

機関番号：17301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791567

研究課題名 (和文) 胎児・胎盤機能の分子評価法の確立とその臨床的意義に関する研究

研究課題名 (英文) Establishment of molecular diagnosis of fetal/placental function

研究代表者

三浦 清徳 (MIURA KIYONORI)

長崎大学・病院・講師

研究者番号：00363490

研究成果の概要 (和文)：

胎盤機能の推定精度を向上させるためには、胎盤における遺伝子発現状態を反映する mRNA に加えて遺伝子発現制御因子である microRNA についても評価する必要があると考えている。そこで、母体血漿中へ流入する胎盤特異的 microRNA を網羅的にスクリーニングして、24 種類の妊娠と関連した胎盤特異的 microRNA を同定した。その大部分は、ゲノム刷り込み領域である Chromosome 19 microRNA cluster 領域に存在し、胎盤における後生的遺伝子修飾の状態や子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群あるいは胞状奇胎などの妊娠合併症の病態を推定しうる分子マーカーとしての臨床的有用性が見出された。

研究成果の概要 (英文)：

Several placental microRNAs have been identified as pregnancy-associated molecules having the potential to be used to estimate the condition of the placenta. However, the understanding of these novel molecules is still limited. The aim of this study was to isolate and characterize pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma.

In this study, by microarray-based screening of 723 human microRNAs, we selected 82 placenta-predominantly expressed microRNAs and identified 24 of them as pregnancy-associated microRNAs. These included 16 microRNAs clustered on 19q.13.42 and 5 microRNAs on 14q32. As the pregnancy progressed into the third trimester, the plasma concentrations of CF chromosome 19-derived microRNAs (has-miR-515-3p, has-miR-517a, has-miR-517c, has-miR-518b, and has-miR-526b) increased significantly, while that of CF has-miR-323-3p on chromosome 14q32.31 showed no change ($P = 0.2026$). These new pregnancy-associated microRNAs may be useful molecular markers for monitoring pregnancy-associated diseases, e.g. intragrowth retardation, preeclampsia, or hydatidiform mole.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：胎児・胎盤機能、分子評価法、microRNA

1. 研究開始当初の背景

妊娠・分娩管理において胎児・胎盤機能の正確な評価を可能にすることは、周産期医療レベルの向上につながり、社会的にも多大な恩恵をもたらす。しかし、胎児心拍数図、超音波検査および妊娠中に産生されるホルモン (E3 および hPL) 測定などの現在の検査方法ではその推定に限界があり、新たな胎児-胎盤系機能検査法の開発が望まれる。近年、母体の血漿中に胎児・胎盤由来 microRNA (cell-free fetal/placental miRNA) が流入していることが明らかになり、cff-miRNA 定量化は胎児・胎盤機能の推定に応用可能と期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、胎児・胎盤機能を推定する分子マーカーとして cff-miRNA に着目し、胎児・胎盤機能の網羅的な分子診断法の確立を目指す。そこで、まず、母体血漿中にはどのような cff-miRNA がどのような経路で流入しているのか明らかにする。次いで、母体血中へ流入している胎盤特異的 miRNA についてその臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は倫理委員会の承認を得て行われた。

1) pregnancy-associated microRNA の同定

正常妊娠末期の母体末梢血、胎盤組織および臍帯血を一組として計 2 組を採取し、各検体より抽出した RNA を用いて次世代高速シーケンスを行い、胎盤特異的 miRNA を選択した。次いで、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、胎盤特異的 miRNA のうち妊娠の前後で母体血漿中における胎盤特異的 miRNA 流入量が有意に減少するものを妊娠に関連した胎盤特異的 miRNA として同定した。

2) pregnancy-associated microRNA の臨床的有用性に関する検討

2-1) IUGR における臨床的有用性

intrauterine growth restriction (IUGR) 45 例と正常妊娠 50 例の胎盤よりそれぞれ RNA を抽出し、100ng/ μ l に濃度調整した。リアルタイム RT-PCR 法を用いて、IUGR と正常妊娠の胎盤における胎盤特異的 miRNA の発現レベルを定量し、正常妊娠の胎盤における発現レベルの中央値を基準として算出した multiple of median (MoM) 値を両群間で比較検討した。

2-2) complete hydatidiform mole における臨床的有用性

全胞状奇胎組織 14 例、6-10 週の絨毛組織を対象に全胞状奇胎組織特異的 miRNA を real-time PCR により定量し、MoM

(multiples of the median) 値を用いて比較検討した。

2-3) preeclampsia における臨床的有用性

日産婦分類で重症型の妊娠高血圧症候群と診断された妊娠末期の妊婦 16 例および妊娠週数をマッチさせた正常妊婦 12 例を対象とした。TaqMan miRNA Assay を用いたリアルタイム RT-PCR 法により母体血漿中に流入する cell-free pregnancy associated miRNA 流入量について定量解析を行った。

4. 研究成果

1) Pregnancy-associated microRNA の同定

網羅的スクリーニングにより選定された 82 種類の胎盤特異的 miRNA のうち、24 種類の胎盤特異的 miRNA を妊娠に関連した胎盤特異的 miRNA として同定した。その結果、その大部分は 19q13.42 領域もしくは 14q32 領域にクラスター (C19MC: chromosome 19 miRNA cluster もしくは C14MC: chromosome 14 miRNA cluster) を形成して存在していた (表 1)³⁾。C19MC 上の cfp-miRNA について母体血漿中の流入量は、妊娠初期から末期にかけて有意に増加していた (図 1)³⁾。

2) pregnancy-associated microRNA の臨床的有用性に関する検討

2-1) IUGR における臨床的有用性

miR-518b, miR-519d および miR526b の発現レベルは、正常妊娠の胎盤組織と比較して IUGR の胎盤組織において有意に低下していた (それぞれ 1.53 ± 1.20 vs 0.48 ± 0.47 ; $p < 0.001$ 、 1.04 ± 0.34 vs 0.65 ± 0.35 ; $p < 0.001$ および 1.06 ± 0.50 vs 0.77 ± 0.56 ; $p = 0.003$, Mann-Whitney U-test)。C19MC 領域に含まれる胎盤特異的 miRNA の中には、IUGR と関連するものが存在していた。

2-2) complete hydatidiform mole における臨床的有用性

has-miR-520b, 520f, 520c-3p の 3 つの全胞状奇胎特異的 miRNA が同定され、正常胎盤組織と全胞状奇胎組織の MoM 値は有意に全胞状奇胎組織で発現が高かった (Mann-Whitney 検定、 $p < 0.05$)。 (520b : 1.00 (2.47-0.01)、 1.51 (2.54-0.02)、5220f : 1.00 (1.85-0.01)、 1.89 (4.23-4.23-0.02)、520c-3p : 1.00 (1.84-0.01)、 1.31 (2.95-0.01)) 3 つの全胞状奇胎特異的 miRNA すべてが 19q13.42 のクラスター領域 (chromosome 19

miRNA cluster : C19MC) に存在していた。
2-3)preeclampsia における臨床的有用性
 PIH における has-miR-515-3p および
 hsa-miR-519b-3p の流入量は、それぞれ
 3957.7+/-613.5 copies/ μ L および
 937.9+/-84.5 copies/ μ L であり、正常妊
 婦のそれは 1955.2+/-287.3 copies/ μ L お
 よび 533.6+/-70.4 copies/ μ L であつた
 (P=0.0274 および 0.0019, Mann-Whitney
 の U 検定)。
 母体血中胎盤特異的 miRNA の流入量は、
 preeclampsia と関連していた。

以上より、C19MC は胎盤および胎児脳で
 特異的に発現しており、その発現はクラス
 ター上流のメチル化状態により制御され、
 ゲノム刷り込み機構との関連が示唆されて
 いる。したがって、母体血漿中の C19MC に
 含まれる cell-free miRNA を解析すること
 で、胎盤における後生的遺伝子修飾の状態
 を推定しうる可能性がある。また、C19MC
 に含まれる pregnancy associated miRNA
 には、IUGR、complete hydatidiform mole
 あるいは preeclampsia などの異常妊娠の
 病態を推定しうる分子マーカーとしての可
 能性も見出された。

表 1. 母体血漿中に流入している妊娠に關
 連した胎盤特異的 microRNA

| 妊娠に関連した胎盤特異的 microRNA | 染色体局在 | 母体血漿中 cell-free placental miRNA 流入量 (copies/mL) | | P 値 |
|-----------------------|----------|---|-------------------|--------|
| | | 分娩前 | 分娩後 | |
| 1 hsa-miR-515-3p | 19q13.42 | 18100 (9100-83500) * | 1700 (1200-4200) | 0.0051 |
| 2 hsa-miR-515-5p | 19q13.42 | 13100 (6200-38900) | 1700 (0-6800) | 0.0069 |
| 3 hsa-miR-517a | 19q13.42 | 27100 (11300-73100) | 1600 (1200-2300) | 0.0051 |
| 4 hsa-miR-517c | 19q13.42 | 29300 (12300-68400) | 1400 (1200-4500) | 0.0051 |
| 5 hsa-miR-517* | 19q13.42 | 4100 (13300-97300) | 1400 (1300-18400) | 0.0069 |
| 6 hsa-miR-518b | 19q13.42 | 26000 (5300-78200) | 1600 (1400-2300) | 0.0051 |
| 7 hsa-miR-518c | 19q13.42 | 23000 (7100-9390) | 2000 (0-23200) | 0.0166 |
| 8 hsa-miR-518e | 19q13.42 | 22400 (1800-33800) | 1600 (1200-10800) | 0.0166 |
| 9 hsa-miR-519a | 19q13.42 | 10100 (2700-84300) | 1750 (1100-7100) | 0.0125 |
| 10 hsa-miR-519d | 19q13.42 | 4000 (1800-9300) | 1800 (0-2800) | 0.0069 |
| 11 hsa-miR-520a-5p | 19q13.42 | 9100 (1300-34300) | 1400 (1300-3900) | 0.0093 |
| 12 hsa-miR-525-5p | 19q13.42 | 9100 (3100-94800) | 4500 (0-8500) | 0.0367 |
| 13 hsa-miR-526b | 19q13.42 | 25300 (12300-53100) | 1600 (1200-2300) | 0.0051 |
| 14 hsa-miR-498 | 19q13.42 | 28700 (3800-94900) | 5500 (0-9800) | 0.0284 |
| 15 hsa-miR-525-3p | 19q13.42 | 9300 (1800-43000) | 1900 (1300-3400) | 0.0069 |
| 16 hsa-miR-526b* | 19q13.42 | 4300 (1300-9500) | 1600 (0-1900) | 0.0166 |
| 17 hsa-miR-323-3p | 14q32.31 | 18600 (7700-35900) | 2100 (1500-5400) | 0.0051 |
| 18 hsa-miR-433 | 14q32.2 | 9000 (4200-18300) | 2200 (1400-5400) | 0.0125 |
| 19 hsa-miR-411 | 14q32.31 | 4900 (1300-9300) | 2000 (1200-4300) | 0.0218 |
| 20 hsa-miR-487a | 14q32.31 | 6700 (2100-11900) | 5600 (0-8400) | 0.0367 |
| 21 hsa-miR-154* | 14q32.31 | 8800 (4900-15900) | 7000 (1500-9300) | 0.0125 |
| 22 hsa-miR-218 | 4p15.31 | 5800 (2700-12000) | 4200 (0-9900) | 0.0166 |
| 23 hsa-miR-204 | 9q21.12 | 3900 (1300-8700) | 2500 (0-3900) | 0.0367 |
| 24 hsa-miR-141 | 12p13.31 | 17000 (5000-281200) | 7400 (1800-14900) | 0.0069 |

* 中央値 (最大値-最小値)

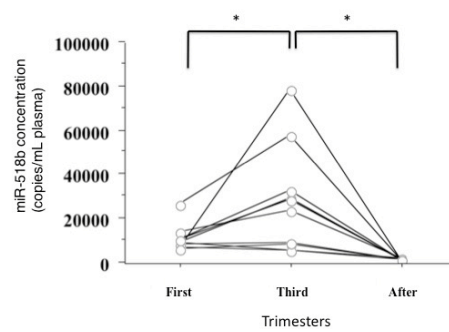


図 1 妊娠中の母体血漿中胎盤特異的 microRNA 流入量の推移

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 11 件)

(1). Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, and Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. *Journal of Human Genetics* (in press). 査読有り

(2). Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, and Masuzaki H. Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. *Journal of Human Genetics* (in press). 査読有り

(3). Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Ikemoto R, Miura S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Pre-vaccination epidemiology of human papillomavirus infections in Japanese women with abnormal cytology. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* (in press). 査読有り

(4). Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of FGFR1. *Human Reproduction* 2010;25:1076-1080. 査読有り

(5). **Miura K**, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Kinoshita A, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. The possibility of microarray-based analysis using cell-free placental mRNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* 2010; 30:849-861. 査読有り

(6). **Miura K**, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 2010;56:1767-1771. 査読有り

(7). Shimada T, Yamaguchi N, Nishida N, Yamasaki K, **Miura K**, Katamine S, Masuzaki H. Human Papillomavirus DNA in Plasma of Patients with HPV16 DNA-positive Uterine Cervical Cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;40:420-424. 査読有り

(8). Shimada T, Inoue T, Abe S, Hiraki K, **Miura K**, Hayashi T, Masuzaki H. Placental multiple chorionic cysts in maternal scleroderma. *J Med Ultrasonics.* 2010; 37:209-212. 査読有り

(9). **三浦清徳**、増崎英明
特集 産科医療における遺伝学
新たな探求 Cell-free placental mRNA/microRNA の臨床的意義とその応用
産婦人科の実際 第 59 巻 第 12 号
2043-2049, 2010. 査読なし

(10). **三浦清徳**、増崎英明
-妊産婦救急疾患- アナフィラキシーショックへの対応
周産期医学 第 40 巻 第 6 号 727-731,
2010. 査読なし

(11). **三浦清徳**、山崎健太郎、三浦生子、中山大介、増崎英明
TTTS のリスクを推定する分子診断法の確立を目指して-母体血漿中胎盤由来 mRNA を用いた検討-
日本産婦人科・新生児血液学会誌 vol118, No. 2, 107-113, 2009. 査読なし

[学会発表] (計 20 件)

(1)2011 年 1 月 29 日 第 8 回中国四国出生前医学研究会 (愛媛県民文化会館、松山)

三浦清徳
特別講演「母体血中 cell-free mRNA/miRNA の同定とその臨床応用」

(2)2010 年 11 月 10-12 日 第 55 回日本生殖医学会 (徳島市、徳島)
三浦清徳、山崎健太郎、三浦生子、東島愛、城 大空、阿部修平、増崎英明
ART 妊娠における母体血漿中 cell-free mRNA レベルに関する検討

(3)2010 年 10 月 27-30 日 第 55 回日本人類遺伝学会 (大宮ソニックシティ、埼玉県)
三浦清徳、東島 愛、三浦生子、阿部修平、山崎健太郎、城 大空、長谷川ゆり、中山大介、三嶋博之、木下 晃、吉浦孝一郎、増崎英明
HELLP 症候群と関連した胎盤特異的 microRNA の網羅的解析

(4)2010 年 10 月 10 -14 日 20th ISUOG World Congress: (Prague, Czech Republic)
Miura K, Yamasaki K, Miura S, Nakayama D, Yoshiura K, Nakayama M, Masuzaki H
A case of mesenchymal diaplasia

(5)2010 年 9 月 30 日-10 月 1 日 第 18 回日本胎盤学会学術集会 (ホテル日航熊本、熊本)
三浦清徳、東島 愛、城 大空、長谷川ゆり、三浦生子、阿部修平、山崎健太郎、増崎英明
胎盤由来 cell-free mRNA/microRNA の臨床的意義とその応用

(6)2010 年 7 月 31 日 第 22 回新潟周産母子研究会学術講演会 (新潟大学医学部有壬会館)
三浦清徳
特別講演「周産期の遺伝カウンセリング」

(7)2010 年 7 月 29-31 日 第 51 回日本産科婦人科内視鏡学会 (京王プラザホテル、東京都)
三浦清徳、平木宏一、北島道夫、井上統夫、松脇隆博、増崎英明
腹腔鏡下手術における予防的抗生剤 (レボフロキサシン 500mg 内服) 投与に関する検討-レボフロキサシン組織内濃度測定の結果を加えて-

(8)2010 年 7 月 11-13 日 第 46 回日本周産期・新生児医学会 (神戸国際会議場、神戸)
三浦清徳、東島 愛、阿部修平、三浦生子、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明
新規胎盤特異的 microRNA の網羅的スクリーニング

(9) 2010年7月8-10日 第48回日本婦人科腫瘍学会 (つくば国際会議場、茨城)

三浦清徳、山崎健太郎、池本理恵、三浦生子、嶋田貴子、濱口大輔、小寺宏平、藤下晃、鮫島哲郎、村上誠、中山大介、吉浦孝一郎、増崎英明
妊娠中の子宮頸部細胞診における日母分類、ベセスダシステムおよびHPVスクリーニングの比較

(10) 2010年5月29-31日 第82回日本超音波医学会 (京都)

三浦清徳、肥後貴史、高橋典子、三浦生子、宮本正史、吉田 敦、山崎健太郎、増崎雅子、吉村秀一郎、増崎英明
二卵性一絨毛膜双胎の一例

(11) 2010年4月22-25日 第62回日本産科婦人科学会 (東京フォーラム、東京都)

三浦清徳、東島 愛、阿部修平、三浦生子、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明
母体血中胎盤特異的 microRNA の分子遺伝学的特徴と妊娠高血圧症候群における流入パターンに関する検討

(12) 2010年4月21日 11th Symposium German-Japanese Society of Obstetrics and Gynecology (Kumamoto, Japan)

Miura K
Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal circulation

(13) 2009年11月12-14日 3rd SGI International Summit 2009 (Sendai, Japan)

Miura K, Miiura S, Yamasaki K, Shimada T, Higashijima A, Abe S, Nakayama D, Masuzaki H
Microarray-based analysis using cell-free mRNA in the plasma of pregnant women has a potential to estimate the placental status in pre-eclampsia

(14) 2009年10月31日 12nd Congress of the Korean Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (Naju city, Korea)

Miura K and Masuzaki H
Does increased nuchal translucency indicate a fetal abnormality in Japan ?

(15) 2009年10月20-24日 The ASHG 59th Annual Meeting (Honolulu, Hawaii, USA)

Miura K, Miiura S, Yamasaki K, Shimada T, Higashijima A, Abe S, Nakayama D, Masuzaki H

Microarray-based analysis using cell-free mRNA in pregnant women has a potential to estimate a placental status

(16) 2009年9月23-25日 日本人類遺伝学会 第54回大会 (東京)

三浦清徳、増崎英明
Educational Program 4 『出生前診断』
Nuchal translucency : NT

(17) 2009年7月30日-8月1日 第16回日本遺伝子診療学会 (北海道)

三浦清徳、三浦生子、東島 愛、阿部修平、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明
母体血中への胎盤特異的 miRNA の流入量に関する検討

(18) 2009年7月12-14日 第45回日本周産期・新生児学会 (名古屋)

母体血に流入する胎盤特異的 miRNA とその流入量に関する検討
三浦清徳、三浦生子、東島 愛、阿部修平、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明

(19) 2009年6月12-13日 第19回日本産婦人科・新生児血液学会 (北海道)

三浦清徳、三浦生子、東島 愛、阿部修平、山崎健太郎、嶋田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明
母体血中胎盤特異的 miRNA 流入量の分娩に伴う変化に関する検討

(20) 2009年4月3日-5日 第61回日本産科婦人科学会学術講演会 (京都)

三浦清徳、三浦生子、山崎健太郎、吉田敦、嶋田貴子、中山大介、増崎英明
母体血に流入する胎盤特異的 miRNA の網羅的スクリーニング

[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

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/gyneclgy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 清徳 (MIURA KIYONORI)

長崎大学・病院・講師

研究者番号：00363490

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：