

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592435

研究課題名(和文) 侵入奇胎の成因に関する遺伝子の探索

研究課題名(英文) Screening of the specific gene of invasive moles

研究代表者

碓井 宏和 (USUI, Hirokazu)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90375634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：侵入奇胎となった雄核発生奇胎と自然寛解した雄核発生奇胎由来の絨毛外栄養膜細胞の初代培養細胞(EVTs細胞)の発現パターンを比較し、侵入奇胎特異遺伝子の同定を目指した。15例の雄核発生奇胎の初代培養を行ったが、侵入奇胎になった症例は、1例のみであり、当初の目的には十分ではなかった。初代培養を行い純化したEVTs細胞と培養前の絨毛における、key 遺伝子の発現を比較した。また、絨毛の分化制御に重要であるインプリント遺伝子のメチル化状態を確認し、EVTs細胞では、p57KIP2の発現が増加しているが、発現増加機序としては、メチル化以外の制御機構が関連していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We planned to identify the specific gene of invasive mole development, compared the expression pattern of primary culture cell of extravillous trophoblasts between the case of gestational trophoblastic neoplasia (GTN) development and the case primary remission. We purified 15 cases of EVT cells. Among them, only one case developed to GTN. The case that became the invasive mole was not enough for the original purpose. We compared the expression of key genes in the villus differentiation between the purified EVT and uncultured villous tissue. In addition, we confirmed a methylation status of the imprinted gene, KvDMR, which controlled the expression of p57KIP2. The increased expression level of p57KIP2 was regulated by the possible mechanism except for the methylation of imprinted gene, KvDMR.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：侵入奇胎 雄核発生奇胎 トロホプラスト 絨毛外栄養膜細胞 低酸素 インプリント遺伝子 p57KIP2

1. 研究開始当初の背景

全胎状奇胎の約 10-30% に続発症が生じるが、部分胎状奇胎・流産ではほとんど発症しないため、真の全胎状奇胎；雄核発生奇胎を正確に診断することは重要である。しかしながら、全胎状奇胎のどの症例が続発症になるのかを予測する方法はない。

胎状奇胎組織の解析から、侵入奇胎の発症が予測できれば、奇胎後管理に有用であり、患者にも恩恵がある。侵入奇胎になった胎状奇胎組織、侵入奇胎にならずに寛解した胎状奇胎組織を比較によって侵入奇胎に特異的な因子の探索を考えた。

胎状奇胎組織は細胞性栄養膜細胞、合体性栄養膜細胞、絨毛外絨毛細胞、間質細胞などの多様な細胞組織で構成されるために、比較による差が見えにくい。そこで、初代培養し純化した絨毛外トロホプラスト様細胞 (EVTs) を解析対象に絞り込み侵入奇胎の成因に寄与する遺伝子を抽出することを計画した。絨毛外絨毛細胞は、母体に浸潤して行く最前線の絨毛細胞集団であるため、この細胞集団に、侵入奇胎になるかならないかの鍵があるのではないかと予想した。

2. 研究の目的

遺伝学的に正確に診断された雄核発生奇胎の奇胎組織および初代培養により得られた絨毛外トロホプラスト様細胞 (EVTs) における遺伝子発現をマイクロアレイ法で検討する。侵入奇胎となった雄核発生奇胎と自然寛解した雄核発生奇胎、それぞれの EVTs 間の発現パターンを比較し、侵入奇胎特異遺伝子 (タンパク) の同定を目指す。また、侵入奇胎特異タンパクに対する抗体を用いた免疫染色法を確立し、胎状奇胎組織切片の免疫染色による侵入奇胎発症予測の臨床応用を進める。さらに、これを起点として、侵入奇胎の成立機序解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) Sato らの初期絨毛初代培養の報告 (Blood 106: 428-435, 2005) に準じて、胎状奇胎の初代培養を行う。胎状奇胎は STR 多型診断を行い、雄核発生奇胎のみを発現解析などには用いる。培養開始 48 時間後に EVT 様細胞 (EVTs) を回収する。初代培養は、1 検体を二分し、通常酸素濃度条件下と低酸素濃度条件 (1% O₂) 下で並行して行う。回収した EVTs は、RNA 抽出・タンパク解析用として、液体窒素で急速凍結させた後に、-80 の冷凍庫で使用時まで保存する。また一部 EVTs は、コラーゲン I コートカルチャースライド上に接着させ細胞の純度検定のための免疫染色 (HLA-G) に供する。

(2) EVTs から RNA を抽出し、cDNA を個別遺伝子 (HLA-G, p57KIP2, hCG, HIF-1) の発現をリアルタイム PCR 法で検討する。培養前の絨毛と純化した EVTs 間で比較検討

する。また低酸素下培養と、通常の条件下で培養純化した EVTs 間で比較する。

(3) 純化した EVTs からゲノム DNA を抽出し、p57KIP2 領域の発現をコントロールしていると考えられる KvDMR 領域のメチル化を methylation-specific MLPA 法で評価した。

4. 研究成果

(1) 胎状奇胎の初代培養、EVTs の純化

本研究期間に 15 例の全胎状奇胎の初代培養を行い、EVTs を純化回収した。全症例とも雄核発生 1 精子受精奇胎であることを確認した。15 例の中で、侵入奇胎を発症した症例は 1 例だけであった。6 例では、通常酸素条件下での培養だけでなく、低酸素 (2% O₂) 下の培養を並行して行った。低酸素下の培養でも、通常培養条件と同じく、絨毛の初代培養は可能であり、EVT を純化することが可能であった。

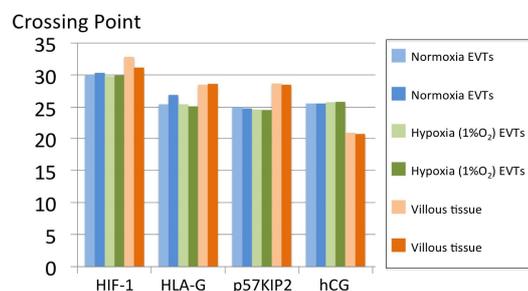
(2) 侵入奇胎特異遺伝子の抽出

15 例の EVTs から RNA を抽出し、HLA-G, p57KIP2, hCG, HIF-1 の発現をリアルタイム PCR 法で確認した。1 例の侵入奇胎例と、14 例の自然寛解例で、明らかな発現レベルの差は認めなかった。

(3) EVTs と絨毛の発現比較

低酸素 (2% O₂) と、通常酸素条件下で培養し、純化回収した EVTs、培養前の胎状奇胎絨毛において、HLA-G, p57KIP2, hCG, HIF-1 の発現を比較した。hCG は EVTs ・低酸素培養 EVTs にくらべて、絨毛で発現量が高かった。HLA-G および p57KIP2 は培養前の絨毛に比べて EVT ・低酸素培養 EVTs で発現が亢進していることが確認された。HLA-G および p57KIP2 の発現は低酸素負荷の有無により変わらなかった。また低酸素負荷により発現が亢進すると考えられる HIF-1 の発現についても検討したが、mRNA レベルでの変動は認めなかった (Fig.1)。

Fig. 1 Results of q-PCR



(4) p57KIP2 のインプリントコントロール領域のメチル化解析

インプリント遺伝子である p57KIP2 はインプリントコントロール領域である KvDMR のメチル化状態により、その発現が制御されていると考えられている。これまでに、われ

われは、雄核発生奇胎では KvDMR 領域は非メチル化ホモ状態になっていることを報告してきた。EVTs では p57KIP2 の発現が亢進していたため、EVTs における KvDMR 領域のメチル化状態を評価したところ、絨毛細胞と変わりなく、KvDMR 領域は非メチル化ホモ状態であった。このことは、EVTs における p57KIP2 が発現には、KvDMR 領域のメチル化ではなく、別の転写調節機構が存在することが推定された。

(5)研究のまとめ

年間 10 例の雄核発生奇胎の初代培養を行い、20% が侵入奇胎になる、およそ 6 例の侵入奇胎が発生すると見込んだが、この 3 年間で胞状奇胎手術を行い、本研究へリクルートされた症例は 15 例であり、侵入奇胎を発症した症例は 1 例だけであった。このため、侵入奇胎例と、自然寛解例の比較を十分に行うことができなかった。時間はかかるが、今後もリクルートを続け、マイクロアレイ解析を行い、当初の予定であった、侵入奇胎特異遺伝子の探索を行う予定である。

一方、低酸素下の培養で EVTs の初代培養は可能であること、HIF-1 の発現に変化は見られなかったことは新知見である。また、免疫染色レベルで捉えられていた、EVTs での HLA-G、p57KIP2 の発現増加、hCG の発現低下が mRNA レベルで確認された。

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 12 件)

Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, and Seki N Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma. International journal of oncology 査読あり 42:2013, 1523-1532, DOI: 10.3892/ijo.2013.1851

Uehara T, Kiyokawa T, Tate S, Usui H, and Shozu M Numerous psammoma bodies in cervical cytology of high-grade endocervical adenocarcinoma. Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology 査読あり:2013, DOI: 10.1111/cyt.12080

Mitsuhashi A, Uno T, Usui H, Nishikimi K, Yamamoto N, Watanabe M, Tate S, Hirashiki K, Kato K, Yamazawa K, and Shozu M Daily low-dose cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy in patients with uterine cervical cancer with emphasis on elderly patients: a phase 2 trial. International journal of gynecological

cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society 査読あり 23:2013, 1453-1458, DOI: 10.1097/IGC.0b013e3182559bda

碓井宏和 婦人科悪性腫瘍と妊孕能温存(その 2) 絨毛性疾患. 日本婦人科腫瘍学会雑誌 査読なし 31:2013, 1006-1011, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/NC11130410>

Kizaki S, Matsui H, Usui H, Shozu M, Hanawa S, Yamamoto E, and Kikkawa F Normal human chorionic gonadotropin regression curves in uneventful postmolar patients. J Reprod Med 査読あり 57:2012, 243-248, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22696820>

Kihara M, Usui H, Tanaka H, Inoue H, Matsui H, and Shozu M Complicating preeclampsia as a predictor of poor survival of the fetus in complete hydatidiform mole coexistent with twin fetus. J Reprod Med 査読あり 57:2012, 325-328, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22838249>

Furuya M, Okuda M, Usui H, Takenouchi T, Kami D, Nozawa A, Shozu M, Umezawa A, Takahashi T, and Aoki I Expression of angiotensin II receptor-like 1 in the placentas of pregnancy-induced hypertension. International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists 査読あり 31:2012, 227-235, DOI: 10.1097/PGP.0b013e31823b6e71

碓井宏和 腫瘍症例に学ぶ 非順調型の臨床経過を辿る絨毛性疾患 低単位 hCG の取扱いについて. 日本産科婦人科学会雑誌 査読なし 64:2012, N-290-N-294, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2012337635>

碓井宏和, 生水真紀夫 【婦人科がん-最新の研究動向-】 絨毛性疾患 胞状奇胎の管理方針. 日本臨床 査読あり 70:2012, 716-720, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2012258671>

Usui H, Kaku H, Kihara M, and Shozu M Molecular distinction of consecutive molar pregnancies. Obstet Gynecol 査読あり 117:2011, 492-495, DOI: 10.1097/AOG.0b013e318205636b

Kato K, Tate S, Uehara T, Usui H, Mitsuhashi A, and Shozu M The application of a newly developed linear stapler preloaded with tissue reinforcement for distal pancreatectomy in the management of ovarian cancer. European journal of

gynaecological oncology 査読あり 32:2011, 579-581,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053681>

碓井宏和, 中島名律子, 木原真紀, 加来博志, 生水真紀夫 【婦人科がん妊孕性・卵巣機能温存治療と妊娠・分娩】 胞状奇胎後の妊娠. 産婦人科の実際 査読あり 60:2011, 217-221,
<http://search.jamas.or.jp/link/ui/201116411>

〔学会発表〕(計 14 件)

Hirokazu Usui, Jia Qu, Makio Shozu Risk factors for gestational trophoblastic neoplasia development following androgenetic complete hydatidiform mole. 17th World Congress on Gestational Trophoblastic Diseases 2013 年 9 月 20 日 Chicago, USA

碓井宏和, 瞿佳, 山本憲子, 錦見恭子, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 雄核発生胞状奇胎からの続発症発生リスク因子の検討 第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2013 年 7 月 20 日 東京

碓井宏和, 瞿佳, 清川貴子, 山本憲子, 錦見恭子, 楯真一, 三橋暁, 中谷行雄, 生水真紀夫 胞状奇胎が疑われた絨毛の肉眼診断・組織診断と DNA 診断の比較検討 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013 年 5 月 12 日 札幌

碓井宏和 婦人科悪性腫瘍と妊孕能温存 その 2 絨毛性疾患 第 53 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2012 年 11 月 23 日 岡山

Hirokazu Usui, Jia Qu, Makio Shozu The polymorphism of folate metabolic enzyme genes may predict the outcome of methotrexate therapy for low-risk gestational trophoblastic neoplasia IFPA Meeting 2012 2012 年 9 月 19 日 Hiroshima, Japan

碓井宏和, 木原真紀, 山本憲子, 錦見恭子, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 絨毛性腫瘍に対する化学療法の卵巣機能への影響についての検討 第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2012 年 7 月 20 日 東京

碓井宏和 症例に学ぶ 非順調型の臨床経過を辿る絨毛性疾患 低単位 hCG の取扱いについて 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 14 日 神戸

碓井宏和, 木原真紀, 加来博志, 山本憲子, 錦見恭子, 加藤一喜, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 Low-risk gestational trophoblastic neoplasia に対する MTX 療法の効果・副作用と葉酸代謝酵素遺伝子多型の関連 絨毛性腫瘍の個別化医療を目指して 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 14 日 神戸

Hirokazu Usui, Maki Kihara, Hiroshi Kaku, Qu Jia, Hideo Matsui, Makio Shozu

MANAGEMENT AND OUTCOME OF WOMEN WITH GESTATIONAL TROPHOBLASTIC NEOPLASIA WITHOUT A CLINICALLY DETECTABLE TUMOR World Congress on Gestational Trophoblastic Diseases 2011 年 10 月 17 日 Budapest, Hungary

Hirokazu Usui, Jia Qu, Akira Mitsuhashi, Makio Shozu C677T polymorphisms of invasive mole predict the effect of methotrexate therapy 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日 名古屋

碓井宏和 FIGO 2000 system について 第 29 回 絨毛性疾患研究会 2011 年 9 月 30 日 東京

碓井宏和, 木原真紀, 加来博志, 錦見恭子, 山本憲子, 植原貴史, 加藤一喜, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 Quiescent GTD と考えられた 2 症例 第 29 回 絨毛性疾患研究会 2011 年 9 月 30 日 東京

碓井宏和, 生水真紀夫 雄核発生奇胎の推定に血清 hCG 値は有用か 第 12 回ホルモンと癌研究会 2011 年 7 月 15 日 東京

碓井宏和, 木原真紀, 加来博志, 錦見恭子, 山本憲子, 植原貴史, 加藤一喜, 楯真一, 三橋暁, 生水真紀夫 Quiescent gestational trophoblastic disease と考えられた 2 症例 第 121 回 関東連合産科婦人科学会学術集会 2011 年 6 月 12 日 東京

〔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.m.chiba-u.ac.jp/class/gyne/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

碓井 宏和 (USUI Hirokazu)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：90375634

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

生水 真紀夫 (SHOZU Makio)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30226302