様式Ｃ－１９

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２５年４月２６日現在

機関番号：１７３０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2012
課題番号：22591827
研究課題名（和文）　癒着胎盤の分子マーカーの同定とその臨床的意義に関する研究

研究課題名（英文）　Identification of molecular marker for placenta accreta

研究代表者
増崎　英明（MASUZAKI　HIDEAKI）
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00173740

研究成果の概要（和文）：
網羅的解析により、胎盤特異的 mRNA および microRNA (miRNA)を同定した。胎盤特異的 mRNA のうち母体血漿中へ流入する human placental lactogen (hPL) mRNA は、前置胎盤のうち子宮摘出が必要な癒着胎盤のリスクを推定する分子マーカーとして有用と考えられた。また、胎盤特異的 miRNA の多くは C19MC 領域に存在し、発現プロファイリングは妊娠経過に伴いほとんど変化しないが、その発現量は妊娠経過とともに上昇していた。C19MC に存在する胎盤特異的 miRNA 発現量は、前置胎盤における癒着胎盤の危険性を予測する指標になり得ると期待された。また、術中超音波検査は前置胎盤における癒着胎盤の評価に有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：
In this study, by high-throughput comparative analysis, placenta specific mRNAs/microRNAs (miRNAs) were identified. Regarding the placenta specific mRNAs, human placental lactogen (hPL) levels in maternal plasma may be a predictive marker for placenta accrete with total hysterectomy. Regarding the placenta specific microRNAs (miRNAs), most of them located on chromosome 19 microRNAs cluster region (C19MC). The expression levels of miRNAs on C19MC were increasing as the progress of pregnancy, while the expression profiling of them were not changed. The circulating levels of placenta specific miRNAs on C19MC in maternal plasma may be predictive markers for the risk of placenta accreta in cases of placenta previa. Furthermore, the intraoperative ultrasound examination is expected to be useful for evaluating the degree of placenta accrete in cases of placenta previa.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総　計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：産科婦人科学
キーワード：癒着胎盤、胎盤、mRNA、microRNA、術中超音波検査、母体血漿

１．研究開始当初の背景

癒着胎盤は脱落膜の欠如により絨毛が子宮筋層へ侵入した状態であり、分娩時に胎盤剥離が困難な場合あるいは出血のコントロールが不可能な状況下では子宮摘出も考慮される。とくに、前置胎盤を認める妊婦は常に癒着胎盤のリスクを伴っているため、超音波やMRI検査などの画像診断を用いて癒着胎盤を出生前に診断する試みがなされているが、そのリスク予測については困難な状況にある。私どもの検討でも、超音波所見で癒着胎盤と推定したもののうち約半数は胎盤剥離と子宮の温存が可能であった。つまり、母体・胎児にとって極めて重篤な合併症であるにも関わらず、子宮を摘出するような癒着胎盤の有無は分娩時に初めて診断されている現状がある。

すなわち、癒着胎盤の有無を推定するマーカーの同定とその臨床応用は、産科領域における最重要課題の一つと考えられる。これまでもα-フェト蛋白などのbiological factorがその候補として注目されたが、いずれも有用性が証明されたとは言いがたい。前置胎盤に伴う癒着胎盤のリスクに対する十分な術前準備を可能にするため、癒着胎盤の有無を推定しうる分子マーカーの同定が望まれている。

２．研究の目的

本研究では、分子診断を取り入れた癒着胎盤の術前評価法の確立を目指す。期間内の明確なターゲットとして、以下の４項目を挙げる。

1.癒着胎盤のリスクを推定するために、妊娠初期の胎盤特異的遺伝子を網羅的に同定する；正常妊娠における妊娠12-14週の母体血および絨毛組織を一組にして、母体血および絨毛組織の遺伝子発現量を比較することにより、妊娠初期における胎盤特異的mRNA/miRNAを同定する。

2. 母体血による癒着胎盤の病態を推定しうる可能性を検証する：リアルタイムＲT-ＰＣＲ法を用いて胎盤特異的遺伝子の母体血漿中への流入量を定量化し、cell-free mRNA/miRNA 流入量とのちの癒着胎盤の有無との関連を明らかにする。

3. 癒着胎盤の検出率が高いマーカーセットをスクリーニングする。

4. 分子マーカーセットを用いた癒着胎盤の術前診断の可能性を明らかにする：

３．研究の方法

1.検体集積：

これまで、長崎大学病院を受診した妊婦のうち、同意を得た約400例について妊娠中経時的（妊娠12週、16週、20週、24週、28週、32週、36週、38週および産褥）に母体血漿を集積保存している。前置胎盤は約30例（うち癒着胎盤で子宮を摘出した症例は５例）を現有している。

2.cell-free mRNA/microRNAの抽出：

妊娠初期の母体血漿1.6ccよりQiagen RNeasy Kitと Invitrogen Isogenを用いてcell-free mRNAを抽出する。

3.RNAの抽出：

a.母体末梢血と絨毛組織を一組とし、妊娠初期のアレイ解析（mRNA）および次世代高速シークエンス解析(miRNA)に用いる。

b.同意を得て採取した絨毛は RNAlater ですぐに安定化され、正常核型であることをG-banding法で確認するまで、-80℃フリーザーに保存される。

c.母体末梢血 4cc および絨毛組織 5g より、それぞれ Quiagen Blood Mini Kit および Quiagen RNeasy kitを用いてRNAを抽出する。

d. ｒＲＮＡが分解されることなく抽出されていることを電気泳動で確認し、RNA 濃度をNanoDropND-1000 で計測したのち、マイクロアレイ解析を開始するまで-80℃フリーザーに保存する。

4.cDNA マイクロアレイ解析と母体血漿中における胎盤特異的遺伝子の同定：

a.絨毛および母体血それぞれより抽出したRNA 5µg を cDNA マイクロアレイ解析に用いる。

b.母体白血球と絨毛におけるそれぞれのアレイ解析結果を比較検討することにより、胎盤組織で発現しているが母体白血球では発現を認めない胎盤特異的 mRNA を同定する。すなわち、これらの遺伝子は、母体血漿中に流入する胎盤由来 mRNA の同定につながり、血漿中 cell-free mRNA をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR による定量化が可能になる。

5.胎盤特異的microRNAの同定：

まず、イルミナ社ゲノムアナライザーを用いた次世代高速シーケンス法により、各検体間の発現レベルを比較検討した。発現レベルはリード数で算出し、5 リード未満のものを陰性とした。臍帯血および母体白血球におけるリード数は陰性かつ胎盤組織におけるそれは 100 リード以上の miRNA を胎盤特異的miRNAとした。次いで、選択されたmiRNAが

母体血漿中で同定可能な miRNA なのか否か、microRNA TaqMan probe を用いて定量解析して検討する。定量可能な miRNA を母体血中胎盤特異的 miRNA として、癒着胎盤の推定に応用可能か否か検討する。

6. TaqMan プローブの作成および条件設定:
アプライドアシステムのサイトには、すでに数万個のヒト遺伝子特異的 TaqMan プローブが掲載され、その増幅効率及び特異性に関して確認保証された状態で販売されている。私どもは、このプローブをこれまでの研究にも使用しており（Miura K et al. Clin Chem 2006)、その検索法には熟達している。また、本サイトに掲載されていない mRNA については、GenBank あるいは UCSC Human Genome Browser を用いて、その遺伝子配列を同定して TaqMan プローブを作成する。

7. 胎盤特異的 cell-free mRNA/miRNA の臨床的意義を評価する:
コントロールにおける結果と比較検討して、個々の cell-free mRNA/miRNA の臨床的意義を検討する。この際に、コントロールの cff-mRNA/miRNA レベルと比較して疾患群におけるそれが統計学的有意差（$p<0.05$）を持って変化しているものは癒着胎盤の分子マーカーとして選定される。

8. 癒着胎盤における術中超音波検査の有用性に関する検討: 前置胎盤例の帝王切開術では、すべて術中超音波検査を実施し、癒着胎盤の有無を超音波検査で推定しうるのか否か検討する。

４．研究成果

・母体血漿中胎盤特異的 mRNA の同定

GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて約 54,000 個の遺伝子の発現状態を解析した。母体血球における発現量は極めて低く、かつ胎盤組織では発現量が非常に高い遺伝子群のうち、胎盤組織における発現量が血球におけるそれと比較して、2,500 倍以上の遺伝子を候補分子マーカーとして選択した。その結果を、散布図に示す（図 1)。X 軸および Y 軸は、それぞれ母体血球における発現量および胎盤組織における発現量を表す。黒丸でスポットされているものは候補分子マーカーとなりうる遺伝子群で、データベース解析の結果、その対象を 50 個にまで絞り込むことができた。その中には、母体血清マーカー（*INHBA*、*PAPPA* など）、妊娠性蛋白（*hPL*、*CGB*、*CGA*、*PSG* など）あるいは *Syncytin* などの絨毛の形成発育に重要な遺伝子が数多く含まれていた。ついで、その中から母体血漿中へ流入しており、cff-mRNA として定量可能な遺伝子群を選択した。単胎妊娠 152 例から妊娠 12-36 週の期間に経時的に採血された血漿サンプルを用いて、それぞれ 50 個の遺伝子の cff-mRNA 流入量を定量解析した。その結果、母体血漿中で定量可能であった遺伝子をさらに９個にまで絞り込むことができた。その内訳は、妊娠性蛋白である *PSG2*、*PSG3*、*hPL*、*CGB* および *CGA*、絨毛の進入あるいは母体・胎盤循環の形成に重要なヒトレトロウイルスである *Syncytin* および *Syncytin-2*、そして絨毛間の接着因子の働きをする *ADAM12* および胎盤組織で強発現している *RAI14* であった。

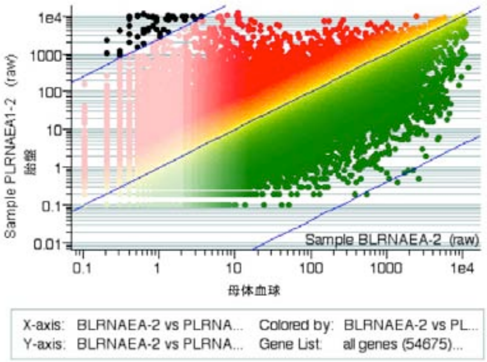

図１．網羅的解析による胎盤および母体血における mRNA 発現量の散布図
縦軸は胎盤 mRNA, 横軸は母体血 mRNA

・癒着胎盤における母体血漿中胎盤特異的 mRNA の臨床的意義：

妊娠 29－32 週の母体血漿中における cell-free hPL mRNA 流入量の上昇と前置胎盤との関連を検討したところ、子宮摘出が必要であった前置胎盤症例における cell-free hPL mRNA 流入量は、子宮を温存することが可能であった前置胎盤症例におけるそれと比較して有意に上昇していた（図 4）[11]。前者はいずれも組織学的に穿通胎盤あるいは嵌入胎盤と診断された。すなわち、cff-DNA と同様に、cfp-mRNA にも、癒着胎盤のために遺残した胎盤の状態を評価する、あるいは子宮摘出を必要とするような癒着胎盤を出生前に推定する分子マーカーとしての可能性が見出された。

・胎盤特異的 microRNA の同定と癒着胎盤における臨床的有用性に関する検討

胎盤絨毛組織及び母体血液を一組として、妊娠初期および末期の計2組について、それぞれの検体よりtotal RNAを抽出した。それぞれの検体について次世代高速シークエンス法による網羅的解析を行い、母体血液では発現していないが胎盤組織では発現している上位10個のmicroRNA(miRNA)を胎盤特異的miRNAとして選択した。妊娠初期の胎盤特異的miRNAとして、発現レベルが高いものから順にmiR-518b、

miR-519a-2、miR-1323、miR-516a-5p、miR-517a、miR-515-5p、miR-512-3p、miR-516b、miR-520hおよびmiR-517cが同定され（最小値-最大値：16941リード-134590リード）、全て19q13.42領域（C19MC）に存在していた。妊娠末期の発現プロファイリングと比較すると、妊娠初期と末期の胎盤特異的miRNAはmiR-517c以外の9個は一致しており、いずれの胎盤特異的miRNAも妊娠初期から末期にかけて発現量が2倍以上に上昇していた（最小値-最大値：2.05倍-7.26倍）。胎盤特異的miRNA の発現プロファイリングは妊娠経過に伴いほとんど変化しないが、その発現量は妊娠経過とともに上昇していた（図２）。C19MCに存在する胎盤特異的miRNA発現量は、前置胎盤あるいは癒着胎盤を予測する指標になり得ると期待された。

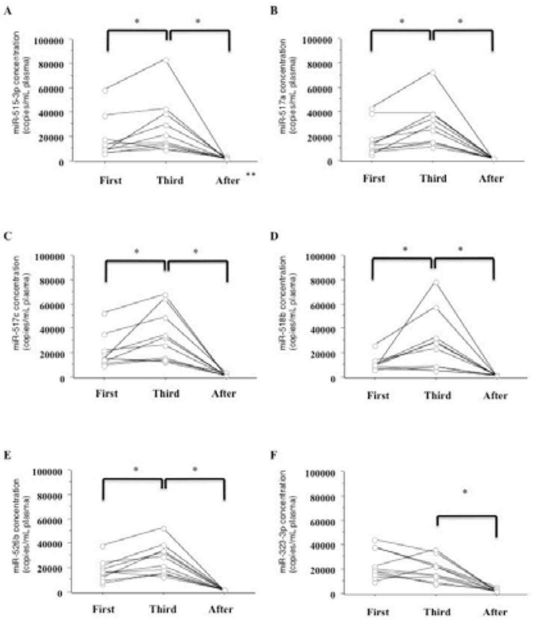

図２．胎盤特異的microRNAの同定と妊娠経過による母体血漿中への流入量の推移：

・癒着胎盤の診断における術中超音波検査の有用性に関する検討：

前置胎盤38例に対して、帝王切開時に術中超音波検査を行った。従来の術前超音波検査に加え、帝王切開時にリニア型プローブで１１MHz以上の高周波を用いて術中超音波検査を行った。術中超音波検査により、全例に脱落膜の詳細な評価が可能であった。癒着胎盤であった症例では術前超音波検査よりも術中超音波検査のほうがより実際の所見を反映しており、術中超音波検査は前置胎盤における癒着胎盤の評価に有用と考えられた。

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 17 件）

1：Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki K, Yoshida A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. J Hum Genet. (in press)

2：Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. Prenat Diagn. 2013;33:214-222.

3：Moriuchi H, Masuzaki H, Doi H, Katamine S. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. Pediatr Infect Dis J. 2013;32:175-177.

4：Khan KN, Kitajima M, Fujishita A, Hiraki K, Matsumoto A, Nakashima M, Masuzaki H. Pelvic pain in women with ovarian endometrioma is mostly associated with coexisting peritoneal lesions. Hum Reprod. 2013;28:109-118.

5：Khan KN, Kitajima M, Yamaguchi N, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H. Role of prostaglandin E2 in bacterial growth in women with endometriosis. Hum Reprod. 2012; 27: 3417-3424.

6：Matsuda K, Miura S, Kurashige T, Suzuki K, Kondo H, Ihara M, Nakajima H,

Masuzaki H, Nakashima M. Significance of p53-binding protein 1 nuclear foci in uterine cervical lesions: endogenous DNA double strand breaks and genomic instability during carcinogenesis. Histopathology. 2011;59:441-451.

7: 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. J Obstet Gynaecol Res. 2011;37:1666-1670.

8: Kitajima M, Khan KN, Hiraki K, Inoue T, Fujishita A, Masuzaki H. Changes in serum anti-Müllerian hormone levels may predict damage to residual normal ovarian tissue after laparoscopic surgery for women with ovarian endometrioma. Fertil Steril. 2011;95:2589-2591.

9: Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. J Hum Genet. 2011;56:296-299.

10: Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. J Hum Genet. 2011;56:313-315.

11: Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H. Cell proliferation effect of GnRH agonist on pathological lesions of women with endometriosis, adenomyosis and uterine myoma. Hum Reprod. 2010;25:2878-2890.

12: Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. Clin Chem. 2010;56:1767-1771.

13: 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. Prenat Diagn. 2010;30:849-861.

14: Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T, Nakashima M, Fujishita A, Ishimaru T, Masuzaki H. Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. Fertil Steril. 2010;94:2860-2863.

15: Araki M, Nishitani S, Ushimaru K, Masuzaki H, Oishi K, Shinohara K. Fetal response to induced maternal emotions. J Physiol Sci. 2010;60:213-220.

16: 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.

17: 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 fibroblast growth factor receptor 1. Hum Reprod. 2010;25:1076-1080.

〔学会発表〕(計 5 件)
1. 増崎英明
産科診療から見た生殖医療
第 55 回日本生殖医学会
2010 年 11 月 10-12 日(徳島)
2. 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
第 18 回日本胎盤学会学術集会
2010 年 9 月 30 日-10 月 1 日 (熊本)
3. 吉田　敦、阿部修平、谷川輝美、山崎健太郎、三浦生子、三浦清徳、中山大介、増崎英明
術中超音波の有用性に関する検討
第 62 回日本産科婦人科学会
2010 年 4 月 22-25 日 (東京)
4. 吉田　敦、山崎健太郎、阿部修平、三浦清徳、吉村秀一郎、増崎英明
大動脈クランプが著効した前置癒着胎盤の一例
第 47 回日本周産期･新生児医学会
2011.7.10-12 (札幌)
5. 吉田　敦、谷川輝美、三浦清徳、吉村秀一郎、増崎英明
帝王切開術における術中超音波検査
第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会
2011.8.29-31 (大阪)

〔図書〕(計 2 件)
1. 増崎英明　メジカルビュー社　前置胎盤・前置癒着胎盤の手術　2012　153 頁
2. 増崎英明　メディカ出版　画像でみる産科アトラス　2012　218 頁

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)
該当なし

○取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/gyneclgy/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
増崎英明 (MASUZAKI HIDEAKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00173740

(2)研究分担者
三浦清徳 (MIURA KIYONORI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：00363490

(3)連携研究者
該当なし