

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591422

研究課題名（和文） 母体血漿中RNAを用いたFIRSの評価マーカーの開発

研究課題名（英文） Development of FIRS RNA marker in maternal plasma

研究代表者

齋藤 裕 (SAITO HIROSHI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：30119193

研究成果の概要（和文）：

Fetal inflammatory response syndrome (FIRS)が胎児・新生児の重篤な多臓器障害に繋がることはよく知られているが、前期破水、絨毛膜羊膜炎などが FIRS に進展していることを診断する方法はなく、妊娠中の胎児に感染が波及しているかどうかを知る方法の開発は重要なテーマである。

我々は、母体血漿 cell-free RNA 及び母体血細胞成分由来 RNA を用いて妊娠合併症の発症予知の研究に取り組んでいるが、この手法で絨毛膜羊膜炎と FIRS に進展した状態を区別する分子マーカーの確立を目指している。

切迫早産、前期破水、子宮頸管炎、絨毛膜羊膜炎で入院管理を行った症例を対象に、入院時、1週間後、2週間後と毎週の母体血採取を行った。また、この際、母体血で一般検査として血算、CRP の測定、頸管の顆粒球エラスターゼ値、胎児性フィブロンectin値の測定も行い記録している。また、羊水検査を行った症例ではこれらの羊水中濃度の測定も行っている。しかし、これまでの段階で胎児感染を認めた症例でのサンプリングはできておらず、絨毛膜羊膜炎の症例もわずかである。

我々は、分子マーカーのターゲットとして IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインを想定していたが、母体が発熱するような状況では既に母体血細胞成分由来のそれらの発現量は上昇しており、それが FIRS の分子マーカーとして活用できる可能性は症例数が少ないものの難しいという結果である。妊娠中の胎児感染が起こる前に分娩誘導されることが多く、その意味で、FIRS の分子マーカーの研究は多施設研究などを行わないと難しい現状が明らかになった。

この手法を用い、母体血中細胞成分由来 RNA を用いて癒着胎盤の予知の可能性について検討を行った。PLAC-1 と VEGFA 発現は正常例に比較し有意に高値を示した。また、KISS-1 遺伝子発現は逆に低値を示した。これらを用いることで癒着胎盤の予測ができる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that fetal inflammatory response syndrome (FIRS) causes severe multi-organ failures in the fetus or neonate. Although premature rupture of membrane and chorioamnionitis can be developed to the FIRS, the evaluation method to diagnose the onset of FIRS has not been established. To develop the method to predict the occurrence of FIRS is therefore very important. On the other hand, we have developed the prediction method for preeclampsia by using cell-free RNA and cellular RNA in maternal blood. We planned to apply this method to the prediction of FIRS.

We obtained blood samples from admitted patients with threatened preterm birth,

PROM, cervicitis, and chorioamnionitis. We further obtained the data of blood counts, CRP value, elastase and fibronectin values in the cervical mucus. In cases that were performed amniocentesis, the concentrations of elastase and fibronectin were also quantified. However, in the study period, we could not obtain samples from pregnant women with fetal infection.

We expect inflammatory cytokines such as interleukin-6 and interleukin-8 as molecular markers for detecting the pathogenesis of FIRS. However, the preliminary study showed that the expression levels of these markers were already altered in such situation and these candidate markers could not be used for the prediction of FIRS.

Therefore, we assessed the prediction of invasive placenta by using the analysis of cellular RNA in maternal blood. The expression levels of placenta specific-1 (PLAC-1) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in patients with invasive placenta were higher than those in normal pregnant women. In contrast, the level of KISS-1 was lower in the patients. These genes can be potential markers to predict the abnormal adherence of the placenta.

It is thus revealed that the analysis of cellular RNA in maternal blood allowed the evaluation of fetal and/or placental pathophysiological alterations.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：胎児感染・FIRS・母体血・発症予知・癒着胎盤

1. 研究開始当初の背景

成人における systemic inflammatory response syndrome(SIRS)と同様に、Fetal Inflammatory Response Syndrome(以下：FIRS)は、「子宮内への細菌の侵襲などによる子宮内の炎症に反応した胎児の高サイトカイン血症により引き起こされる胎児の炎症性多臓器障害」として提唱された概

念で、出生後の様々な新生児疾患との間に因果関係が指摘されている。FIRSは、呼吸窮迫症候群(respiratory distress syndrome: RDS)、敗血症、脳室内出血(intraventricular hemorrhage: IVH)、脳室周囲白質軟化症(preventricular leucomalacia: PVL)、壊死性腸炎(neonatal necrotizing enterocolitis: NEC)、気管支肺

異形成 (broncho-pulmonary dysplasia: BPD)、その他、腎臓や副腎機能などとの関連が報告されており、児の合併症や長期予後に影響する病態と考えられている。

妊娠中の上行性感染は、子宮頸管炎から、胎盤・卵膜・脱落膜感染(chorioamnionitis: CAM)、絨毛血管炎・羊水感染、さらに、胎児感染へと進展すると考えられる。子宮頸管炎は、子宮収縮や出血などの切迫早産様の臨床症状を呈することがあり、子宮頸管や帯下中の胎児性フィブロネクチンや顆粒球エラスターゼなどの炎症マーカーの定量・半定量で診断されている。また、臨床的に子宮内への感染が母体の症状として顕著に現れた状態は、臨床的絨毛膜羊膜炎 (clinical chorioamnionitis: CCAM) と呼ばれる。CCAM の診断基準は、古典的には、38 度以上の母体発熱、頻脈、子宮の圧痛、羊水や帯下の悪臭、母体白血球の増多などを伴う場合とされる。しかし、CCAM の状態が臨床的に顕在化する前の胎児感染が起り、FIRS の病態を呈することも多く、FIRS に移行する段階を的確に把握するマーカーの開発が期待される。

1998 年、Gomez らによって FIRS の概念が最初に報告された際の定義は、「早産や前期破水の胎児で胎児血漿中 IL-6 濃度が上昇したもの」とされている。彼らは、この FIRS の病態が、重篤な新生児合併症の発症頻度に大きく影響することを報告したが、多変量解析で、臍帯血中サイトカイン濃度が、重篤な合併症と関連した有意な独立した因子であり、高サイトカイン血症の場合、重篤な合併症発症の Odd 比は 6.0, (95%CI 1.7-21.7) であり、羊水中の細菌検出は有意な合併症の発症と関連した因子とはならなかった。さらに、Yoon らは気管支肺異形成の児とそれ以外の児を比較すると、臍帯血

中 IL-6 濃度は気管支肺異形成の児で有意に高く、羊水中のサイトカイン濃度では差がなかったことから、肺障害を起こすのは胎児の高サイトカイン血症であり、羊水中のサイトカイン上昇とは関係ないとしている。

近年、母体血漿中に cell-free RNA として胎盤に由来する HLA-G 遺伝子が循環していることが報告された。この cell-free RNA は、0.22 μm のフィルターで除去されるサイズの microparticle 内に存在し、安定な状態で血漿中に存在し、胎盤機能変化の評価法として利用可能である。我々のグループは、最初に、hPL と hCG- β の遺伝子発現を血漿中で定量し、妊娠経過に伴う変化及びそれらの血漿中蛋白濃度との相関を検討した。その結果、hPL は妊娠経過と共に漸増する傾向を、また、hCG- β は、妊娠 10 週頃にピークを形成し、以降漸減する傾向を認めた。さらに、両者ともそれぞれの血漿中の蛋白濃度と相関することを確認し、cell-free RNA が胎児・胎盤機能評価に利用可能であると考えた。このことから、妊娠高血圧症候群において蛋白レベルで母体血漿中で増加し、また、その産生が胎盤であると報告されている Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)、tissue-type Plasminogen Activator (tPA)、CRH、Selectin P、Placenta-Specific 1 (Plac 1)、VEGF、VEGF receptor 1、Endoglin の遺伝子発現について母体血漿中 RNA を用いて定量し、妊娠高血圧症候群での変化を検討した。その結果、妊娠高血圧症候群でこれら 8 種類の全ての遺伝子発現が高まっていることが分った。さらに、妊娠高血圧症候群の重症化に伴いそれぞれの発現量が増強し、HELLP 症候群ではさらに全ての遺伝子が高発現であった。また、蛋白尿、高

血圧などの個々の重症度との相関を検討したところ、それらの重症化に伴い、有意に全ての遺伝子発現量が増加することが分かった。多変量解析の結果、これら遺伝子の中で PAI-1、tPA と蛋白尿の程度の間に関係が確認され、PAI-1、tPA と妊娠高血圧症候群の発症に強い関連があると推察された。そこで、妊娠 15-20 週の臨床症状のない時期の 620 人の妊婦から血液を採取し、妊娠高血圧症候群を発症する以前の妊娠中期に既に遺伝子発現に変化がみられるかを検討した。その結果、その後妊娠高血圧症候群を発症する症例(n=62)で PAI-1、tPA は、それぞれ 8.9 倍、8.0 倍と上昇していた。さらに、これら 7 種類の遺伝子の組み合わせで疑陽性率 5%水準で、妊娠高血圧症候群の 84%の発症予知が可能であり、さらに、重症型妊娠高血圧症候群の 87%、HELLP 症候群の 97%の予知が可能なることを見出した(Am J Obstet Gynecol, 2008)。

母体血清中 VEGFR1 や Endoglin による蛋白レベルでの濃度変化が、妊娠高血圧症候群の臨床症状発現の 2 ヶ月前程度であることに比較し、母体血漿中 Cell-free RNA による胎児・胎盤の評価は、4-5 ヶ月前から高精度に可能であった。

2. 研究の目的

母体血漿中 cell-free RNA によって胎児の高サイトカイン血症をより鋭敏に反映する母体血漿中 RNA マーカーを見出すことが、本研究の目的である。

具体的には、切迫早産や前期破水で入院管理を必要とした症例で各週母体血を採取し、羊水感染の確認のため行う羊水穿刺を行う症例にあつては余剰羊水の採取、出生後の臍帯血採取を行う。臍帯血中の IL-6 濃度を最終的な FIRS の診断基準として、

母体血中及び羊水中のサイトカイン濃度、及び、母体血漿中及び羊水中の cell-free RNA の定量を行う。目的とする遺伝子については、FIRS(+)と FIRS(-)の症例の羊水及び cell-free RNA を用い、microarray での網羅的遺伝子解析を行い、その結果からマーカーとなる遺伝子の抽出を行う。

この研究により、切迫早産、前期破水などの臨床管理に用いる新しい分子マーカーを見出し、胎児高サイトカイン血症を早期に診断する。このことにより、子宮内で保存的に経過観察できる限界となる時期を特定できるようになる。この検査は、より良い状態で胎児を分娩するタイミングを決めるマーカーになると考えられ、重篤な合併症を持つ児の出生を減少させることに繋がると考える。

3. 研究の方法

切迫早産や前期破水で入院管理を必要とした症例で毎週母体血を採取する。羊水感染の確認のために羊水穿刺を行う症例にあつては余剰羊水の採取し、出生後の臍帯血も採取する。臍帯血中の IL-6 濃度を最終的な FIRS の診断基準として、母体血中及び羊水中のサイトカイン濃度、及び、母体血漿中及び羊水中の cell-free RNA の定量を行う。目的とする遺伝子については、FIRS(+)と FIRS(-)の症例の羊水及び cell-free RNA を用い、microarray での網羅的遺伝子解析を行い、その結果から候補遺伝子を抽出する。

しかし、当初 2 年間の研究で、胎児感染を証明できる症例はなかった。そこで、計画の一部を変更し、切迫早産、前期破水、子宮頸管炎、絨毛膜羊膜炎で入院管理を行った症例を対象に、入院時、1 週間後、2 週間後と毎週の母体血採取を行った。また、この際、母体血で一般検査として血算、

CRP の測定、頸管の顆粒球エラスターゼ値、胎児性フィブロネクチン値の測定も行い記録することにした。また、羊水検査を行った症例ではこれらの羊水中濃度の測定も行うこととした。

4. 研究成果

研究期間中に、胎児感染と診断できる症例は発生しなかったため、FIRS 患者の末梢血は採取できなかった。FIRS を疑う症例は、数例あったが、産後に臍帯炎があることからの推定であり、児の臨床症状との一致は見られなかった。

そこで、母体血中細胞成分由来 RNA を用いて癒着胎盤の予知の可能性について検討を行った。妊娠 32 週に採血し、PLAC-1、VEGFA、Ki-67、Placenta growth factor (PIGF)、KISS-1 metastasis-suppressor (KISS-1)、VEGF receptor 1 (FLT-1)発現量を RT-PCR 法で測定した。その結果、PLAC-1 と VEGFA 発現は正常例に比較し高値を示した。また、KISS-1 遺伝子発現は逆に低値を示した。このことからこれら 3 種類の遺伝子を用いることで癒着胎盤の予測が可能になる可能性が示唆された。

更に、妊娠高血圧症候群に関する予知についても検討を行った。臨床症状のない妊娠10-14週(中央値12週3日)の妊婦を対象に採血を行った。後にPIHを発症したPIH群11例と1:8マッチで正常に経過したコントロール88例について、母体血細胞成分からRNAを抽出し、抗酸化因子、抗血管増殖因子などの遺伝子発現を定量した。

分析した遺伝子は、vascular endothelial growth factor (VEGF)、VEGF-receptor 1 (FLT1)、endoglin (ENG)、placenta growth factor (PIGF)、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)、placenta protein-13 (PP13)である。

各遺伝子の定量は蛍光標識primer /Probeを用いたTaqMan PCR法で行った。その結果、PIH群の各遺伝子発現量のMoM値(SD)は、FLT1 : 2.18 (0.36), ENG : 3.26 (1.16)、TGF- β 1 : 1.82 (0.48)とコントロールと比較し、有意に高値を、また、PIGF : 0.64 (1.04), PP13 : 0.70 (1.02)は有意な低値を示した。PIH 発症予知について ROC を描いて検討した結果、AUC (SD) は、FLT1 で 0.872(0.064)、ENG で 0.966 (0.019)と抗血管増殖因子が優れた発症予知マーカーであることが分かった。さらに、それらの組み合わせで、5%偽陽性率水準で 72.3%のPIH 発症予知が可能であった。

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 5 件)

1. PP13 mRNA Expression in Trophoblasts From Preeclamptic Placentas. Sekizawa A, Purwosunu Y, Yoshimura S, Nakamura M, Shimizu H, Okai T, Rizzo N, Farina A. *Reprod Sci.* 2009 Apr;16(4):408-13.
2. Expression of Angiogenesis-Related Genes in the Cellular Component of the Blood of Preeclamptic Women. Purwosunu Y, Sekizawa A, Yoshimura S, Farina A, Wibowo N, Nakamura M, Shimizu H, Okai T. *Reprod Sci.* 2009 Sep;16(9):857-64.
3. PP13 mRNA expression in the cellular component of maternal blood as a marker for preeclampsia. Hanako Shimizu, Akihiko Sekizawa, Yuditiya Purwosunu, Masamitsu Nakamura,

Antonio Farina, Nicola Rizzo, Takashi Okai. Prenat Diagn. 2009; 29: 1231-1236.

4. Prediction of pre-eclampsia by an analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15-20 weeks of gestation. Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Shimizu H, Nakamura M, Wibowo N, Rizzo N, Okai T. BJOG. 2010 Apr;117(5):557-64.
5. Higher circulating mRNA levels of placental specific genes in a patient with placenta accreta. Simonazzi G, Farina A, Curti A, Pilu G, Santini D, Zucchini C, Sekizawa A, Rizzo N. Prenat Diagn. 2011 Aug;31(8):827-9.

[学会発表] (計 17 件)

1. 第 61 日本産科婦人科学会学術集会 京都 20090405 妊娠初期絨毛での酸化ストレス・血管増殖因子関連遺伝子の発現と妊娠高血圧症候群発症の関連について. 関沢明彦、清水華子、仲村将光、岡崎志帆、千葉博、岡井崇
2. 第 61 日本産科婦人科学会学術集会 京都 20090404. 当院における早期 preterm PROM の分娩予後:管理方針を変更して. 新城梓、大槻克文、澤田真紀、松浦玲、金子真由美、成島三里、長谷川潤一、松岡隆、市塚清健、下平和久、関沢明彦、岡井崇
3. 6th International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS-VI) Hong Kong Nov 9-11, 2009. Prediction of preeclampsia by analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15-20 weeks of gestation. Nakamura M, Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Okai T
4. 3rd SGI International Summit 2009: Preeclampsia. Nov 12, 2009 Sendai, Japan.

Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free mRNA in maternal plasma. Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Saito H, Okai T

5. 3rd SGI International Summit 2009: Preeclampsia. Nov 14, 2009 Sendai, Japan. Antioxidant supplementation for prevention of preeclampsia in low-antioxidant status of pregnant women. Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Wibowo N, Okai T
6. Meeting of American Society of Human Genetics. Oct 22, 2009 Honolulu, Hawaii. Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free mRNA in maternal plasma. Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Saito H, Okai T
7. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 22 年 4 月 24 日. 早期 preterm PROM の管理と分娩予後—管理方針変更による比較. 新城 梓、澤田真紀、大槻克文、小山寿美江、大場智洋、荒川香、徳永真由美、小出馨子、松岡 隆、市塚清健、関沢明彦、岡井崇
8. 15th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy 2010.7.11-14 Netherland. Prediction of preeclampsia by cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15-20 weeks. Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Shimizu H, Nakamura M, Koide K, Okai T
9. 第 46 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2010.7.12. 神戸. 早期 preterm PROM の管理と分娩予後:管理方針変更による比較. 新城梓、澤田真紀、大槻克文、松岡隆、市塚清健、関沢明彦、岡井崇
10. 第 46 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2010.7.12 神戸. 早産と高齢出産の関係について. 佐藤茉弥、大槻克文、大場智洋、荒川香、松浦玲、松岡隆、市塚清健、関沢明彦、岡井崇
11. 第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会 平成 23 年 7 月 11/12 日 札幌. 妊娠初期絨毛における遺伝子発現量の妊娠週数に伴う変化. 宮上哲、関沢明彦、小出馨子、仲村将光、四元淳子、岡井崇
12. 第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会 平成 23 年 7 月 11/12 日 札幌. 破水時期と母体感染の重症度の検討. 澤田真紀、新城梓、

大槻克文、徳中真由美、太田創、長谷川潤一、松岡隆、市塚清健、下平和久、関沢明彦、岡井崇

13. 第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会
平成 23 年 7 月 12 日 札幌. 早産期前期破水症例の子宮内感染の重症度予測に母体血中白血球数、CRP 値は有用か? 新城梓、澤田真紀、大槻克文、長谷川潤一、松岡隆、市塚清健、下平和久、関沢明彦、岡井崇
14. 22nd Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology, Taipei, Taiwan, Sep 25, 2011. (Symposium). Prediction of preeclampsia by an analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women. Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Nakamura M, Koide K, Okai T
15. 22nd Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology, Taipei, Taiwan, Sep 27, 2011. **PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS OF GENE EXPRESSIONS IN VILLOUS SAMPLES AT FIRST TRIMESTER.** Satoshi Miyagami, Akihiko Sekizawa, Keiko Koide, Masamitsu Nakamura, Takashi Okai
16. 22nd Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology, Taipei, Taiwan, Sep 27, 2011. DNA methylation patterns which are related to placentation. Keiko Koide, Akihiko Sekizawa, Satoshi Miyagami, Masamitsu Nakamura, Takashi Okai
17. 第 19 回日本胎盤学会学術集会 H23.9.30. 東京. シンポジウム「血管増殖因子と胎盤」. 妊娠高血圧症候群を発症する妊娠初期絨毛の病態評価とその発症予知への応用. 関沢明彦、小出馨子、仲村将光、宮上哲、福田麻美、岡井崇

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 裕 (SAITO HIROSHI)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：30119193

(2) 研究分担者

関沢 明彦 (SEKIZAWA AKIHIKO)
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号：10245839