

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791034

研究課題名 (和文) 子宮内胎児発育遅延の発症における胎盤形成遺伝子の関与に関する研究

研究課題名 (英文) A study regarding gene expressions of *Retrotransposon-like 1* in human placentas of intrauterine growth restriction

研究代表者

森岡 一郎 (MORIOKA ICHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80437467

研究成果の概要 (和文)：

本研究の目的は、レトロトランスポゾン由来の胎盤形成遺伝子 (*Rt11*) の発現異常がヒトの子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の発症に関与しているかを明らかにすることであった。IUGR 児および正常新生児の胎盤を比較すると、*Rt11* 遺伝子発現量が相違する結果が得られた。このことは、ヒトの IUGR の発症に *Rt11* 遺伝子の発現異常が存在することを世界に先駆けて明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

A purpose of this study was to find abnormal expressions of Retrotransposon-like 1 gene (*Rt11*) in human placentas of intrauterine growth restriction (IUGR). We found for the first time that different expressions of *Rt11* were observed in human placentas of IUGR and healthy newborns.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：子宮内胎児発育遅延、胎盤、レトロトランスポゾン由来遺伝子 (Retrotransposon-like 1: *Rt11*)

1. 研究開始当初の背景

我が国は、総出生数は減少しているにもかかわらず、低出生体重児の出生数は増加している。子宮内胎児発育遅延 (Intrauterine growth restriction: IUGR) は、低出生体重児の出生を引き起こす大きな原因のひとつである。IUGR の新生児は、子宮内で正常に発

育した新生児に比べ新生児死亡率や罹病率、後障害発生率が高い。また近年、IUGR は、乳幼児期の身体発育・精神発達に影響を及ぼすだけでなく、メタボリックシンドロームをはじめとする成人期生活習慣病の発症のリスクが高いことが明らかになっている。それゆえ、IUGR 発症の原因究明とその治療法の開発

が緊急課題である。

IUGR 発症の原因の多くは胎盤機能不全とされているが、その詳細なメカニズムは不明である。2008年に動物実験で、レトロトランスポゾン由来の遺伝子 (Retrotransposon-like 1: *Rt11*) が、胎盤内の胎児-母体間の毛細血管を形成し、ガス・栄養交換を行う上で重要な役割を担っていることが明らかされ、その異常がヒト IUGR 発症においても新たな原因のひとつではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) ヒトの重症 IUGR の発症にどの程度、胎盤の異常が関与しているかを疫学的に明らかにすること。

(2) *Rt11* 遺伝子がヒト胎盤で発現していることを確認すること。

(3) IUGR 児と正常新生児の胎盤で *Rt11* 遺伝子の発現量に違いがあるかを明らかにすること。

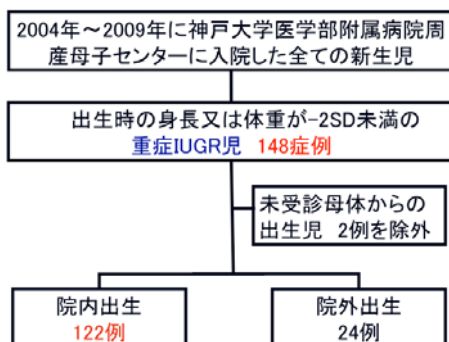
3. 研究の方法

(1) ヒトの重症IUGRの発症原因についての疫学的検討

①対象

2004年1月から2009年6月までに神戸大学医学部附属病院周産母子センターに入院した新生児のうち、「出生体重または出生身長が、在胎週数相当の-2SD以下」の定義を満たす重症 IUGR 児 148 例 (院内出生 122 例、院外出生 24 例) を対象とした。正確な在胎週数の決定が困難と考えた未受診妊婦よりの出生児は除外した (図1)。

図1 対象



②方法

詳細な IUGR の原因の検討が可能であった院内出生児 122 例の主要原因 (胎児因子、胎盤・臍帯因子、母体因子) について、診療録を用いて後方視的に検討した。

(2) 正常新生児およびIUGR児の胎盤における*Rt11* 遺伝子発現に関する検討

①倫理委員会への申請と対象胎盤検体の確保

神戸大学大学院医学研究科の医学倫理委員会へ申請し承認を得た。その後、IUGR 児 30 例と正常新生児 25 例の胎盤を採取し、RNA の抽出を行った。

②3' RACE 法による cDNA の作成

胎盤 RNA から 5' 末端にアダプター配列の付いたオリゴをプライマーにして逆転写反応を行い、cDNA を作成した。

③*Rt11* 遺伝子発現の検討

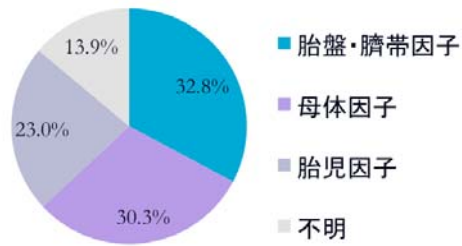
cctgcaacgttaccgtcagt をセンスプライマーとしてアダプタープライマーと、PCR (94 度×3 分、94 度×1 分、55 度×1 分、72 度×1 分: 35 サイクル、72 度×5 分) を行い、正常新生児と IUGR 児の胎盤で、PCR 産物の発現を比較した。

4. 研究成果

(1) ヒトの重症IUGRの発症原因

122 例の IUGR の主要原因に関しては、胎盤梗塞、小胎盤、臍帯辺縁付着などの胎盤・臍帯因子が 40 例 (32.8%)、妊娠高血圧症候群、母体自己免疫性疾患などの母体因子が 37 例 (30.3%)、奇形症候群、染色体異常、双胎児などの胎児因子が 28 例 (23.0%)、不明が 17 例 (13.9%) であった (図2)。重症 IUGR 発症の主要原因が胎盤臍帯の異常であることが明らかになった。

図2 ヒト重症 IUGR の発症原因の割合 (n=122)

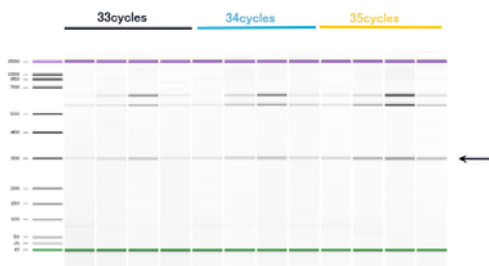


(2) 正常新生児およびIUGR児の胎盤における *Rt11* 遺伝子発現

①GAPDH (組織内で恒常的に発現している遺伝子) の発現の確認

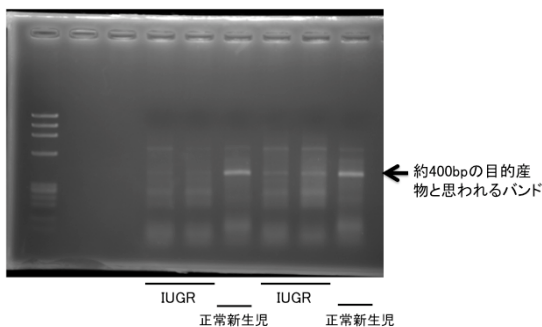
ヒト胎盤 RNA 逆転写反応を行い作成した cDNA で、GAPDH の発現を確認できた (図 3)。このことにより、本研究の実験系の確立に成功した。

図 3 ヒト胎盤における GAPDH の発現



②正常新生児および IUGR 児の胎盤における *Rt11* 遺伝子発現を検討した。胎盤由来 cDNA から目的の産物と考えられる約 400bp のバンドを確認できた。正常新生児の胎盤では発現が強く、IUGR 児の胎盤では発現が弱かった (図 4)。

図 4 ヒト胎盤における *Rt11* 遺伝子発現



(3) 得られた成果の国内外における位置づ

けとインパクト、今後の展望

我々は、現在までに臨床において、出生体重 412g (-4.3SD) の世界最小の生存例となる重症 IUGR 児を救命するなど (Fujioka K., Morioka I., et al. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010)、多くの重症の IUGR 症例を経験し、その症例を蓄積してきた。そこで、今までほとんど解析されてこなかった「出生体重または出生身長が、在胎週数相当の -2SD 以下」という重症 IUGR に着目し、100 例以上の症例でヒトの重症 IUGR の発症原因について、疫学的調査を行った。その結果、予想どおり、ヒトの重症 IUGR 発症の主原因が胎盤・臍帯の異常であることが明らかになった。このことは、胎盤異常の原因を明らかにすることの重要性を実地臨床の観点から明らかにしえたといえる。

しかし、重症の IUGR に多く見られた胎盤・臍帯因子による IUGR の発症機序は、いまだ不明である。そこで、近年、動物実験で関連が指摘されている *Rt11* 遺伝子の遺伝的素因の解析が必要であった。我々は、正常新生児および IUGR 児の胎盤において *Rt11* 遺伝子発現を検討した。興味深いことに、IUGR 児の胎盤の *Rt11* 遺伝子発現は、正常新生児と比較して減少している結果が得られた。このことは、マウスなどの動物だけでなく、ヒトの IUGR の発症において、*Rt11* 遺伝子の発現異常が存在することを、世界に先駆けて明らかにしえたといえる。

引き続き我々に課せられた課題は、この正常新生児と IUGR 児の胎盤での *Rt11* 遺伝子の発現量の相違がどこに起因するかである。近年、胎生期の環境刺激が DNA 塩基のメチル化による遺伝子発現の変化 (Epigenetic 変化) を来すことで、形態や機能の恒常的変化を来す可能性が報告されている。ヒトの IUGR の発症においても、Epigenetic 変化が関連しているこ

とが想定される。*Rt11*遺伝子は、プロモーター領域のDNAメチル化を介したEpigenetic変化により発現制御されるという基礎研究の報告があるため、今後、ヒトのIUGRにおいて、*Rt11*遺伝子のプロモーター領域のメチル化異常の存在を明らかにすることで、胎盤異常により発症するIUGRの原因を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究協力者には下線)

[雑誌論文] (計27件)

(1) Fujioka K, Morioka I, Miwa A, Morikawa S, Shibata A, Yokoyama N, & Matsuo M. Does thrombocytopenia contribute to patent ductus arteriosus? *Nat Med.* 17, 29-30, 2011 査読有

(2) Yagi M, Yamamori M, Morioka I, Yokoyama N, Honda S, Nakamura T, Okamura N, Okumura K, Negi A, Sakaeda T, & Matsuo M. *VEGF* 936C>T is Predictive of Threshold Retinopathy of Prematurity in Japanese Infants with Gestational Age of 30 weeks or less. *Research and Reports in Neonatology.* 1, 5-11, 2011 査読有

(3) Morioka I, Morikawa S, Yusoff S, Harahap IS, Nishimura N, Yokoyama N, Matsuo M, Van Rostenberghe H, & Nishio H. Genetic disorders associated with neonatal jaundice. *Eastern Journal of Medicine.* 15, 155-162, 2010 査読無

(4) Fujioka K, Morioka I, Urade T, Suzuki K, Morizane M, Yokoyama N, & Matsuo M. The lowest surviving birth weight infant from a systemic lupus erythematosus mother with antiphospholipid syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 23, 1050-1052, 2010 査読有

[学会発表] (計69件)

(1) Fujioka K, Morioka I, Matsuo K, Yokota T, Hashimoto F, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Yokoyama N, & Matsuo M. Does Thrombocytopenia Increase the Risk for Patent Ductus Arteriosus in Japanese Premature Newborns? The Society for Pediatric Research Conference, Denver USA, April 30 to May 3, 2011.

(2) 万代ツルエ、森岡一朗、三輪明弘、北山真次、横山直樹、松尾雅文：極低出生体重児の精神運動発達の特徴～子宮内胎児発育の程度と発達的な偏り～、第104回日本小児精神神経学会、徳島、11/13-14/2010

(3) 藤岡一路、森岡一朗、松尾希世美、横田知之、森川悟、三輪明弘、柴田暁男、横山直樹、松尾雅文：重症子宮内胎児発育不全児における尿道下裂合併症例とその出生時臨床像の検討、第55回日本未熟児新生児学会、神戸、11/5-7/2010

(4) 藤岡一路、森岡一朗、橋本総子、齋藤敦郎、森川悟、三輪明弘、柴田暁男、横山直樹、松尾雅文：子宮内胎児発育遅延の病態解明に向けて～-2SD未満のSGA児の周産期背景についての検討～、第54回日本未熟児新生児学会、横浜、11/29-12/1/2009

(5) 森岡一朗、橋本総子、齋藤敦郎、藤岡一路、森川悟、三輪明弘、柴田暁男、横山直樹、松尾雅文：極低出生体重児として出生した重症子宮内胎児発育不全児の3歳時の身体発育と精神運動発達の検討、第54回日本未熟児新生児学会、横浜、11/29-12/1/2009

(6) 森岡一朗：重症子宮内胎児発育遅延児の発達、第29回乳幼児の発達を考える会、神戸、11/25/2009

(7) 万代ツルエ、森岡一朗、北山真次、横山直樹、松尾雅文：極低出生体重児として出

生じた重症子宮内胎児発育不全児の3歳時の
頭囲と精神運動発達の検討、第102回日本小
児精神神経学会、名古屋、11/16-17/2009

〔図書〕（計9件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森岡 一郎 (MORIOKA ICHIRO)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80437467

(2) 研究協力者

藤岡 一路 (FUJIOKA KAZUMICHI)
神戸大学・医学部附属病院・臨床研究員
研究者番号：20568810