

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11144

研究課題名(和文) 妊娠初期の嚢胞化絨毛特異的分子マーカーの同定とその臨床的意義に関する研究

研究課題名(英文) The identification of cystic villi-specific molecular markers in early pregnancy and their clinical significance

研究代表者

長谷川 ゆり (HASEGAWA, Yuri)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：70627752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に嚢胞状奇胎が疑われた症例で患者、配偶者および組織から抽出したDNAを用いてDNA多型解析を行った。本研究を通して19例の嚢胞状奇胎を検討し、3例で病理学的診断(免疫染色を含む)と遺伝学的診断が異なっていることが判明し、臨床における正確な診断のために遺伝学的診断を行うことの重要性が確認できた。加えて嚢胞状奇胎特異的microRNAの発現解析を定量的RT-PCR法を用いて行った。いずれの症例も治療経過の推移とともにその発現量は低下した。以上より、嚢胞化絨毛の管理診断には私どもが行っているDNA多型解析ならびに全嚢胞状奇胎特異的 microRNAの定量解析が臨床応用可能と期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嚢胞状奇胎の確定診断は現在まで病理学的に行われており、p57kip2を用いた免疫染色を行うことで正確な診断が可能と考えられてきた。しかしながら、免疫染色を行っても全嚢胞状奇胎と部分嚢胞状奇胎の鑑別や水腫様流産の鑑別は困難なことがあるが、嚢胞化絨毛と患者血液、配偶者血液のDNA多型解析を行うことで正確な診断が可能であった。全嚢胞状奇胎と部分嚢胞状奇胎は子宮内搔爬術後の続発症の発症率が異なるため経過観察期間や妊娠許可の基準が異なる。また、水腫様流産は自然流産であるため経過観察を行う必要がない。正確な診断は学術的異議に加え、患者や配偶者にとってその後の妊娠、分娩に大きな影響を与えるため、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We performed genetic diagnosis for hydatidiform moles to clarify if hydatidiform mole is complete or partial. Through this study, we diagnosed 19 cases of hydatidiform moles by pathological technique. Pathological examination of hydatidiform moles are performed by HE stains and p57(Kip2) immunohistochemical stains. We could get patients' and their husbands' blood samples and the tissues of hydatidiform moles. We performed genetic analysis of cystic villi and patients' and their husbands' blood samples by short tandem repeat PCR. Three cases were different diagnosis between pathological examination and genetic analysis. In addition, the expression analysis of hydatidiform mole specific microRNA was performed using the quantitative RT-PCR method. In all cases, the expression level decreased with the progress of treatment. Genetic analysis of hydatidiform mole is useful technique for the differential diagnosis between complete and partial hydatidiform mole.

研究分野：産婦人科

キーワード：全嚢胞状奇胎 部分嚢胞状奇胎 DNA多型解析 分子マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 嚢胞化絨毛組織の確定診断

嚢胞化絨毛は全胞状奇胎の他に侵入胞状奇胎、絨毛癌、胎盤部トロホプラスト腫瘍など7種類に分類される。最も症例数として多い全胞状奇胎と部分胞状奇胎の鑑別は免疫染色を含めた病理学的診断が確定的な診断と推奨される(絨毛性疾患取り扱い規約 第3版)。同取り扱い規約ではDNA多型解析による診断の記載はあるものの一般的ではなく、絨毛性疾患を診断、管理している病院すべてで行われているわけではない。全胞状奇胎と部分胞状奇胎に対する治療はどちらも嚢胞化絨毛を除去する子宮内搔爬術であるが、全胞状奇胎と部分胞状奇胎では術後の続発症の発生頻度や妊娠許可までの期間など大きく異なり、これらの正確な鑑別は非常に重要である。

(2) 全胞状奇胎特異的 microRNA

microRNAは20から24塩基対のnon-coding RNAであり、標的とするmRNAに結合し、その翻訳を阻害、またmRNAを分解することで遺伝子発現を抑制する(Lee RC et al. Cell 1993)。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を約80種類同定し、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を明らかにした(Miura K et al. Clin Chem 2010)。これらの領域は胎盤発育や肺の発達に重要な意味を持つことが報告されている(Bentwich I et al. 2005)。そのため私どもが同定した胎盤特異的 microRNAは妊娠関連疾患(妊娠高血圧症候群、癒着胎盤、胎児発育不全や胞状奇胎など)の早期診断や出生前のモニタリングのための分子マーカーとして有用であると考えられた。

現在まで私どもは次世代シーケンス法を用いて、正常絨毛と比較し全胞状奇胎組織において50倍以上の発現を認める全胞状奇胎特異的 microRNA(hsa-miR-520f, miR-520b, miR-520c-3p)を抽出した。その全てが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。さらに、この3種類のmicroRNAが正常妊婦と比較し、全胞状奇胎患者において絨毛組織および患者血漿中において有意に高発現していることを報告した(Hasegawa Y et al. 2013)。

2. 研究の目的

(1)本研究ではまず、正確な確定的診断を行うためにすべての症例においてDNA多型解析を行い、病理学的診断との相違を確認することを目的とした。

(2)さらに、嚢胞化絨毛について現在まで報告しているC19MC領域にある全胞状奇胎特異的 microRNA(hsa-miR-518b, miR-520f, miR-520b, miR-520c-3p)およびC14MC領域にあるmiR323-3pの抽出を行い、これらの発現量を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)すべての症例について子宮内容除去術によって得られた嚢胞化絨毛組織のHE染色による病理学的診断に加え、p57kip2を用いた免疫染色を行った。さらに、患者と配偶者の同意を得て、患者血液、配偶者血液を採取し、これらのDNA多型解析を行い、雄性発生か否か、雄性発生であれば1精子受精か2精子受精かを診断した。

(2)嚢胞化絨毛よりmicroRNAを抽出した。それを用いて5つのmicroRNA(hsa-miR-518b, miR-520f, miR-520b, miR-520c-3p, miR323-3p)を定量した。

4. 研究成果

(1) DNA 多型解析による確定診断

研究期間中に集積した、臨床的に胞状奇胎と診断された症例は 20 例であった。そのうち 4 例が病理学的診断と DNA 多型解析による確定診断が異なっていた(表 1)。

表 1 20 例の病理学的診断と DNA 多型解析による診断

症例番号	年齢	hCG (mIU/mL)	免疫染色		病理診断結果	DNA多型解析結果
			p57kip2	TSSC3		
1	40	927048	陰性	陰性	正常妊娠と全胞状奇胎の双胎	1精子受精 全胞状奇胎
2	27	71608	陽性	-	部分胞状奇胎	部分胞状奇胎
3	32	190388	陰性	-	全胞状奇胎	2精子受精 全胞状奇胎
4	26	145313	陽性	-	部分胞状奇胎	部分胞状奇胎
5	29	40084	陰性	-	全胞状奇胎	母体成分
6	36	72367	陰性	-	全胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
7	50	146505	陽性	-	部分胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
8	30	141148	陽性	-	部分胞状奇胎	部分胞状奇胎
9	34	23072	陰性	-	全胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
10	44	340688	陰性	-	全胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
11	40	153906	陰性	-	全胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
12	29	79360	陰性	-	全胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
13	35	451674	陰性	陰性	全胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
14	18	118811	陰性	-	全胞状奇胎	2精子受精 全胞状奇胎
15	28	180901	陰性	-	全胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
16	25	302699	陰性	-	全胞状奇胎	2精子受精 全胞状奇胎
17	36	116319	陽性	-	部分胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
18	33	83721	陰性	-	全胞状奇胎	1精子受精 全胞状奇胎
19	44	54369	陽性	-	部分胞状奇胎	妊娠産物
20	25	453838	陰性	陰性	正常妊娠と全胞状奇胎の双胎	正常妊娠+2精子受精全胞状奇胎

この結果により、確定的診断と考えられていた免疫染色を用いた病理学的診断の相違が明らかになった。これらの中には胞状奇胎と診断されていたが、DNA 多型解析による診断では妊娠産物や母体成分と診断された症例も含まれていた。

本研究成果は 2019 年に行われた第 37 回日本絨毛性疾患研究会ワークショップで「胞状奇胎における遺伝子診断の有用性」として報告した。

(2) 囊胞化絨毛組織における microRNA 発現量による全胞状奇胎と部分胞状奇胎の鑑別

上記 20 例のうち症例 1~15 について囊胞化絨毛組織の microRNA 定量を行った。15 例中、11 例が全胞状奇胎、3 例が部分胞状奇胎であった。これらの microRNA 定量の結果を表 2 に示す。全胞状奇胎と部分胞状奇胎を鑑別する上で、C14MC 領域にある miR323-3p が有用であることが示唆された(表 3)。

表 2 全胞状奇胎と部分胞状奇胎の microRNA 定量結果

症例番号	518b		520f		520b		520c-3p		323-3p			
	MeanCp	Mean conc	MeanCp	Mean conc	MeanCp	Mean conc	MeanCp	Mean conc	MeanCp	Mean conc		
全胞状奇胎	1	19.77	7723735.72	25.63	818.36	22.26	45961.99	22.48	13969.10	31.68	147.19	
	3	19.62	8527580.72	23.79	2899.74	21.25	96715.90	20.47	47374.90	32.18	113.55	
	6	21.14	3034607.98	25.69	786.97	23.75	15815.49	22.84	11116.67	34.03	42.75	
	7	19.29	10694758.10	25.34	995.23	22.82	30705.90	22.02	18438.45	32.00	124.76	
	9	19.23	11115139.26	25.12	1150.48	22.62	35459.71	21.94	19301.56	32.84	79.84	
	10	19.92	6965068.15	24.73	1504.30	22.48	39076.66	21.78	21181.55	33.40	59.63	
	11	19.36	10156253.06	24.43	1851.14	21.54	78151.81	20.44	48409.36	29.62	437.35	
	12	20.56	4492472.33	24.75	1484.25	22.20	48032.61	21.37	27482.71	31.88	132.51	
	13	19.58	8785763.55	24.00	2510.91	21.79	64569.76	21.34	27903.08	32.04	121.79	
	14	19.98	6670977.39	25.08	1185.46	22.19	48365.30	21.75	21628.69	31.33	177.34	
	15	22.23	1443087.43	26.28	534.76	24.03	13053.64	23.24	8715.60	28.84	658.45	
	部分胞状奇胎	2	30.18	6467.45	35.54	3.76	33.96	36.98	33.30	18.97	27.42	1390.07
		4	30.98	3746.70	38.99	1.39	34.84	24.47	33.98	12.43	29.80	397.02
		8	31.02	3656.60	40.31	0.85	36.05	14.11	35.44	5.62	28.69	712.38

表 3 全胎状奇胎と部分胎状奇胎の鑑別

microRNAs	Chromosomal location	Area under the ROC curve (AUC)	Standard Error	Singificance level P	95% Confidence interval
miR518b	19q13.42	0.000	.000	0.004	0.000-0.000
miR520f	19q13.42	0.000	.000	0.004	0.000-0.000
miR520b	19q13.42	0.000	.000	0.004	0.000-0.000
miR520c-3p	19q13.42	0.000	.000	0.004	0.000-0.000
miR323-3p	14q32.31	1.000	.000	0.004	1.000-1.000

本研究結果は 2018 年に行われた IFPA(International Federation of Placenta Associations), Workshop において Placental microRNA and Placental Abnormality として報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Acharya G, Bartolomei M, Carter AM, Chamley L, Cotton CF, Hasegawa J, Hasegawa Y, Hayakawa S, Kawaguchi M, Konwar C, Magawa S, Miura K, Nishi H, Salomon C, Sato K, Soejima H, Soma H, Sorensen A, Takahashi H, Tomita T, Whittington CM, Yuan V, O'Tierney-Ginn P.	4. 巻 18
2. 論文標題 IFPA meeting 2018 workshop report I: Reproduction and placentation among ocean-living species; placental imaging; epigenetics and extracellular vesicles in pregnancy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 31201-31203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.placenta.2019.02.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Murakami Yuko, Miura Kiyonori, Sato Shuntaro, Higashijima Ai, Hasegawa Yuri, Miura Shoko, Yoshiura Koh-ichiro, Masuzaki Hideaki	4. 巻 44
2. 論文標題 Reference values for circulating pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 840 ~ 851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Fuchi N, Tsukamoto O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Masuzaki H	4. 巻 24
2. 論文標題 Circulating Levels of Pregnancy-Associated, Placenta-Specific microRNAs in Pregnant Women With Placental Abruption.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reprod Sci	6. 最初と最後の頁 148-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 1.93372E+15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長谷川ゆり 三浦清徳 増崎英明	4. 巻 65
2. 論文標題 前置胎盤における母体血漿中胎盤特異的microRNA流入量に関する検討	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 産婦人科の実際	6. 最初と最後の頁 751-755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuri Hasegawa, Kiyonori Miura, Ai Higashijima, Koh-Ichiro Yoshiura, Hideaki Masuzaki
2. 発表標題 Placental microRNA and placental abnormality
3. 学会等名 International Federation of Placenta Associations (IFPA)2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuri Hasegawa, Kiyonori Miura, Ai Higashijima, Shuhei Abe, Hideaki Masuzaki
2. 発表標題 The usefulness of genetic analysis for differential diagnosis between complete and partial hydatidiform mole
3. 学会等名 International Federation of Placenta Associations (IFPA)2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Miyashita, Yuri Hasegawa, Ai Higashijima, Shuhei Abe, Atsushi Yoshida, Kiyonori Miura, Hideaki Masuzaki
2. 発表標題 The Usefulness of Genetic Analysis for Differential Diagnosis between Complete and Partial Hydatidiform Mole.
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川ゆり、三浦清徳、東島愛、阿部修平、吉田敦、増崎雅子、増崎英明
2. 発表標題 胞状奇胎の超音波診断、病理診断と遺伝子診断
3. 学会等名 第91回超音波医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮下紀子、長谷川ゆり、渡名喜海香子、森崎佐知子、三浦生子、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 全胞状奇胎を反復した一例
3. 学会等名 第4回日本産婦人科遺伝診療学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 MIYASHITA Noriko, HASEGAWA Yuri, HIGASHIJIMA Ai, ABE Shuhei, YOSHIDA Atsushi, MIURA Kiyonori, MASUZAKI Hideaki
2. 発表標題 The Usefulness of genetic analysis for differential diagnosis between complete and partial hydatidiform moles
3. 学会等名 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 ゆり、三浦 清徳、東島 愛、阿部 修平、淵 直樹、吉田 敦、増崎 英明
2. 発表標題 胞状奇胎の鑑別診断における遺伝型解析の意義
3. 学会等名 第3回日本産科婦人科遺伝診療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川 ゆり、三浦 清徳、東島 愛、阿部 修平、淵 直樹、大橋 和明、吉田 敦、増崎 英明
2. 発表標題 胞状奇胎の鑑別における遺伝子診断
3. 学会等名 第25回日本胎盤学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuri Hasegawa, Kiyonori Miura, Ai Higashijima, Yuko Murakami, Ozora Tsukamoto, Shuhei Abe, Naoki Fuchi, Shoko Miura, Atsushi Yoshida, Masanori Kaneuchi, and Hideaki Masuzaki
2. 発表標題 Circulating levels of C19MC-cluster microRNAs in pregnant women with abruptio placentae
3. 学会等名 The 13th International Congress of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 長谷川ゆり 三浦清徳 東島愛 村上優子 塚本大空 淵直樹 三浦生子 増崎英明
2. 発表標題 常位胎盤早期剥離における母体の血漿中胎盤特異的microRNAの同定
3. 学会等名 第24回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三浦 清徳 (MIURA Kiyonori) (00363490)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	