Feb 4, 査読有り.
- 2) 三浦清徳, 山崎健太郎, 三浦生子, 嶋田貴子, 藤本洋子, 吉田敦, 中山大介, 増崎英明. 早産重症胎児発育不全 severe preterm FGR(IUGR) 病因と病態 Severe preterm IUGRにおける confined placental mosaicism の関与 特に周産期から出生後 12 ヶ月について., 周産期シンポジウム 27 号, Page25-29, 2009, 査読無し.
- 3) 三浦清徳, 山崎健太郎, 三浦生子, 中山大

介, 増崎英明. TTTS のリスクを推定する分子診断法の確立を目指して母体血漿中胎盤由来 mRNA を用いた検討. 日本産婦人科・新生児血液学会誌 18 巻 2 号 Page107-113, 2009, 査読無し.

- 4) 山崎健太郎, 増崎英明. 画像でみる産科学 IUGR(胎児発育不全). ペリネイタルケア 28 巻 1 号 Page6-9, 2009, 査読無し.
- 5) Miura K, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H., Increased level of cell-free placental mRNA in a subgroup of placenta previa that needs hysterectomy. Prenat Diagn. 2008 Sep;28(9):805-9, 査読有り.
- 6) Yoshida S, Miura K, Yamasaki K, Miura S, Shimada T, Tanigawa T, Yoshida A, Nakayama D, Masuzaki H., Does increased nuchal translucency indicate a fetal abnormality? A retrospective study to clarify the clinical significance of nuchal translucency in Japan. J Hum Genet. 2008;53(8):688-93. Epub 2008 May 24, 査読有り.
- 7) 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 吉田敦, 平木宏一, 中山大介, 増崎英明. Discordant twins の病態に関する検討. 産婦人科の実際 57 巻 10 号 Page1575-1581, 2008, 査読無し.

[学会発表] (計 12 件)

- 1) 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 小寺宏平, 藤下晃, 鮫島哲郎, 村上誠, 吉浦孝一郎, 増崎英明. 長崎県の HPV-DNA 型分布とその意味. 第 34 回長崎感染症研究会 (長崎市, 2010/3/6)
- 2) 山崎健太郎. 長崎県の HPV-DNA 型分布とその意味. 第 48 回臨床細胞学会 (福岡市, 2009/10/31)
- 3) Kentaro Yamasaki, Kiyonori Miura, Shoko Miura, Takako Shimada, Akira Fujishita, Makoto Murakami, Tetsuro Sameshima, Ko-ichiro Yoshiura and Hideaki Masuzaki., The difference of HPV (human papillomavirus) DNA genotypes may influence the speed of carcinogenesis in cervical squamous intraepithelial lesions among Japanese patients., The 59th American Society of Human Genetics (Hawaii, 2009/10/20-24)
- 4) 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 藤下晃, 鮫島哲郎, 村上誠, 吉浦

孝一郎、増崎英明. 長崎におけるHPV-DNA型の頻度と持続感染に関する報告. 第54回日本人類遺伝学会(東京都、2009/9/23-26)

- 5) 山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、嶋田貴子、藤下晃、鮫島哲郎、村上誠、吉浦孝一郎、増崎英明. 長崎県における組織診断別のHPV-DNA型頻度について. 第46回日本婦人科腫瘍学会(新潟市、2009/7/10-12)
- 6) 山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、嶋田貴子、藤下晃、鮫島哲郎、村上誠、吉浦孝一郎、増崎英明. 子宮頸部細胞診とヒトパピローマウイルス感染の経時的変化に関する検討. 第61回日本産科婦人科学会(京都府、2009/4/3-5)
- 7) 山崎健太郎、三浦清徳、吉田敦、松本由有子、増崎英明. NT肥厚を認めた13q-症候群の一例. 第12回胎児遺伝子診断研究会(兵庫県、2009/2)
- 8) 山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、嶋田貴子、藤下晃、鮫島哲郎、村上誠、吉浦孝一郎、増崎英明. 長崎県のHPV-DNA型頻度. 第38回長崎感染症研究会(長崎市、2009/2/28)
- 9) Kentaro Yamasaki, Yuichiro Ikeda, Kiyonori Miura, Shoko Miura, Shigo Yoshida, Takako Shimada, Terumi Tanigawa, Daisuke Nakayama and Hideaki Masuzaki. Discordant nuchal translucency thickness in monozygotic twins may be an early finding of TTTS. The 6th Korea-Japan Ultrasound Symposium (Kawagoe Clinic, Saitama Medical University, November 1, 2008)
- 10) 山崎健太郎、三浦清徳、吉田敦、松本由有子、増崎英明. NT肥厚を認めた13q-症候群の1例. 第15回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 H20年10月19日(大分県医師会館、大分県)
- 11) 山崎健太郎、三浦清徳、池本理恵、三浦生子、嶋田貴子、藤下晃、鮫島哲郎、村上誠、吉浦孝一郎、増崎英明. HPV感染と細胞診判定の経時的変化について. 第47回日本臨床細胞学会秋季大会 H20年11月14日、15日(グランドプリンスホテル新高輪、東京都)
- 12) 山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、嶋田

貴子、中山大介、川上純、小川文秀、江口勝美、佐藤伸一、増崎英明. 自己免疫疾患におけるマイクロキメリズムの関与に関する検討. 第53回日本人類遺伝学会(パシフィコ横浜、2008.9.27-30)

〔図書〕(計1件)

新川詔夫、吉浦孝一郎、山崎健太郎、他共著者19名. メディカルサイエンスインターナショナル、カラー図解:基礎から疾患までわかる遺伝学. 2009, p408-413.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 健太郎 (YAMASAKI KENTARO)

長崎大学・医歯薬総合研究科・助教

研究者番号: 90380899