

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10677

研究課題名(和文) 陣痛発来に関連するmRNA/microRNAの同定とその臨床的意義に関する研究

研究課題名(英文) Identification of labor-onset related mRNA/microRNA and its clinical significance

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)・客員研究員

研究者番号：00404301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：C19MC microRNAはエピジェネティクスと関連したmicroRNAであり、とくに母体血漿中 cell-free miR-518bは子宮への刺激と関連するmicroRNAであることが期待された。そして、妊娠経過に伴う母体血漿中C19MC microRNA流入量は、妊娠経過に伴い上昇し、その基準値を見出すことができた。本研究の成果により、母体血漿中cell-free C19MC microRNA流入量の基準値を用いて、陣痛発来の予測ならびに病態解明に有用な情報をもたらすことが期待された。

研究成果の概要(英文)：Our study confirmed that C19MC microRNAs express from paternal allele. In addition, our data suggested that circulating level of cell-free miR-518b in maternal plasma is associated with the uterine stimulation. The circulating levels of cell-free C19MC microRNAs in maternal plasma increase as progress of pregnancy, and we could determined their reference values of C19MC microRNA in maternal plasma. Our data showed the possibility that the measurement of circulating C19MC microRNAs in maternal plasma makes it possible to predict the timing of labor-onset and to clarify the pathophysiology of labor-onset.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：Labor microRNA plasma placenta prediction

1. 研究開始当初の背景

妊娠・分娩管理において、陣痛発来メカニズムを解明することは、産婦人科領域の最重要課題の一つである。したがって、陣痛と関連する分子を同定し、その臨床的意義を明らかにすることは、周産期医療レベルの向上につながり、社会的にも多大な恩恵をもたらす。オキシトシンなどのホルモン作用により、子宮収縮を誘発することはできる。しかし、陣痛発来の分子メカニズムが解明されていない現状では、誘発分娩における過強陣痛のリスクを伴い、薬剤への子宮収縮の反応性の個体差や陣痛発来時期の推定などは不可能である。一方、近年、私どもは、母体血中の胎児・胎盤特異的 mRNA/microRNA を同定し、それらは母体血を通じて非侵襲的に得られる胎児・胎盤の分子情報である。妊娠時期により、母体血漿中の流入量が増加する胎児・胎盤由来 mRNA/microRNA の同定とその機能解析は、陣痛と関連する分子の同定とその臨床的意義の解明に有用な情報をもたらす。

2. 研究の目的

本研究では、母体血漿中に流入している胎盤・胎児特異的 mRNA/microRNA に着目し、陣痛と関連する microRNA を同定し、その臨床応用と陣痛発来の分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究は倫理委員会の承認と妊婦の同意を得て実施された。

(1) Chromosome 19 microRNA cluster (C19MC)・chromosome 19 microRNA cluster (C14MC)とエピジェネティクス:

雄性発生の全胎状奇胎および雌性発生の成熟嚢胞性卵巣奇形腫における C19MC microRNA (miR-517a, -517c, -518b) ならびに C14MC microRNA (miR-323-3p) の発現量を real-time RT-PCR法で定量解析した。

(2) 陣痛と関連するエピゲノム変化の同定

定: 羊水穿刺の前後における母体血漿中の cell-free ならびに exosome 由来の妊娠関連 microRNA 濃度を測定し、母体血漿中における両者の関係を明らかにした。羊水染色体検査を受けた妊婦 16 例を対象とし、検査前後の末梢血を採取した。リアルタイム RT-PCR法を用いて、母体血漿中の cell-free ならびに exosome 由来の妊娠関連 microRNA 濃度 (miR-515-3p, -517a, -517c, -518b, ならびに 323-3p) が測定された。検査前後における妊娠関連 microRNA 濃度の推移ならびに cell-free 由来と exosome 由来の妊娠関連 microRNA の関連について検討された。

(3) 母体血漿中における妊娠関連 microRNA

基準値の決定: 正常妊婦 145 例 (妊娠 12 週: 24 例、妊娠 23 週: 26 例、妊娠 30 週: 31 例、妊娠

36 週: 32 例および産褥 1 日: 32 例) を対象とし、妊娠経過に伴う妊娠関連 microRNA の基準値を求めた。妊娠関連 microRNA は対数表記し、妊娠週数に対する microRNA の回帰式を求めた。本研究における基準値は、各妊娠週数における microRNA 量の 2.5% tile を下限、97.5% tile を上限とした。また、陣痛群における C19MC microRNA 流入量と非陣痛群のそれと比較した。

4. 研究成果

(1) Chromosome 19 microRNA cluster (C19MC) ならびに C14MC とエピジェネティクス (European Journal of Gynaecological Oncology, 2018; XXXIX: 277-280.) :

全胎状奇胎における C19MC microRNA の発現量 (median (range)) は、それぞれ miR-517a: 747082.6 (5075.7-4701041.6), -517c: 480759.6 (3436.5-2053419.8), および -518b: 192930.1 (37478.7-4381175.2) copies/mL であった。成熟嚢胞性卵巣奇形腫における C19MC microRNA の発現量は、いずれも認められなかった。

一方、成熟嚢胞性卵巣奇形腫における C14MC microRNA (miR-323-3p) の発現量は 9700.7 (1663.8-144248.0) copies/mL で、全胎状奇胎における発現量は 1665.1 (193.4-5029.5) copies/mL であった ($P = 0.02$)。

よって、C19MC microRNA はヒトの組織においても父性アレルからのみ発現し、C14MC microRNA は母性アレルから有意に発現しており、いずれもエピジェネティックな発現様式を呈することが確認された。

(2) 陣痛と関連するエピゲノム変化の同定

(Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology, in press) : 羊水穿刺前後における母体血漿中の妊娠関連 microRNA 濃度の推移について、cell-free miR-518b 濃度は有意に低下していたが (Wilcoxon signed rank test, $P = 0.001$)、exosome 由来のそれは有意に変化していなかった (Wilcoxon signed rank test, $P = 0.001$)。その他の cell-free ならびに exosome 由来の妊娠関連 microRNA 濃度は、羊水穿刺前後で有意な変化は認められなかった ($P > 0.05$)。母体血漿中の cell-free miR-518b 濃度は羊水穿刺により低下していたが、exosome 由来の miR-518b 濃度は変化していなかった。したがって、母体血漿中の cell-free miR-518b は陣痛と関連する microRNA であることが示唆され、また子宮内環境への刺激にする miR-518b の生体内での役割は cell-free 由来と exosome 由来とで異なることが示唆された。

(3) 母体血漿中における妊娠関連 microRNA

基準値の決定 (Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, in press.; Prenatal

Diagnosis. 2015;35:44-50) :
各妊娠週数の妊娠関連microRNAは正規分布し、妊娠週数に対するmicroRNAの予測値は一次関数で表すことができた
(miR-515-3p; $Y=0.015 \times X - 2.53$, $p=0.0466$, miR-517a; $Y=0.016 \times X - 1.13$, $p=0.0051$, miR-517c; $Y=0.016 \times X - 1.59$, $p=0.0049$, miR-518b; $Y=0.015 \times X - 1.13$, $p=0.0002$, linear regression analysis)。
母体血漿中の妊娠関連microRNA (miR-515-3p, miR-517a, miR-517cおよびmiR-518b) 循環量は妊娠経過に伴って増加し、産褥一日で有意に低下した ($p<0.0001$, t-test)。そして、母体血漿中におけるU6 snRNA流入量の推移は、妊娠期間を通じて変化しないことを見出した。
陣痛群におけるC19MC microRNA流入量は、非陣痛群におけるそれと比較して有意に増加していた ($p<0.05$)。

以上より、C19MC microRNAはエピジェネティックに関連したmicroRNAであり、とくに母体血漿中 cell-free miR-518bは子宮への刺激と関連するmicroRNAであることが期待された。そして、妊娠経過に伴う母体血漿中C19MC microRNA流入量は、妊娠経過に伴い上昇し、その基準値を見出すことができた。本研究の成果により、母体血漿中 cell-free C19MC microRNA流入量の基準値を用いて、陣痛発来予測ならびに病態解明に有用な情報をもたらすことが期待された。

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 12 件)

Miura K, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Yoshiura KI, Masuzaki H. Decreased cell-free but not exosomal miR-518b in maternal plasma is caused by amniocentesis. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology* (in press). 2018 年 査読あり

Miura K, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Yoshida A, and Masuzaki H. Decreased plasma concentrations of pregnancy-associated placenta-specific microRNAs in pregnancies with a diagnosis of fetal trisomy 18. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology* (in press). 2018 年 査読あり

Murakami Y, Miura K, Sato S, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Yoshiura KI, Masuzaki H. Reference values for circulating

pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. (in press). 2018 年 査読あり

Miura K, Hasegawa Y, Yamada M, Higashijima A, Miura S, Kaneuchi M, and Masuzaki H. Expression levels of C19MC and C14MC microRNAs in complete hydatidiform moles and ovarian mature cystic teratomas. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2018; XXXIX: 277-280. 査読あり

Fuchi N, Miura K, Tsukiyama T, Sasaki D, Ishihara K, Tsuruda K, Hasegawa H, Miura S, Yanagihara K, Masuzaki H. Natural course of HTLV-1 proviral DNA levels in carriers during pregnancy. *Journal of Infectious Diseases* 2018;217:1383-1389. 査読あり

Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Fuchi N, Tsukamoto O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Masuzaki H. Circulating levels of pregnancy-associated, placenta-specific microRNAs in pregnant women with placental abruption. *Reprod. Sci.* 2017; 24:148-155. 査読あり

Miura K, Mishima H, Yasunami M, Kaneuchi M, Kitajima M, Abe S, Fuchi N, Miura S, Yoshiura KI, Masuzaki H. A significant association between rs8067378 at 17q12 and invasive cervical cancer originally identified by a genome-wide association study in Han Chinese is replicated in a Japanese population. *Journal of Human Genetics*. 2016;61:793-796. 査読あり

Hasegawa Y, Miura K, Higashijima A, Abe S, Miura S, Yoshiura KI, Masuzaki H. Increased levels of cell-free miR-517a and decreased levels of cell-free miR-518b in maternal plasma samples from placenta previa pregnancies at 32 weeks gestation. *Reproductive Sciences*. 2015; 22: 1569-1576. 査読あり

Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Tsukamoto O, Hasegawa Y, Abe S, Naoki Fuchi N, Miura S, Kaneuchi M, Masuzaki H. Circulating levels of C19MC-cluster microRNAs in pregnant women with severe pre-eclampsia. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2015; 41: 1526-1532. 査読あり

Miura K, Higashijima A, Mishima H, Miura S, Kitajima M, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Pregnancy-associated microRNAs in plasma as potential molecular markers of ectopic pregnancy. Fertility and Sterility 2015; 103: 1202-1208. 査読あり

Miura K, Higashijima A, Hasegawa Y, Abe S, Miura S, Fuchi N, Murakami Y, Kinoshita A, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Circulating levels of maternal plasma cell-free miR-21 are associated with maternal body mass index and neonatal birth weight. Prenatal Diagnosis 2015; 35: 509-511. 査読あり

Morisaki S, Miura K, Higashijima A, Abe S, Miura S, Hasegawa Y, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Effect of labor on plasma concentrations and postpartum clearance of cell-free, pregnancy-associated, placenta-specific microRNAs. Prenatal Diagnosis. 2015;35:44-50. 査読あり

〔学会発表〕(計 5件)

三浦清徳、尾崎 守、長谷川ゆり、三浦生子、増崎英明：母体血を用いた胎児染色体検査で13トリソミー偽陽性であった1例第25回日本胎盤学会学術集2017.11.24-25 長崎県雲仙市(ホテル東洋館)

Miura K, Higashijima A, Miura S, Hasegawa Y, Masuzaki H. Decreased cell-free but not exosomal miR-518b in maternal plasma is caused by amniocentesis. 第69回日本産科婦人科学会学術講演会 2017年4月13日-16日 広島県広島市

三浦清徳、淵直樹、三浦生子、増崎英明：成人型T細胞白血病/リンパ腫を発症した妊婦の1例 第30回日本女性医学会学術集会(メルパルク名古屋・名古屋)2015年11月7-8日

三浦生子、松本 恵、三浦清徳、長谷川ゆり、増崎雅子、金内優典、増崎英明：当院における遺伝性乳がん・卵巣がん症候群スクリーニング検査の現状 第30回日本女性医学会学術集会(メルパルク名古屋・名古屋)2015年11月7-8日

Miura K, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Yoshida A, Kaneuchi M, and Masuzaki H. Pregnancy-associated

microRNAs in plasma as potential molecular markers of ectopic pregnancy. The 19th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy (Marriott Marquis Washington) 12-15 July 2015.

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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)・

客員研究員

研究者番号：00404301

(2)研究分担者

三浦 清徳 (MIURA, Kiyonori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

准教授

研究者番号：00363490

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし