

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09782

研究課題名（和文）胎児由来mRNA/microRNAの機能解析とその臨床的意義に関する研究

研究課題名（英文）Functional analysis of fetal mRNA/microRNA and its clinical significance

研究代表者

永田 愛（東島愛）（Nagata, Ai）

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：00549595

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：現在の周産期医療の現場では、出生前の胎児機能評価として主に胎児心拍陣痛図が用いられている。検査限界として、胎児機能不全の検出には偽陽性が多く、胎児や胎盤の状態、および成熟度をモニターできる新たな分子マーカーの同定が求められており、本研究の目的とした。我々は、羊水中に存在する cell-free RNA を解析し、胎児状態や成熟を評価できる分子マーカーを新たに同定した。また、我々が今まで同定してきた胎児・胎盤特異的 miRNA の胚培養液中での発現量を解析することで、機能的良好胚の新たな選別方法の可能性を見出し、着床率の向上が期待できる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、胎児や胎盤だけでなく受精胚の段階から、機能および成熟を評価できる分子マーカーを羊水、胚培養液中で同定した。この分子マーカーを用いることで、生殖補助医療における受精胚の機能評価の段階から、妊娠、分娩に至るまでの間、より精度の高い胎児、胎盤の機能や成熟を評価できることで、着床率の向上における少子化対策への貢献、胎児機能不全への適切な介入が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In current perinatal medical practice, cardiotocogram are mainly used to evaluate fetal function during pregnancy. Due to many false positives in detecting fetal dysfunction as a limitation of the test, there is a need to identify new molecular markers that can monitor the condition and maturity of the fetus and placenta, which was the purpose of this study. We analyzed cell-free RNA in amniotic fluid and identified new molecular markers that can evaluate fetal status and maturation. In addition, by analyzing the expression levels of the fetal and placental specific miRNAs, which we have identified, in the embryo culture medium, we found the possibility of a new selection method for functionally good embryos, and obtained results that are expected to improve the implantation rate.

研究分野：周産期医療

キーワード：胎児胎盤特異的 miRNA 羊水 胚培養液 機能評価

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の産科医療において、出生前の胎児機能評価には主に胎児心拍陣痛図が用いられているが、胎児機能不全の検出においては偽陽性率が高く、検査の限界が認識されている。子宮内における胎児神経、内分泌代謝や各臓器の発達・成熟度などの胎児機能が出生前に高精度に評価可能になれば、より詳細な胎児モニタリングが可能になる。そこで本研究では、母体を通じて得られる胎児の分子情報（羊水あるいは母体血中に浮遊する羊膜、胎児、羊水細胞それぞれに由来する mRNA/miRNA）に着目し、妊娠経過に伴う胎児成熟の分子病態解明に迫り、羊水検査ならびに母体の血液検査による総合的な胎児機能評価法の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠経過に伴い羊水中ならびに母体血中へ流入する羊膜、胎児、羊水に特異的な mRNA/miRNA のうち、胎児機能と関連する分子マーカーセットを選定し、羊水検査ならびに母体の血液検査による胎児機能検査法の確立を目指す。まず妊娠中期および後期の羊水中、母体血中には、羊膜、胎児ならびに羊水それぞれに特異的な mRNA/miRNA が存在しているとの仮説を検証する。ついで、羊水中ならびに母体血中への羊膜、胎児、羊水それぞれに特異的な mRNA/miRNA のうち、胎児機能の分子マーカーとして有用な分子マーカーセットを選定する。最終的には、妊娠中期および後期の時点から羊水あるいは母体血を用いて胎児機能成熟度を評価し、胎児機能不全の有無を評価するという新たなアプローチを前方視的に検証する。

3. 研究の方法

本研究では、妊娠経過に伴い羊水中ならびに母体血中へ流入する羊膜、胎児、羊水それぞれに特異的な mRNA/miRNA を同定し、そのうち胎児機能と関連する分子マーカーセットを選定し、基礎的には妊娠経過に伴う胎児成熟の分子病態解明に迫り、臨床的には羊水検査ならびに母体の血液検査による胎児機能評価法を開発する。本研究は長崎大学大学院医歯薬学総合研究科倫理審査委員会へ申請され承認を受けている（許可番号：第 13052715 号）。目的完遂のため、期間内の検討項目として以下の 4 点を挙げる。(1)羊膜、胎児ならびに羊水特異的 cell free-mRNA/miRNA を同定する。妊娠 16-22 週（羊水検査例）および妊娠 28-38 週について、正常妊娠の母体血、胎盤組織、胎児細胞（妊娠中期：臍帯組織、妊娠末期：臍帯血）、羊膜および羊水細胞を一組にして、計 2 組についてそれぞれの検体間の遺伝子発現量を比較することにより、妊娠中期および末期における羊膜、胎児ならびに羊水それぞれに特異的な mRNA/miRNA を同定する。また、妊娠中期と妊娠末期の胎児・羊水細胞における mRNA/miRNA の発現レベルの推移を明らかにして、胎児機能の発達の指標とする。(2) 妊娠の各時期の羊水中ならびに母体血中への羊膜、胎児ならびに羊水それぞれに特異的な mRNA/miRNA の流入量を明らかにする。(3) 羊水中ならびに母体血中への羊膜、胎児ならびに羊水それぞれに特異的な mRNA/miRNA のうち、胎児機能評価に有用な分子マーカーセットを選定する。(4) 受精胚の時点で、受精胚の機能を反映した分子マーカーが存在するか検討し、その後の妊娠転帰について調査し、本研究の胎児機能検査法の基礎的、臨床的有用性を明らかにする。

4. 研究成果

本研究は、我々のこれまでの研究で同定してきた胎児・胎盤特異的 miRNA を用いて、胎児機能及び臓器成熟をモニターできる分子マーカーの同定と新たな胎児機能評価法の確立を目的としている。研究目的の達成のため、最終年度では、(1)妊娠 16 週で施行された羊水検査、妊娠 38 週で施行された選択的帝王切開術の際に採取された羊水を用いて、胎児成熟がモニターできる可能性を有する分子マーカーの同定、(2) 胚培養液を用いた受精胚に対する非侵襲的な機能的良好胚の新たな選択法の構築を行なった。

以下、研究成果を記す。(1)各羊水検体から cell-free total RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行い、1,587 個の mRNA を検出した（表 1）。その中で、妊娠 16 週で発現量が 0 TPM（transcripts per million）、妊娠 38 週で 300 TPM 以上に発現量が増加した mRNA を胎児臓器の機能成熟を反映するバイオマーカー候補として 5 種類同定した。その 5 種類の mRNA（分布場所）は、SFTPC（肺）、SMIM29（脳や皮膚）、NAA10（脂肪や虫垂）、IFITM3P6

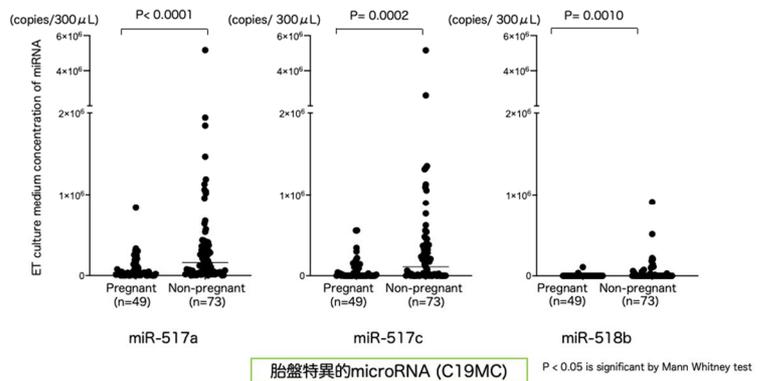
表1. 胎児の臓器成熟を評価するバイオマーカーとなりうる21種類のmRNA

mRNA	16w(TPM)	38w(TPM)	発現部位
1 ARF1	21.30	479.56	胎盤
2 SCGB1A1	2.41	352.69	肺
3 SCGB3A1	133.12	6286.04	肺, 唾液腺, 胃
4 SFTA2	0	311.42	肺
5 SFTPB	0.25	539.36	肺
6 SFTPC	0	11972.46	肺
7 FIS1	11.26	440.37	心臓, 甲状腺
8 SLC25A3	16.33	432.71	心臓
9 COX6C	16.11	354.18	心臓, 大腸
10 CYSTM1	14.61	382.22	胃, 十二指腸
11 PSCA	5.95	357.70	胃, 膀胱, 前立腺
12 IFITM2	2.25	409.61	虫垂, 脾臓
13 NAA10	0	452.17	脂肪, 虫垂
14 PSMA7	17.73	442.08	脂肪, 虫垂
15 MAL	47.49	1058.79	食道, 腎臓, 脳
16 CALML5	0	442.30	皮膚, 唾液腺, 食道
17 RPTN	18.21	389.35	皮膚
18 IFITM3P6	0	310.72	副腎, 甲状腺, 唾液腺
19 ISG15	31.96	894.37	唾液腺, 脾臓
20 RTL8A	1.31	317.98	卵巣, 脂肪
21 SMIM29	0	348.65	脳, 皮膚

TPM: transcripts per million

(副腎や甲状腺、唾液腺)、CALML5(皮膚、唾液腺、食道)であり、分布臓器の機能を反映している可能性がある。

(2) 胎培養液中から cell-free total RNA を抽出し、妊娠群、非妊娠群の胎培養液中での胎児・胎盤特異的 miRNA である C14MC, C19MC の発現量を RT-qPCR を用いて比較、検討した。特に胎盤の機能を反映する C19MC の発現量が非妊娠群の培養液中で優位に発現していることが明らかになった(右図)。我々の継続研究において、今後さらに詳細な解析を行なっていく予定である。上記結果により、受精胚の段階から胎児や胎盤の機能をモニターできる新たな評価法の確立の可能性を本研究課題によって示すことができた。



これらの分子マーカーを用いて、受精胚、妊娠初期、中期、後期と継続的な受精胚や胎児・胎盤の妊娠経過に伴う胎児成熟の分子病態解明に迫り、羊水検査ならびに母体の血液検査による総合的な胎児機能評価法の確立の可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名	江石千明、永田幸、重松祐輔、村上亨、永田愛、北島百合子、長谷川ゆり、三浦清徳
2. 発表標題	Identification of fetal-derived miRNAs and mRNAs in amniotic fluid and maternal plasma which enable to assess fetal maturity.
3. 学会等名	The 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	重松祐輔、永田幸、江石千明、梶村慈、永田愛、北島百合子、長谷川ゆり、北島道夫、三浦清徳
2. 発表標題	The identification of novel molecular markers in embryo culture medium to enable functional evaluation of fertilized embryos non-invasively
3. 学会等名	The 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	重松祐輔、永田幸、江石千明、梶村慈、永田愛、北島百合子、長谷川ゆり、三浦生子、北島道夫、三浦清徳
2. 発表標題	MicroRNAs derived from fertilized embryos in culture medium may contribute as biomarkers for embryo quality and pregnancy outcomes
3. 学会等名	第76回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年	2024年

1. 発表者名	江石千明、永田幸、重松祐輔、村上亨、永田愛、北島百合子、三浦生子、長谷川ゆり、三浦清徳
2. 発表標題	Identification of novel biomarkers in amniotic fluid that enable to assess fetal maturation.
3. 学会等名	第76回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年	2024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)	

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
---------	---------