

研究種目：基盤研究 (C) (一般)

研究期間：2007-2008

課題番号：19591897

研究課題名 (和文) マイクロキメリズムから見た妊娠と自己免疫疾患の関連-分子遺伝学的アプローチ-

研究課題名 (英文) Fetomaternal microchimerism and autoimmune disease: molecular genetical approach

研究代表者

中山 大介 (NAKAYAMA DAISUKE)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 50315248

研究成果の概要：

自己免疫疾患の多くは女性に多く、妊娠により症状が変化するが、そのメカニズムは不明である。本研究では妊娠中に胎児細胞が母体血中に混入して母児の融合細胞を生じる現象（マイクロキメリズム）に着目し、自己免疫疾患のひとつである全身性強皮症患者を対象として患者血中から胎児 DNA の検出を試みた。全身性強皮症患者では、他の自己免疫疾患患者と比較して血中に胎児由来の DNA が高い割合で検出され、マイクロキメリズムが発症に関与していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

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：母体血漿 DNA 自己免疫疾患 Y染色体 PCR リアルタイムPCR マイクロキメリズム 全身性強皮症

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫疾患は妊娠可能年齢の女性に発症することが多い。自己免疫疾患の活動性はしばしば妊娠によって修飾され、逆に自己

免疫疾患を原因とする妊娠中の合併症も少なくない。習慣流産、妊娠高血圧症候群、静脈血栓症、胎児発育遅延、死産あるいは新生児死亡などがある。

(2) 妊娠と自己免疫疾患との間には深い関連が示唆されるが、その背景にあるメカニズムには明らかでない。妊娠と自己免疫疾患の関連を分子レベルで解明することは周産期学および免疫・アレルギー学の分野における最重要課題のひとつである。

(3) 胎盤は母児間の血液細胞輸送における完全なバリアではなく、少なからぬ頻度で母児間輸血が存在することが近年明らかになった。すなわち、母体循環への胎児由来細胞の混入および胎児循環への母体由来細胞の混入が確認された。この際に、それぞれの混入細胞がhostに定着する結果、混入細胞とhost細胞とのキメラ状態が生じる(マイクロキメリズム)。

(4) 妊娠によって生じるマイクロキメリズム、すなわち母体循環に混入した胎児細胞と母体細胞から生じるキメラ細胞が自己免疫疾患と関連することが示唆されている。例えば全身性強皮症合併妊娠では母体血漿中比較的少量の胎児DNAが認められることから、母体血漿中の胎児DNA量は妊娠に合併した自己免疫疾患の活動性を評価する分子マーカーとして期待されている。

(5) 私たちは母児間輸血の分子マーカーとしての母体血漿中DNAおよびmRNAが有用であることを明らかにしてきた。すなわち、母体血漿中のDNAおよびmRNAには胎盤由来のものが含まれること、および臍帯血に流入する母体由来のDNA量は陣痛に影響されることを明らかにした。

(6) DNAマーカーは性別に依存するという欠点がある。つまり、Y染色体上の遺伝子をマーカーとして使用する以上、評価の対象となるのは男児を妊娠している症例に限定される。一方、mRNAマーカーは性別による制限がないため、その応用範囲は広いと考えられる。そこで、私どもは胎盤特異的な遺伝子としてhPLおよびhCG- β に着目し、両遺伝子のmRNA混入量が絨毛性疾患の新たな分子マーカーになりうる可能性を示した。また、母児間輸血の分子マーカーとしての母体血漿中DNAおよびmRNAの有用性についても評価した。すなわち、私どもの研究成果と最近の知見より、母体血漿中DNAおよびmRNAレベルのモニタリングは、妊娠中の自己免疫疾患の状態を評価する新たな分子マーカーとなりうることを期待されている。

2. 研究の目的

母体血漿中に流入した胎児・胎盤由来のDNAと自己免疫疾患との関連について検討する。具体的には母体血中に存在する胎児・胎盤由来のDNA量がマイクロキメリズムを反映すると仮定し、その定量値が自己免疫疾患とどのような形で関連するかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 自己免疫疾患患者(全身性強皮症、12例;その他、12例)を対象とした。輸血歴のある例は除いた。施設倫理委員会の承認と文書によるインフォームドコンセントを得た。

(2) 全血および血清中から cell-free DNA (cff-DNA) を抽出した。DNAの抽出には Qiagen Blood Mini Kit を使い、DNAの定量には NanoDorop を用いた。ついで Astec ブロックインキュベーターあるいは ABI3100 を使用して SRY 遺伝子を標的とした PCR を行った。

(3) TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を行い胎児由来の DNA を定量した。Y 染色体上にある SRY および DSY1 遺伝子を PCR の標的とした。 β -グロビン遺伝子を内部コントロールとした。DNA サンプル $2\mu\text{l}$ を鋳型とし、ABI PRISM 7900 sequence Detection System を用いた。

4. 研究成果

(1) SRY 遺伝子を標的とした PCR では、全身性強皮症 12 例あるいはその他の自己免疫疾患 12 例どの例からも SRY 遺伝子は増幅されなかった。

(2) TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR では全身性強皮症患者 5/12 例 (42%)、その他の自己免疫疾患患者 0/12 例 (0%) において DSY1 プローブで Y 染色体に特異的な DNA を検出、定量化することができた(表)。

全身性強皮症症例の内訳

症例	年齢	分娩歴	Y染色体DNA
1	32	不明	+
2	38	なし	+
3	55	男1、女1	+
4	55	男3	+
5	77	不明	+
6	35	男1	-
7	47	男1、女2	-
8	52	男1、女1	-
9	56	男1、女3	-
10	60	男1、女1	-
11	61	女3人	-
12	75	不明	-

(3) 強皮症はその他の自己免疫疾患と比較してマイクロキメリズム関与の度合いが大きいことが示唆された。また今回 SRY と DSY 1 とで検出感度が異なっていたことから、自己免疫疾患におけるマイクロキメリズムの検出には標的とする遺伝子領域およびプローブの選択が重要であると考えられた。

(4) 今後の展望

①今回は全身性強皮症患者を主たる対象として検討したが、他の自己免疫疾患についても検討したい。そのためにさらに症例の蓄積を行う。

②今回は妊娠した自己免疫疾患患者が対象に含まれていなかった。妊娠中の患者について妊娠の時期、疾患の活動性あるいは産科合併症とマイクロキメリズムとの関連について検討する。

③今回は主に血漿中 DNA 量からマイクロキメリズムの検討を行ったが、今後さらに mRNA の検出を行う。

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 10 件)

① 中山大介: 遺伝カウンセリングの側面から、日本周産期・新生児医学会雑誌 44, 査読無, 2008, 884-887

② 中山大介, 増崎英明: 画像で見る産科学 (10) 子宮筋腫合併妊娠. ペリネイタルケア 27, 査読無, 2008, 226-229

③ 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. Prenatal diagnosis 28, 査読有, 2008, 805-809

④ Shimada T; Miura K; Gotoh H; Nakayama D; Masuzaki H: Management of prenatal ovarian cysts. Early human development 84, 査読有, 2008, 417-420

⑤ Nakayama D, Masuzaki H, Miura K, Hiraki K, Yoshimura, Ishimaru T: Effect of placenta previa on blood loss in second-trimester abortion by labor induction using gemeprost. Contraception 75, 査読有, 2007, 238-240

⑥ Miura K; Yoshiura K; Miura S; Shimada T; Yamasaki K; Yoshida A; Nakayama D; Shibata Y; Niikawa N; Masuzaki H: A strong association between human earwax-type and apocrine colostrum secretion from the mammary gland. Human genetics 121, 査読有, 2007631-633

⑦ Miura K; Yamasaki K; Miura S; Yoshiura K; Shimada T; Nakayama D; Niikawa N; Masuzaki H: Circulating cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome. Clinical chemistry 53, 査読有, 2007 1167-1168

⑧ Shimada T; Miyashita M; Miura S; Nakayama D; Miura K; Fukuda M; Masuzaki H: Genital human papilloma virus infection in mentally-institutionalized virgins. Gynecologic oncology 106, 査読有, 2007, 488-489

⑨ Tanigawa T; Nakayama D; Miura K; Miura S; Shimada T; Masuzaki H: Prenatal ultrasonographic findings may be useful in predicting the prognosis of trisomy 18. Prenatal Diagnosis 27, 査読有, 2007, 1039-1044

⑩ 中山大介：妊娠中期の性器出血．周産期医学 37，査読無 2007，4-5.

[学会発表] (計 6 件)

① 中山大介：胎児頸部嚢胞性ヒグローム：合併異常と周産期転帰に関する検討．日本超音波医学会九州地方会，2008 年 10 月 5 日，鹿児島市

② 山崎健太郎：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．日本人類遺伝学会第 53 回大会，2008 年 9 月 27 日，横浜市

③ 中山大介：シンポジウム「出生前診断をめぐる諸問題」遺伝カウンセリングの側面から．第 44 回日本新生児・周産期医学会．2008 年 7 月 13 日、横浜市

④ 三浦清徳：母体血漿中へ流入する胎盤由来 mRNA の網羅的遺伝子解析---妊娠高血圧症候群における臨床所見との関連性について---．日本産科婦人科学会第 60 回学術講演会，横浜市

⑤ 中山大介：症例報告：前置胎盤および癒着胎盤合併の妊娠中期中絶．第 43 回日本周産期・新生児医学会．2007 年 7 月 8 日，東京

⑥ 中山大介：癒着胎盤における子宮温存手術．日本超音波医学会第 80 回学術集会．2007 年 5 月 18 日，鹿児島市

[図書] (計 2 件)

① 中山大介：キーワード：吸引遂娩．倉智博久 (編)：ここが聞きたい 産婦人科手術・処置とトラブル対処法，医学書院，2008 東京，245-247

② 中山大介：キーワード：会陰切開．倉智博久 (編)：ここが聞きたい 産婦人科手術・処置とトラブル対処法，医学書院，東京，2008，248-250

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 大介 (NAKAYAMA DAISUKE)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：50315248

(2) 研究分担者

増崎 英明 (MASUZAKI HIDEAKI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00173740

三浦 清徳 (MIURA KIYONORI)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：00363490

(3) 連携研究者