

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791535

研究課題名（和文）：嚢胞化絨毛特異的分子マーカーの同定と絨毛性疾患への臨床応用に関する研究

研究課題名（英文）：Identification of hydatidiform mole-related microRNAs and their clinical signification

研究代表者

三浦 生子 (MIURA SHOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00404301

研究成果の概要（和文）：本研究では、全胎状奇胎特異的 microRNA を網羅的にスクリーニングし、その臨床的有用性について検討した。次世代高速シーケンス法を用いて、正常胎盤組織と比較して全胎状奇胎で 2 倍以上の高発現を認める 22 種類の microRNA を全胎状奇胎特異的 microRNA の候補として抽出した。そのすべてが 19 番染色体上のクラスター（C19MC）領域に存在していた。検証実験として real-time RT-PCR を用いて正常胎盤および全胎状奇胎における発現量を比較し、全胎状奇胎組織特異的 microRNA として hsa-miR-520f、hsa-miR-520b、hsa-miR-520c-3p および has-miR-519b-3p が同定された。全胎状奇胎例における血漿中の hsa-miR-520f 流入量は、正常妊婦におけるそれと比較して有意に上昇していた(Mann-Whitney U test,  $P=0.002$ )。全胎状奇胎 15 例の血漿中 hsa-miR-520f 量は掻爬術前後で有意に減少していた(wilcoxon signed rank test,  $P<0.001$ )。以上より、全胎状奇胎特異的 microRNA は C19MC 領域に存在していた。特に hsa-miR-520f は全胎状奇胎の分子腫瘍マーカーになりうると示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify the microRNA marker of the complete hydatidiform moles (CHMs) in plasma. By next generation sequencing and quantitative RT-PCR analysis, hsa-miR-520f, 520b, 520c-3p and 519b-3p were selected as candidate CHMs-associated microRNAs. The median plasma concentration of cell-free has-miR-520f in CHMs pregnancy was significantly higher than in normal pregnancy (27,194 copies/mL vs 13,118 copies/mL, Mann-Whitney U test,  $P=0.002$ ). In 15 cases of CHMs pregnancy, the plasma concentration of cell-free has-miR-520f after termination of pregnancy was significantly decreased than that before termination of pregnancy (wilcoxon signed rank test,  $P<0.001$ ). In conclusion, the hsa-miR-520f is CHMs-related microRNA and its plasma concentration may be possible molecular marker of complete hydatidiform mole.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：嚢胞化絨毛、分子マーカー、RNA、microRNA、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 妊婦血中胎盤特異的 cell-free microRNA(miRNA)に関する研究成果

miRNAs は、19-25bp の単鎖 RNA であり (Lee and Ambros Science 2001)、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 (Krichevsky et al Nature Genet 2003)。私どもは網羅的解析により妊娠初期および末期の母体血漿中胎盤特異的 cell-free microRNA 約 80 個を同定し、それらは主に 19q13.42 および 14q32.2 の染色体領域にクラスターを形成して存在していることが明らかになった (Miura et al. Clinical Chemistry, 2010)。本成果には、preeclampsia の胎盤で影響を受けている miRNA も含まれており (Zhu et al. Am J Obstet Gynecol 2009)、母体血漿中胎盤特異的 cell-free microRNA の定量化により、胎盤機能の調節機序を評価しようと期待された。また、胎盤特異的 microRNA クラスター領域は、胎盤発育と機能調節に重要と考えられ、その異常が絨毛性疾患の発生メカニズムに関与している可能性が考えられた。

### (2) 嚢胞化絨毛の発症機序に関する遺伝的背景

嚢胞化絨毛を呈する疾患には、androgenesis(雄核発生)由来のもの biparental origin のものが存在している。Androgenesis 由来の胎状奇胎は imprinting 異常が発症原因のひとつと考えられる。一方、家族発症の biparental origin の奇胎には、NLR family, pyrin domain containing 7 (NLRP7) 遺伝子変異を認める例も報告されている。しかし、嚢胞化絨毛の分子遺伝的発症メカニズムは、未だに不明な点が多い。最近の報告から、従来の染色体検査である G-banding 法では検出不可能であるが、マイクロアレイ解析では検出可能な微細欠失あるいは partial UPD などが絨毛性疾患の発症に関連している可能性も考えられる。

以上より、本研究では、cell-free placental microRNA 定量化と胎盤機能に関する私どもの研究成果を胎盤と同じ妊娠産物である絨毛性疾患に応用することで、分子マーカーを用いた絨毛性疾患の網羅的検査法の確立を目指す。さらには、嚢胞化絨毛特異的 cell-free microRNA の同定により、本疾患に重要な染色体領域の同定とその異常(遺伝子変異あるいは多型、マイクロアレイ解析で検出可能な微細欠失あるいは partial UPD

など)との関連を検討して、嚢胞化絨毛発症の分子メカニズムにアプローチすることを着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、絨毛性疾患の患者血中に流入している嚢胞化絨毛特異的 microRNA を同定し、絨毛性疾患の新たな分子腫瘍マーカーとしての臨床的有用性を明らかにする。また、絨毛性疾患における絨毛特異的 microRNA 遺伝子異常の有無を検索し、嚢胞化絨毛発症の分子メカニズム解明の手掛かりを得る。期間内の明確なターゲットとして、以下の3点をあげる。

(1) 網羅的解析により絨毛性疾患の患者血中に流入している嚢胞化絨毛特異的 microRNA を同定する。

(2) 絨毛性疾患の患者血漿中絨毛特異的 cell-free microRNA 定量化の臨床的有用性を明らかにする。

(3) 絨毛特異的 microRNA の染色体局在を明らかにし、微細欠失あるいは partial UPD (uniparental disomy)を含む遺伝子異常の有無を検索することで、本疾患発症の分子メカニズム解明の手掛かりを得る。

## 3. 研究の方法

本研究は倫理委員会の承認を得て、同意のもとに行われた。統計学的有意差は  $p < 0.05$  とした。

### (1) 全胎状奇胎特異的 microRNA の網羅的スクリーニング

全胎状奇胎組織とその患者血液、および正常妊娠例より採取した胎盤組織から microRNA を抽出し、次世代高速シーケンス法により各検体間の発現レベルを比較した。発現レベルは、各検体のリード総数を 10,000,000 リードに補正した値 (million per read) を用いた。血液細胞に発現がなく、かつ正常胎盤組織と比較して奇胎組織で2倍以上発現している microRNA を全胎状奇胎特異的 microRNA の候補としてスクリーニングした。なお、RNA の抽出には mirVana™miRNA 抽出キットを用いた。

### (2) 全胎状奇胎組織における全胎状奇胎特異的 microRNA の発現量に関する検討

(1)でスクリーニングされた microRNA の発現量を検証するために、全胎状奇胎組織 14 例、初期の正常絨毛組織 20 例を対象として、real-time RT-PCR 法を用いて定量し、全胎状奇胎において有意に高発現する microRNA を

全胎状奇胎特異的 microRNA として同定した。定量は絶対定量法を採用した。miRNA TaqMan プローブキットを用いて、PCR 産物を TA クローニングし、それらを定量することで検量線を作成した。定量値はコピー数で算出し、正常妊婦におけるコピー数の中央値で、それぞれの定量値を除して MoM(multiple of median) 値として表した。

### (3) 患者血漿中の全胎状奇胎特異的 microRNA 流入量に関する検討

正常妊婦の血漿と比較して患者血漿中で流入量が上昇している全胎状奇胎特異的 microRNA は、本疾患の腫瘍マーカーになり得る。そこで、全胎状奇胎 15 例、正常初期妊娠 15 例の血漿を対象として、(2) で同定された全胎状奇胎特異的 microRNA の流入量を real-time RT-PCR 法で定量した。正常妊婦と比較して全胎状奇胎例の血漿中で流入量が有意に上昇している全胎状奇胎特異的 microRNA を特定した。

定量は絶対定量法を採用した。miRNA TaqMan プローブキットを用いて、PCR 産物を TA クローニングし、それらを定量することで検量線を作成した。定量値はコピー数で算出された。

### (4) 掻爬術前後における全胎状奇胎特異的 microRNA 流入量の推移に関する検討

全胎状奇胎 15 例の血漿を対象として (3) で特定した microRNA が掻爬術前後でどのように推移するのか検証した。定量値は (3) と同様にコピー数で算出された。

### (5) 微細欠失・UPD の検索

夫婦の末梢血 DNA および嚢胞化絨毛組織 DNA を一組とした。15 種類のマイクロサテライトマーカーを用いて、検体間の遺伝子型を比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 全胎状奇胎特異的 microRNA の網羅的スクリーニング

次世代高速シーケンス法を用いて、正常絨毛組織と比較して全胎状奇胎組織において 2 倍以上の発現を認める 22 種類の全胎状奇胎特異的 microRNA の候補を抽出した (図 1、表 1、最小値-最大値: 2.25 倍-55.75 倍)。そのすべてが 19 番染色体上の 19q13.42 領域にクラスター (C19MC) を形成して存在していた (表 1)。

### (2) 全胎状奇胎組織における全胎状奇胎特異的 microRNA の発現量に関する検討

表 1 の全胎状奇胎特異的 microRNA の候補としてスクリーニングされた 22 個について、定量的 real-time RT-PCR 法を用いて検証実

験を行った。絨毛組織及び全胎状奇胎組織におけるそれぞれの発現量を比較し、全胎状奇胎特異的 microRNA として hsa-miR-520f、hsa-miR-520b、hsa-miR-520c-3p および has-miR-519b-3p が同定された (表 2)。

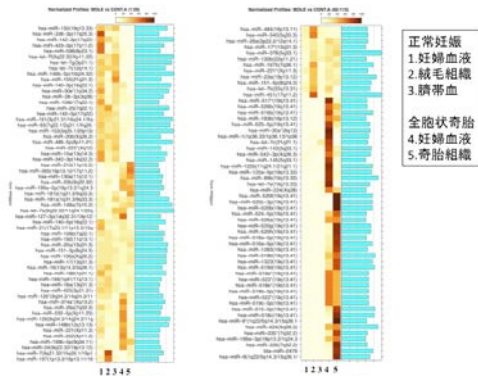


図 1. 次世代高速シーケンス法による発現解析

表 1. 全胎状奇胎特異的 microRNA の候補

microRNA	染色体局在	Fold change	microRNA	染色体局在	Fold change
has-miR-520f	19q13.42	55.75	has-miR-519e	19q13.42	3.69
has-miR-520b	19q13.42	45.19	has-miR-526b*	19q13.42	3.46
has-miR-520c-3p	19q13.42	13.88	has-miR-518d-3p	19q13.42	3.07
has-miR-519b-3p	19q13.42	13.35	has-miR-520h	19q13.42	3.06
has-miR-518c	19q13.42	7.80	has-miR-512-3p	19q13.42	2.99
has-miR-519a	19q13.42	5.57	has-miR-518a-3p	19q13.42	2.61
has-miR-520d-3p	19q13.42	5.11	has-miR-1283	19q13.42	2.56
has-miR-372	19q13.42	4.56	has-miR-518f	19q13.42	2.46
has-miR-520g	19q13.42	4.43	has-miR-516a-5p	19q13.42	2.35
has-miR-515-3p	19q13.42	3.98	has-miR-498	19q13.42	2.30
has-miR-524-3p	19q13.42	3.84	has-miR-373	19q13.42	2.25

表 2. 全胎状奇胎特異的 microRNA

microRNA	絨毛組織における発現量		P 値**
	正常妊婦 (n=20)	全胎状奇胎 (n=14)	
hsa-miR-520f	1.00 (0.01-1.85)	1.89 (0.01-4.23)	<0.001
hsa-miR-520b	1.00 (0.01-2.47)	1.51 (0.02-2.54)	0.013
hsa-miR-520c-3p	1.00 (0.01-1.84)	1.31 (0.01-2.95)	0.008
hsa-miR-519b-3p	1.00 (0.01-1.71)	1.62 (0.01-3.62)	0.012

\* MoM value; Median (Min-Max), \*\*Mann-Whitney U test by SPSS ver18

### (3) 患者血漿中の全胎状奇胎特異的 microRNA 流入量に関する検討

正常妊婦と比較して全胎状奇胎例の血漿中の流入量が有意に上昇している全胎状奇胎特異的 microRNA は、hsa-miR-520f のみであった (表 3. 27,194 copies/mL vs 13,118 copies/mL, Mann-Whitney U test, P=0.002)。その他の全胎状奇胎特異的 microRNA は、正常妊婦と全胎状奇胎例における血漿中の流入量に有意差は認められなかった。

表3. 血漿中のcell-free 全胎状奇胎特異的microRNAの流入量

microRNA	血漿中cell-free microRNA量 (copies/mL)		P値**
	正常妊娠 (n=15)	全胎状奇胎 (n=15)	
hsa-miR-520f	13118 (5233-34279)*	27194 (11298-73268)	0.002
hsa-miR-520b	12483 (3372-35762)	14812 (4948-61264)	0.305
hsa-miR-520c-3p	20538 (6592-42983)	21253 (9329-38212)	0.902
hsa-miR-519b-3p	10374 (2637-15420)	17992 (5377-24729)	0.322

\* Median (Min-Max), \*\* Wilcoxon signed rank test by SPSS ver18

#### (4) 掻爬術前後における全胎状奇胎特異的microRNA 流入量の推移に関する検討

全胎状奇胎 15 例すべてにおいて、血漿中 hsa-miR-520f 流入量は、掻爬術前後で有意に減少していた (図 2. wilcoxon signed rank test,  $P < 0.001$ )。

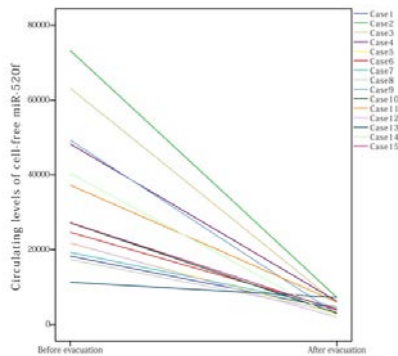


図2. 全胎状奇胎除去前後における血漿中miR-520f流入量の推移  
P<0.001, Wilcoxon signed rank test

#### (5) 微細欠失・UPDの検索

全胎状奇胎と患者及び夫の血液DNAを一組として、計 15 組について DNA 多型マーカーを用いた検体間の比較解析を行ったが、全ての組で染色体の微細欠失の存在は認められなかった。

以上より、本研究課題では全胎状奇胎特異的 microRNA は C19MC 領域に存在し、特に has-miR-520f には胎状奇胎の分子腫瘍マーカーとしての可能性が見出された。また、最近の研究で C19MC 領域は父親由来のアレルから発現するインプリンティング領域であることが明らかになり、嚢胞化絨毛の分子メカニズム解明の手がかりの一つは、C19MC 領域の microRNA の過剰発現と雄核発生との関連に見出される可能性がある。今後は has-miR-520f が調節関与する mRNA を同定して、それらの胎状奇胎における発現解析と機能解析を行い、胎状奇胎発生に関与する遺伝子調節機序を明らかにするとともに正常の胎盤絨毛発生のメカニズム解明につなげ

たい。

#### 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 6 件)

(1) Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, and Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. *Journal of Human Genetics*. 2011;56:296-299.

(2) Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, and Masuzaki H. Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. *Journal of Human Genetics*. 2011;56:313-315.

(3) Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Ikemoto R, Miura S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Pre-vaccination epidemiology of human papillomavirus infections in Japanese women with abnormal cytology. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 37:1666-1670, 2011..

(4) Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of FGFR1. *Human Reproduction* 2010;25:1076-1080..

(5) Miura K, **Miura S**, Yamasaki K, Shimada T, Kinoshita A, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. The possibility of microarray-based analysis using cell-free placental mRNA in maternal plasma. Prenatal Diagnosis 2010; 30:849-861.

(6) Miura K, **Miura S**, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. Clinical Chemistry 2010;56:1767-1771.

[学会発表] (計9件)

(1)2011年8月29-31日 第63回日本産科婦人科学会 (大阪国際会議場、大阪)

全胎状奇胎特異的 microRNA の網羅的解析  
三浦清徳、長谷川ゆり、東島 愛、城 大空、阿部修平、**三浦生子**、山崎健太郎、吉田 敦、吉村秀一郎、吉浦孝一郎、増崎英明

(2)2010年11月10-12日 第55回日本生殖医学会 (徳島市、徳島)

ART 妊娠における母体血漿中 cell-free mRNA レベルに関する検討  
三浦清徳、山崎健太郎、**三浦生子**、東島愛、城 大空、阿部修平、増崎英明

(3)2010年10月27-30日 第55回日本人類遺伝学会 (大宮ソニックシティ、埼玉県)

HELLP 症候群と関連した胎盤特異的 microRNA の網羅的解析  
三浦清徳、東島 愛、**三浦生子**、阿部修平、山崎健太郎、城 大空、長谷川ゆり、中山大介、三嶋博之、木下 晃、吉浦孝一郎、増崎英明

(4)2010年9月30日-10月1日 第18回日本胎盤学会学術集会 (ホテル日航熊本、熊本)

胎盤由来 cell-free mRNA/microRNA の臨床的意義とその応用

三浦清徳、東島 愛、城 大空、長谷川ゆり、**三浦生子**、阿部修平、山崎健太郎、増崎英明

(5)2010年7月11-13日 第46回日本周産期・新生児医学会 (神戸国際会議場、神戸)

新規胎盤特異的 microRNA の網羅的スクリーニング  
三浦清徳、東島 愛、阿部修平、**三浦生子**、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明

(6)2010年7月8-10日 第48回日本婦人科腫瘍学会 (つくば国際会議場、茨城)

妊娠中の子宮頸部細胞診における日母分類、ベセスダシステムおよびHPVスクリーニングの比較  
三浦清徳、山崎健太郎、池本理恵、**三浦生子**、嶋田貴子、濱口大輔、小寺宏平、藤下晃、鮫島哲郎、村上誠、中山大介、吉浦孝一郎、増崎英明

(7)2010年6月25-26日 第20回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 (浜松)

帝王切開術後の危機的出血に対して遺伝子組換え活性化型第VII因子製剤を投与した一例  
阿部修平、三浦清徳、今村健仁、吉田敦、**三浦生子**、中山大介、吉村秀一郎、増崎英明

(8)2010年5月29-31日 第82回日本超音波医学会 (京都)

二卵性一絨毛膜双胎の一例  
三浦清徳、肥後貴史、高橋典子、**三浦生子**、宮本正史、吉田 敦、山崎健太郎、増崎雅子、吉村秀一郎、増崎英明

(9)2010年4月22-25日 第62回日本産科婦人科学会 (東京フォーラム、東京都)

母体血中胎盤特異的 microRNA の分子遺伝学

の特徴と妊娠高血圧症候群における流入パターンに関する検討

三浦清徳、東島 愛、阿部修平、三浦生子、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/gyneclogy/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦 生子 (MIURA SHOKO)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
客員研究員  
研究者番号：00404301

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし