

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791699

研究課題名(和文) 分子レベルでの癒着胎盤の病態解明と新規バイオマーカー診断法の開発

研究課題名(英文) PATHOLOGICAL INVESTIGATION OF PLACENTA PREVIA ACCRETA: THE SITE OF UTERINE WALL AND THE WIDTH/DEPTH OF VILLOUS INVASION

研究代表者

炭竈 誠二 (SUMIGAMA, SEIJI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：50378121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロアレイにて癒着胎盤における高発現遺伝子ADAM8、カテプシンL、カテプシンS、MMP19、ADAM2を抽出。臨床検体でのRT-PCRではいずれも癒着部絨毛にて2-3倍の発現亢進を認めた。病理標本を用いた免疫染色による検討では非癒着部と癒着部の比較にてADAM28、MMP19、カテプシンSでは有意差を認めず、カテプシンLでは胎盤絨毛、EVT共に癒着部で有意に強発現していた。ELISAにより血清カテプシンL濃度を正常妊娠、前置非癒着胎盤、前置癒着胎盤と比較したところ癒着胎盤で有意に高値を示した。以上、癒着胎盤の絨毛浸潤にカテプシンLの関与が示唆され、血清マーカーとしての可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the current study is to examine molecular biological change of trophoblast invasion in placenta accreta by DNA microarray analysis. We isolated villous trophoblast from invasive site and control from non-invasive site in a case of placenta accreta and extracted complementary DNA by RT-PCR. A DNA microarray analysis and Gene ontology analysis extracted overexpressed genes, MMP-19, ADAM-28, cathepsin S and cathepsin L. Immunohistochemistry of accreta cases revealed poor expression of MMP-19 and no difference between invasion and non-invasion site in ADAM-28 and cathepsin S, however a abundant expression of cathepsin L in especially in extra-villous trophoblast in invasion site. The serum cathepsin L level in placenta previa with accreta was significantly higher than those of normal pregnancy and placenta previa with no accreta. Thus, our data suggests a role for cathepsin L in the regulation of abnormal invasion of trophoblast in case of placenta accreta.

研究分野：産婦人科

キーワード：癒着胎盤 血清マーカー

1. 研究開始当初の背景

癒着胎盤は胎盤絨毛が子宮平滑筋層内に浸潤・癒着した稀な病態で、胎盤の剥離困難により多量出血の原因となる重要な疾患である。リスク要因として前置胎盤・帝切既往の合併が知られ今後罹患率の増加が懸念されている。発症メカニズムとして帝切創部などの子宮内膜欠損部への絨毛浸潤が想定されているが、癒着胎盤の病理組織を詳細に検討したところ帝切創部の存在し得ない子宮後壁においても高率に癒着が生じており、絨毛浸潤の課程には絨毛細胞の強い浸潤能亢進と、浸潤を受ける子宮筋層側の浸潤防御機構の障害というそれぞれの要因が存在することが推測された。これまでに絨毛浸潤を促進する分子として MMP、plasminogen activator などが、浸潤を抑制する分子として TGF、TNF、TIMP などが知られているが、癒着胎盤発症に関わる分子は同定されていない。

またこれまで妊娠 14-22 週でのデータにおいて血清中  $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)濃度が癒着胎盤では上昇するとの報告があるが絨毛浸潤との関連は明らかでなく、また妊娠第 3 三半期のデータは報告されていない。

2. 研究の目的

従来の疫学的研究を越えて分子レベルの視点により絨毛の癒着発症メカニズムを解明し、かつ関連タンパクの血清中濃度測定から新たなバイオマーカー診断法の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

癒着胎盤症例より癒着部分の絨毛と非癒着部分の絨毛を採取し全遺伝子を対象に DNA マイクロアレイを施行、発現亢進がみられた遺伝子から gene ontology にて浸潤に関与する遺伝子を抽出。

癒着胎盤症例より抽出した total RNA より realtime RT-PCR を施行。

癒着胎盤症例の病理組織にて免疫染色を施行。絨毛細胞、絨毛膜外トロホプラスト細胞における染色強度をスコアリングして比較。

絨毛細胞の cell line である HTR-8 細胞・HchEpc1b 細胞、絨毛癌の cell line である BeWo 細胞・JEG3 細胞・Jar 細胞を用い、RT-PCR、ウエスタンブロット、siRNA 導入による遺伝子発現抑制と機能解析。

正常妊娠、前置非癒着胎盤、前置癒着胎盤症例において血清の収集と ELISA による血中濃度測定。

4. 研究成果

癒着胎盤症例における癒着部絨毛と非癒着部絨毛より total RNA を抽出し cDNA においてマイクロアレイを行ったところ全

54,357 遺伝子中3倍以上の発現亢進がみられた遺伝子は 104 あった。この中から gene ontology にて浸潤に関与する以下遺伝子を抽出した: ADAM8;4.83 倍、カテプシン L (Cathepsin L, CTSL);3.73 倍、カテプシン S;3.46 倍、MMP19;3.41 倍、ADAM28;3.1 倍。同一症例を含む癒着胎盤 3 症例より抽出した total RNA より real time RT-PCR を行ったところ、いずれの遺伝子においても癒着部絨毛にて 2.4-3.1 倍の発現亢進を確認した。

In vitro において、それぞれの cell line において RT-PCR、ウエスタンブロットを行ったところ、Jar, JEG3, HTR8, BeWo, HchEpc1b においてカテプシン L 発現が確認され、とくに HTR8, BeWo 細胞で強く発現していた。(図 1)

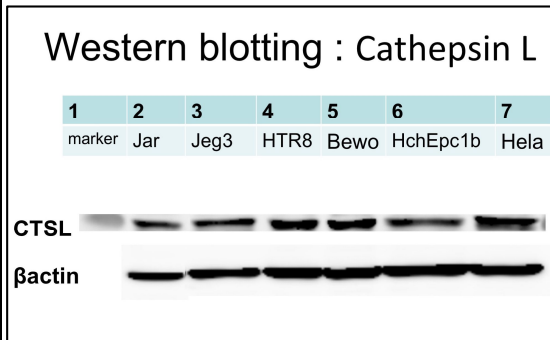


図 1. 細胞株におけるカテプシン L 発現

栄養膜外トロホプラスト細胞の cell line である HTR-8 細胞・HchEpc1b 細胞にリポフェクトアミン法にて siRNA 導入を試みたがカテプシン L 発現は期待通りに抑制されず、それぞれ約 13%・20%の低下を示すのみであった。そこで方法を変え、HTR8 細胞に対しエレクトロポレーション法にて siRNA 導入を行い遺伝子発現抑制を試みたが約 30%の抑制を示すのみであった(図 2)。また絨毛癌細胞株であ

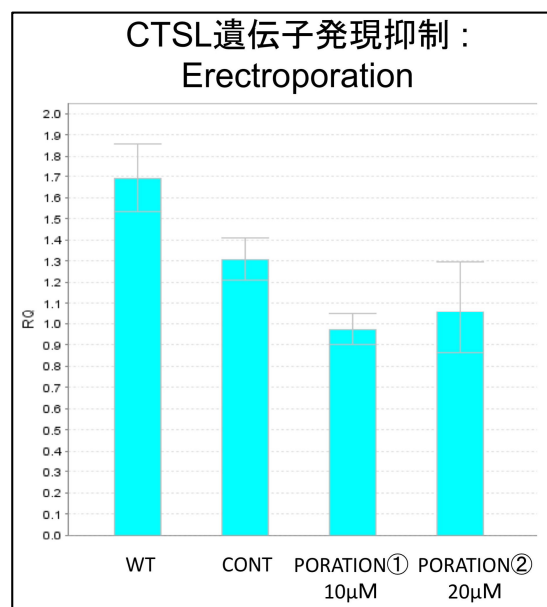


図 2 HTR8 細胞における遺伝子発現抑制

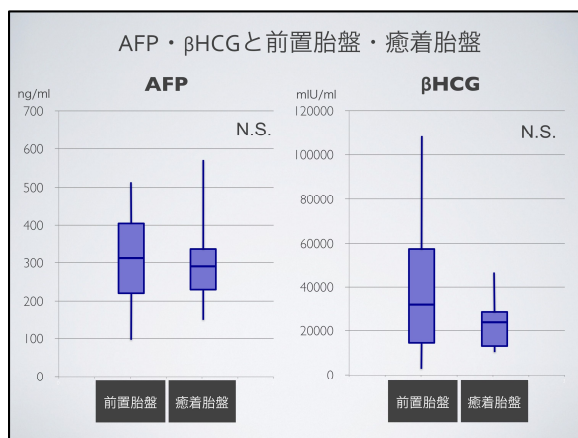


図 3 従来の血清マーカーの検討

る BeWo 細胞、JEG3 細胞を用いても期待どおり導入できなかった。

癒着胎盤 23 症例において、病理検体の免疫染色から染色強度をスコアリング(0-3)し同一症例内の非癒着部と癒着部における各マーカーの発現強度を比較した。それぞれ(非癒着部)vs(癒着部)の中央値(最小-最大)(以下同)の比較において ADAM28: 0(0-1) vs 0(0-1)、MMP19: 2(1-3) vs 2(1-3)、カテプシン S: 0(0-2) vs 0(0-2)と有意差を認めなかった。カテプシン L は胎盤絨毛、EVT が染色され、共に非癒着部に比べ癒着部で濃く染色された。スコアリングでは(非癒着部) vs (癒着部)の中央値(最小-最大)= 2(1-3) vs 3(1-3)であり統計学的に有意差を認めた。癒着胎盤の血清マーカーとしてこれまで報告されている AFP、HCG について、前置非癒着胎盤と前置癒着胎盤において血清濃度を比較すると AFP(ng/ml):  $313 \pm 122$  vs  $317 \pm 112$  で P 値 0.91、HCG( $\times 10$  IU/L):  $3.66 \pm 2.53$  vs  $2.96 \pm 1.83$  で P 値 0.34 とともに差を認めずマーカーとしての意義を確認できなかったが(図 3)、ELISA により血清カテプシン L 濃度を定量し正常妊娠、前置非癒着胎盤、前置癒着胎盤で比較したところそれぞれ中央値(四分位範囲)(ng/ml)は正常妊

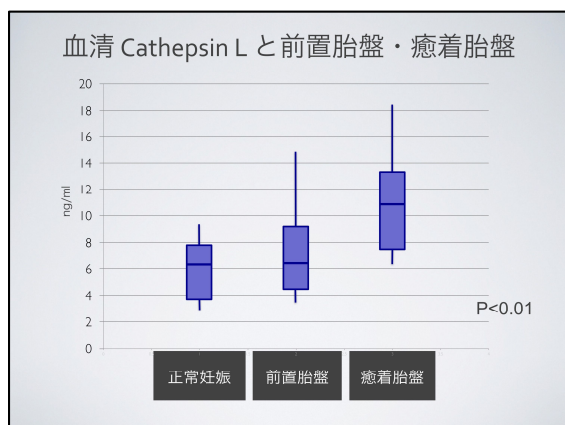


図 4. 新規血清マーカーとしてのカテプシン L

娠 :6.23(3.85-7.92)、前置非癒着胎盤 :6.37(4.44-9.23)、前置癒着胎盤 :10.89(7.54-14.05)であり、癒着胎盤で有意に高値を示した(vs 正常妊娠:  $P < 0.01$ 、vs 前置非癒着胎盤:  $P < 0.05$ 、図 4)。

以上より癒着胎盤の絨毛浸潤にカテプシン L の関与が示唆され、また血清中の疾患特異的分子マーカーとしての可能性が示された。

## 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 3 件)

Sumigama, S., Surgical techniques at caesarean might modify placenta accreta risk Reply, BJOG-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY、査読あり、122 巻 1 号、2015、pp. 144-144  
DOI: 10.1111/1471-0528.13203

Sumigama, S., Sugiyama, C., Kotani, T., Hayakawa, H., Inoue, A., Mano, Y., Tsuda, H., Furuhashi, M., Yamamuro, O., Kinoshita, Y., Okamoto, T., Nakamura, H., Matsusawa, K., Sakakibara, K., Oguchi, H., Kawai, M., Shimoyama, Y., Tamakoshi, K., Kikkawa, F., Uterine sutures at prior caesarean section and placenta accreta in subsequent pregnancy: a case-control study, BJOG-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY、査読あり、121 巻 7 号、2014、pp. 866-874  
DOI: 10.1111/1471-0528.12717

炭竈誠二、吉川史隆、帝王切開後の子宮前壁楔状欠損と筋層菲薄化に関する検討、産婦人科の実際、査読なし、62 巻 5 号、2013、pp. 719-724

[学会発表](計 12 件)

炭竈誠二、癒着胎盤における遺伝子発現解析と新規血清マーカーの可能性、シンポジウム、第 23 回日本胎盤学会学術集会、2015 年 11 月 5-6 日、東京都千代田区、JA 共済ビルカンファレンスホール

森山佳則、炭竈誠二、平光志麻、牛田貴文、澤田雅子、今井健史、諸井博明、中野知子、眞野由紀雄、津田弘之、小谷友美、吉川史隆、本邦における帝王切開術式と TOLAC に関する全国調査、第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、2015 年 4 月 9-12 日、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜

S. Sumigama, Y. Moriyama, Y. Ito, K.

Imai, H. Moroi, S. Hirako, T. Nakano, H. Tsuda, T. Kotani, F. Kikkawa、 VARIATIONS IN SUTURE TECHNIQUES AT CESAREAN SECTION AND ITS RELATION TO COMPLICATIONS IN SUBSEQUENT PREGNANCIES、The 22<sup>nd</sup> World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology and Infertility (COGI)、2015年9月18日、ブダペスト、ハンガリー

炭竈誠二、小谷友美、津田弘之、眞野由紀雄、牛田貴文、諸井博明、澤田雅子、中野知子、今井健史、服部友香、渡部百合子、吉川史隆、癒着胎盤における治療戦略 総腸骨動脈バルーン遮断術 (CIABO) は有効か?、第66回日本産科婦人科学会学術講演会、2014年4月18-20日、東京都千代田区、東京国際フォーラム

炭竈誠二、眞野由紀雄、津田弘之、小谷友美、吉川史隆、当院における癒着胎盤手術の実際と工夫、第37回日本産婦人科手術学会学術集会、2014年10月11-12日、北海道札幌市、京王プラザホテル

杉山知里、炭竈誠二、眞野由紀雄、津田弘之、小谷友美、吉川史隆、帝王切開術式の差異による次回妊娠時の癒着胎盤発症リスク、第37回日本産婦人科手術学会学術集会、2014年10月11-12日、北海道札幌市、京王プラザホテル

松川哲、炭竈誠二、小谷友美、津田弘之、眞野由紀雄、渡部百合子、服部友香、中野知子、今井健史、澤田雅子、諸井博明、吉川史隆、癒着胎盤における遺伝子発現解析、第65回日本産科婦人科学会学術講演会、2013年5月10-12日、北海道札幌市、ロイトン札幌

炭竈誠二、小谷友美、津田弘之、眞野由紀雄、松川哲、渡部百合子、服部友香、中野知子、諸井博明、今井健史、高橋秀憲、吉川史隆、帝王切開後の子宮前壁楔状欠損の発生とリスク因子、第48回日本周産期新生児医学会学術講演会、2013年7月14-16日、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜

炭竈誠二、小谷友美、渡部百合子、森山佳則、村岡彩子、平光志麻、牛田貴文、諸井博明、今井健史、中野知子、服部友香、眞野由紀雄、津田弘之、柴田清住、吉川史隆、帝王切開後の子宮筋層創部欠損の頻度と様式-縫合糸の選択を含めたリスク因子の検討-、第36回日本産婦人科手術学会学術集会、2013年9月28-29日、東京都千代田区、日経ホール

Sumigama S, Hirako S, Nakano T, Mano Y, Tsuda H, Kotani T, Kikkawa F、Continuous Sutures of the Uterine Myometrium as a Possible Risk Factor for Placenta Accreta in Subsequent Pregnancy、SGI 61st Annual Scientific Meeting、2013年3月26-29日、フィレンツェ、イタリア

炭竈誠二、癒着胎盤における子宮全摘術術前の画像診断に基づいて、第21回日本胎盤学会学術集会、2013年10月26日、愛知県名古屋市、ウインク愛知

Matsukawa S, Sumigama S, Nakano T Hattori Y, Watanabe Y, Mano Y, Tsuda H, Kotani T, Kikkawa F、DNA microarray analysis of invasive trophoblast in placenta accreta、18th IFPA conference、2012年9月18-21日、広島県広島市、広島国際会議場

〔図書〕(計 3 件)

炭竈誠二、【よくわかる検査と診断】第1章 周産期分野 分娩時の異常 癒着胎盤、産科と婦人科、82巻増刊、2015、総436ページ、pp. 114-117

炭竈誠二、【産科診療 Q&A】D 妊娠中期・後期・産褥期の異常・処置 帝王切開妊婦が前置胎盤であったときの管理法、2015、総264ページ、pp. 89-93

炭竈誠二、【周産期の画像診断 第2版】母体・胎児編 超音波診断 H.胎盤・臍帯・羊水 前置胎盤・癒着胎盤、周産期医学、43巻増刊、2013、総742ページ、pp. 242-247

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

炭竈 誠二 (SUMIGAMA, Seiji)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：50378121

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

渡部 百合子 (WATANABE, Yuriko)

中部ろうさい病院・産婦人科・副部長

服部 友香 (HATTORI, Yuka)  
名古屋掖済会病院・産婦人科・医長

松川 哲 (MATSUKAWA, Satoshi)  
小牧市民病院・産婦人科・医長