

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08935

研究課題名(和文) 神経管閉鎖不全症における早期胎内分子診断マーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of early intrauterine molecular diagnostic markers of neural tube defects

研究代表者

鶴淵 隆夫 (TSURUBUCHI, TAKAO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70778901

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)：当初目的としていた、ソニックヘッジホッグ、ボーンモルフォロジカルプロテイン-4を含む体軸マーカーの発現亢進は確認できなかった。そこで、網羅的に蛋白レベルの発現を確認するため、メタボローム解析を行った。神経管閉鎖不全症の羊水で、解糖系代謝のグルコースやピルビン酸が減少し、アミノ酸代謝が減少し、脂肪酸やケトン体が増加していた。以上より、エネルギー供給がGlycolyticからLipolyticにシフトしたことが示唆された。アンモニア排泄が尿素から尿酸経路にシフトしていた。栄養学的観点から、神経管閉鎖不全症と正常の場合の妊娠母体の羊水・血清を含む胎児環境の違いに注目すべきであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経管閉鎖不全症における早期胎内分子診断マーカーを確立することは、神経管閉鎖不全症のリスクを、採血で知ることができ、将来のエビジェネティック治療のためのsmall moleculesを模索することへ展開できる可能性があった。しかしながら、本研究では、目的とした、体軸マーカー(ソニックヘッジホッグ、ボーンモルフォロジカルプロテイン-4)の発現亢進が明らかでなかった。むしろ、本研究結果により、妊娠中の母体胎内環境の栄養学的観点から、神経管閉鎖不全症妊娠母体の羊水中の、アミノ酸、解糖系、尿素の発現に関して特徴的な所見をみとめた。今後は、胎内環境と神経管閉鎖不全症のリスクに関して研究していきたい。

研究成果の概要(英文)：Our results showed any increase of sonic hedgehog and bone morphological protein-4 in the amniotic fluids and blood samples from mothers. To detect increases of any proteins in the amniotic fluids and blood samples from mothers getting informed consents, we underwent metabolomics study. In the neural tube defects babies bearing mothers, decreases of glycolysis and amino acid metabolomics, and increase of fatty acid and ketone bodies metabolomics, thus indicating exchanges of energy supply metabolisms from glycolytic to lipolytic ones. Moreover, we could find exchanges of excretion metabolomics from ammonia to uric acid ones. Further reserarches are mandatory in the point of differences of intrauterine nutritional characteristics between neural tube defects babies bearing mothers and healthy babies bearing mothers.

研究分野：小児神経外科・脊髄脊椎外科

キーワード：神経管閉鎖不全症 母体羊水 母体血清 胎内分子診断 メタボローム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの一次神経管形成では背側マーカーBMP4 と腹側マーカーShh の適正なバランスにより正常に神経管が閉じ脊髄が形成される。動物モデルでは、BMP 過剰や Shh 過剰によるNTD の報告が散見される。最近我々は母体羊水から胎児由来の羊水幹細胞を培養して、エピジェネティックマーカーや BMP4 / Shh の発現程度を報告してきた(鶴淵 参考文献)。米国の試験(Management of Myelomeningocele Study: MOMS Trial)では、脊髄髄膜瘤に対する胎内手術を行っており、その適応は妊娠 25 週前までに限られており、膀胱直腸障害や手術前にすでに進行してしまった水頭症を改善することはできなかった。本邦では出生後 48 時間以内に脊髄髄膜瘤の修復術を行い、脊髄形態の修復と髄膜炎予防を行っている。しかし、一次神経管形成の時期は胎生 1 ヶ月にすでに完成するため、胎児の神経発達のための治療を行うには、既に時期を逸していると言わざるを得ない。まさに、胎内手術以外の治療法が切望されている。

神経管閉鎖不全症(以下 NTD)の中でも脊髄髄膜瘤は、水頭症に対するシャント手術、排尿障害に対する間欠的導尿、脊髄再係留に対する外科的治療をはじめ、生涯にわたり入念な管理を必要とする。出生前早期診断(超音波・染色体診断)は、患児家族に対する十分なインフォームドコンセントのために必須であるが、あくまで胎児異常の有無を調べるための準備段階の検査にとどまり、確定的なことは言えない。そこで、より信頼性のある生物学的マーカーが切望されている。先行研究では、ヒト NTD の早期診断のための生物学的マーカー(一次神経管形成における背腹側マーカーやエピジェネティックマーカー)について基盤的な報告を行った(鶴淵 参考文献)。本研究ではこれまでの成果を発展させ、得られたエピジェネティックマーカーに基づき、胎内における薬物的治療(エピジェネティック治療)のための基礎的研究を行っていく。

2. 研究の目的

ヒト NTD のまだ解明されていない基礎的研究を完成し、生物学的マーカーを模索する。早期胎内診断を確立し、将来のエピジェネティック機序による胎内薬物治療を展開するために以下のことを研究期間内に明らかにする。

主要評価項目

- 1) エピジェネティックマーカーの発現
- 2) 背腹側因子の発現
- 3) 母体血清と羊水における各マーカー値の関連性の有無や将来の生物学的マーカーとしての有用性の模索

副次的評価項目

- 4) 将来の胎内薬物治療(エピジェネティック治療)の可能性の模索

3. 研究の方法

1) 羊水および血清の採取

羊水穿刺の適応は、神経管閉鎖不全症が疑われるが超音波診断ではっきりと結論が出ない場合、他にも染色体分析、先天性代謝異常、前期破水の診断、子宮内感染、胎児肺成熟確認、血液型不適合、羊水過多、羊水過少が考えられる場合である。この他にも高齢出産(35 歳以上)かつ超音波検査や新型出生前診断で異常なしと結論づけられない場合、検査を行う。原則として、妊婦本人および妊婦の家族の自由意志に基づき十分インフォームドコンセントの上、産婦人科医により羊水穿刺を施行する。本研究の対象は、神経管閉鎖不全症児を妊娠してる母体羊水および母体血清である。これに対するコントロールとして、神経管閉鎖不全症児や染色体異常児以外の妊娠母体からの羊水・血清が対象となる。また診療における羊水検査は、日本産婦人科学会の「出生前に行われる遺伝的検査および診断に関する見解」に従って行われる。また、脊髄髄膜瘤の疾患頻度は低いため、正常妊娠および神経管閉鎖不全症時の妊娠母の出産時の余剰検体を採取することに対して、妊婦本人および妊婦の家族の自由意志に基づき十分インフォームドコンセントの上同意を得た上で、出産時の余剰検体としての羊水(余剰検体)採取、血液(全血)、尿を採取を行う。(*採血・採尿は研究用として採取する)

2) 羊水からの胎児由来幹細胞の分離・培養

我々が基盤的に報告したが、それでも、ヒト NTD 疾患における背腹側マーカーやエピジェネティックマーカーの発現程度についてまだ未解明な部分もある。これらをさらに明らかにするために、羊水から選択的培地で培養(Amniomax II 培地で初代培養を行い、その後成長因子入りの NeuroBasal 培地で培養)することで抽出した胎児由来幹細胞からニューロスフィアを作成し、これを成長因子を除外することで分化させ、背腹側マーカーとしての Bone Morphological

Protein 4(BMP4)、 Muscle segment homeobox 2(Msx2)、 腹側マーカーとしての Sonic hedgehog(Shh)、 Oligodendrocyte transcription factor 2(Olig2)、 Nk6 homeobox 1(Nkx6.1)や エピジェネティックマーカーの Histone H3(Lys4) di-methylation(H3K4m2), Histone H3(Lys4) tri-methylation(H3K4m3), Histone H3(Lys27) di-methylation(H3K27m2), Histone H3(Lys4) tri-methylation(H3K27m3), Histone H3(Lys9) acetylation(H3K9ac), Histone H3(Lys18) acetylation(H3K18ac), histone acetyltransferase GCN5, Lysine demethylase 6B(KDM6B)について、免疫染色と qRT-PCR を行い評価する。コントロールとして、神経管閉鎖不全症児や染色体異常児以外の妊娠母体羊水から採取した、胎児由来幹細胞から培養したニューロスフィアを用いる。

2 - 1) 免疫染色

各抗体で染色したサンプルを撮影し、蛍光顕微鏡下の観察と輝度測定を行う。

2 - 2) qRT-PCR

ニューロスフィアを培養し、mRNA を抽出し、各マーカーについて qRT-PCR をおこない、発現量を計算する。

2 - 3) 母体血清および羊水の Shh/BMP 発現の評価

先行研究で母体における血清と羊水中の値がほぼ同期していることを指摘した。その他の背腹側マーカーについて同様の考察を行うために、ELISA kit を用いて濃度測定する。コントロールとして、神経管閉鎖不全症児や染色体異常児以外の妊娠母体からの羊水および血清を用いる。ELISA kit を用いて母体血清および羊水中の Shh/BMP4 濃度を計算する。同様にその他の背腹側マーカー、例えば、背側：Msx2 腹側：Nkx6.1, Olig2 についても同様に濃度を計算する。

3) 主成分分析

GCMS を用いて、母体羊水の各種メタボローム解析を行う前に、主成分分析を行う。

4) メタボローム解析

4 - 1) アミノ酸代謝分析

4 - 2) 解糖系代謝分析

4 - 3) アンモニア代謝分析

4 . 研究成果

1) 当院産婦人科の協力を得て、インフォームドコンセントを得た後、検体を採取した。合計 10 名以上の検体を用いて解析が可能となった。

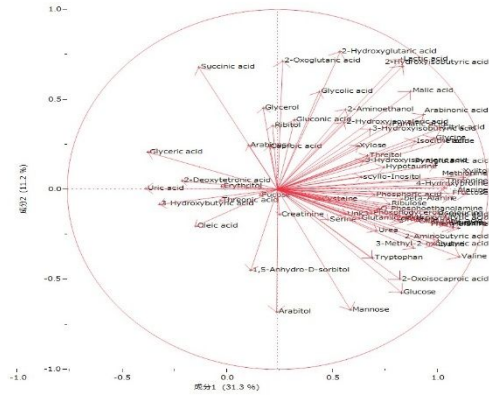
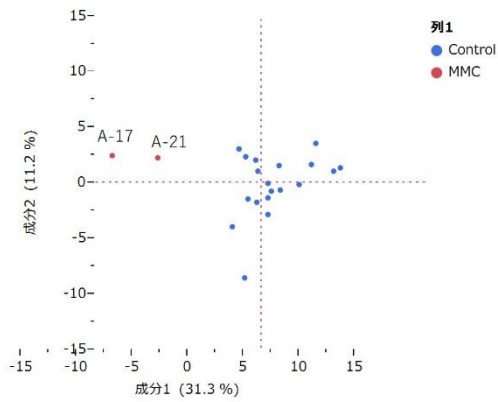
2) 1) により得られた検体量が少ないため、3) のタンパク質発現、メタボロミクス解析を行うことにより、神経管閉鎖不全症の母体羊水からターゲット物質を同定することを行ってから、2) の詳細な解析に入ることとした。3) の結果は上記研究成果の概要に述べたとおり、当初のターゲットである、体軸マーカーの発現亢進は確認できなかった。

3) 当初本研究の目的としていた、ソニックヘッジホッグ、ボーンモルフォロジカルプロテイン-4 を含む体軸マーカーの発現亢進は確認できなかった。そこで、網羅的に蛋白レベルの発現を確認するため、メタボローム解析を行った。主成分分析で、神経管閉鎖不全症妊娠母体の羊水と、コントロールとの間で、明らかな代謝変動の差がみられた(図 1)。

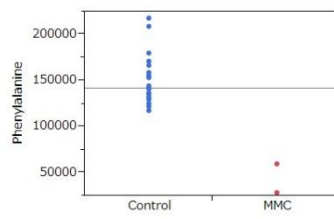
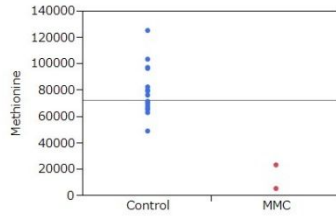
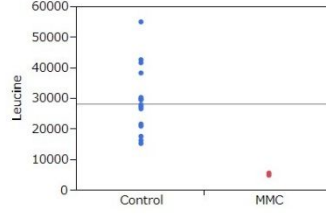
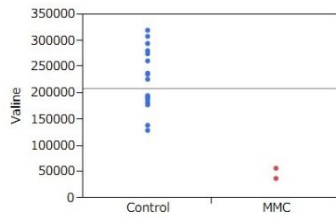
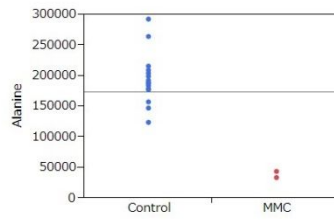
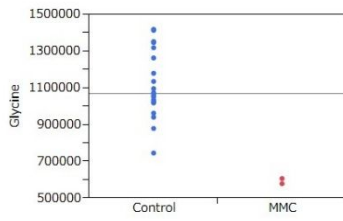
4) 神経管閉鎖不全症の妊娠母体の羊水中で、解糖系代謝のグルコースやピルビン酸が減少し、アミノ酸代謝が減少し、脂肪酸やケトン体が増加していた。以上より、エネルギー供給が Glycolytic から Lipolytic にシフトしたことが示唆された。アンモニア排泄が尿素から尿酸経路にシフトしていた。栄養学的観点から、神経管閉鎖不全症と正常の場合の妊娠母体の羊水・血清を含む胎児環境の違いに注目すべきであることが示唆された。(図 2 図 3 図 4)

☒ 1

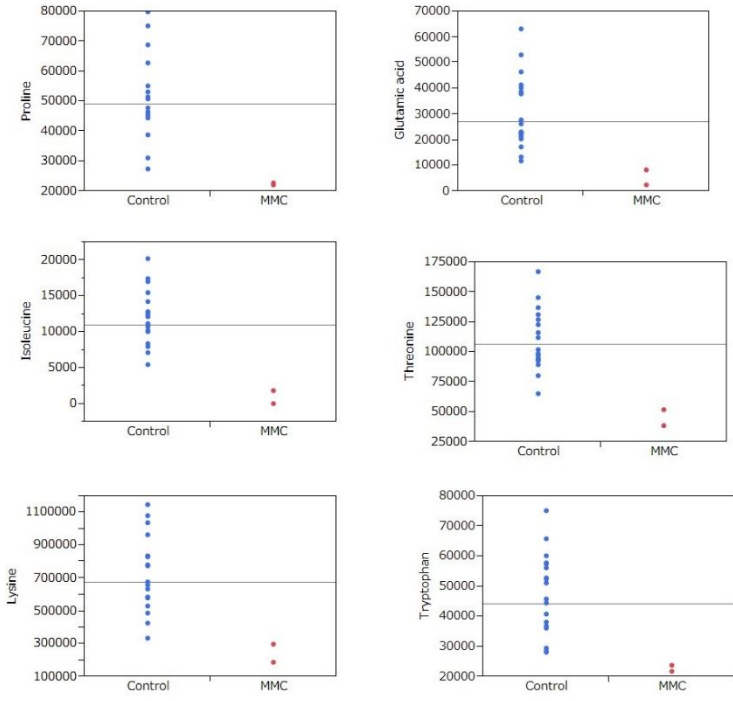
主成分分析(PCA: Principle Component Analysis)



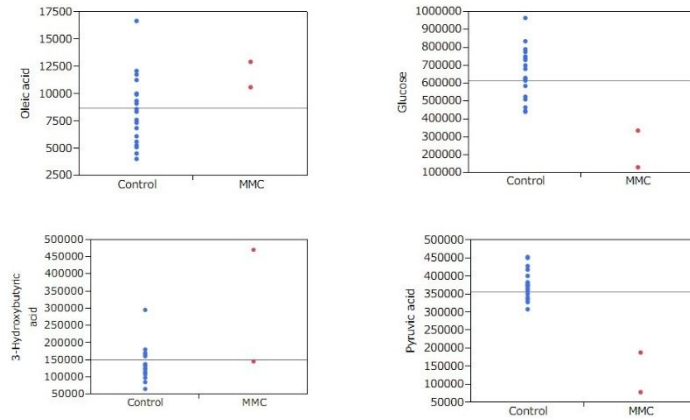
☒ 2-1



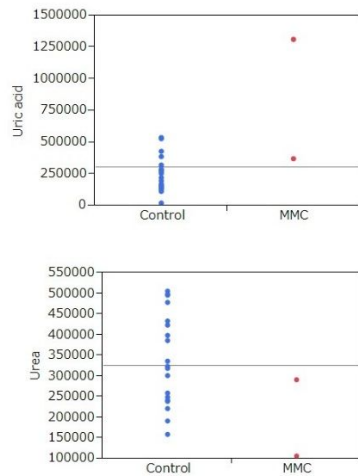
2-2



3



4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計0件

〔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	室井 愛 (Muroi Ai) (10709215)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究分担者	濱田 洋実 (Hamada Hiromi) (60261799)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	八木 洋也 (Yagi Hiroya) (70625623)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究分担者	阿部 春奈 (小宮春奈) (Abe Haruna) (10831927)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関