

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861333

研究課題名(和文) 羊水塞栓症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 fetal-specific microRNAs as potential marker for amniotic fluid embolism

研究代表者

東島 愛 (HIGASHIJIMA, Ai)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：00549595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胎児特異的発現パターンを示すmicroRNAとして、14q32に存在するchromosome 14 microRNA cluster region (C14MC, 14個)およびXq28に存在するmiR-452が同定された。C19MCに存在するmicroRNAは胎盤でのみ高発現しているのに対して、C14MCのそれは胎盤および臍帯血・新生児血で高発現パターンを示していた。母体血漿中の胎児特異的microRNAsは、羊水塞栓症の分子マーカーである可能性がある。また、母体血漿中323-3pは、異所性妊娠の分子マーカーとして注目された。

研究成果の概要(英文)：Fifteen fetal blood cell-specific miRNAs were identified. Fourteen out of them located on chromosome 14 microRNA cluster region (C14MC; e.g. miR-370, miR-485, miR-432 etc), and remaining is miR-452 located on Xq-28. Micro RNAs on C14MC were highly expressed in cord blood cell, newborn blood cell and placental tissue, though microRNAs on C19MC were expressed only in placental tissue. By comprehensive analysis, microRNAs expressed highly in fetal blood cells than maternal blood cells were identified. Most of them located on C14MC region, and may be candidate molecular marker for amniotic fluid embolism. In addition, plasma concentrations of cell-free miR-323-3p could distinguish EP from SA yielding an area under the curve of 0.7454 (95% confidence interval: 0.5558-0.9349).

研究分野：産科婦人科学

キーワード：産婦人科 羊水塞栓症 microRNA 母体血漿 胎児 胎盤 C14MC

1. 研究開始当初の背景

羊水塞栓症は、予後不良な疾患であるにも関わらず、その発症予測は困難とされている。そこで、本疾患の発症前にそのリスクを非侵襲的に推定することが可能になれば、羊水塞栓症のリスクを考慮した周産期管理が可能になると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、胎児で高発現する micro RNA を同定することは、羊水塞栓などの分子機序解明に有用な情報をもたらすと期待される。そこで、母体血と比較して胎児血で高発現する microRNA を網羅的に同定し、それらの臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は長崎大学倫理委員会の承認と患者の同意を得て行われた。妊娠 37 週の母体血、臍帯動脈血、新生児血および胎盤組織を一組とした。それぞれの検体より RNA を抽出し、50bp 未満の RNA 断片を選択して cDNA ライブラリーを作成した。次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定し、それらをヒトゲノムデータベースにマップした。各検体でマップされたリード数を 100 万リードあたりのリード数 (read per million: RPM) に換算して、検体間の発現量を比較した。母体血で 100 リード未満かつ母体血に対して臍帯血あるいは新生児血で 10 倍以上の発現量を示すものを胎児特異的発現パターンとした。

ついで、胎児特異的 microRNAs の胎児評価への有用性を評価するために、母体血漿中胎児特異的 microRNAs 流入量を指標とした異所性妊娠 18 例 (異所性妊娠群) と自然流産 12 例 (流産群)・正常妊娠 26 例 (正常妊娠群) との鑑別における有用性を評価した。

4. 研究成果

胎児特異的 microRNA の同定: 胎児特異的発現パターンを示す microRNA として、14q32 に存在する chromosome 14 microRNA cluster region (C14MC, 14 個; miR-370, -485, -432 など) および Xq28 に存在する miR-452 が同定された。C19MC に存在する microRNA は胎盤でのみ高発現しているのに対して、C14MC のそれは胎盤および臍帯血・新生児血で高発現パターンを示していた。

表 1. 母体血漿中における胎児特異的 microRNA の候補リスト

microRNA	Chromosomal location	Maternal blood (RPM)	Umbilical artery (RPM)	Newborn blood (RPM)	Placenta (RPM)
hsa-miR-370	14q32	0.620686	8.54972	21.0378	3.8333
hsa-miR-452	Xq28	0.857138	16.3433	28.2058	552.785
hsa-miR-485-5p	14q32	0.147782	1.36679	3.584	1.49235
hsa-miR-432	14q32	1.24137	8.11351	27.0985	6.818
hsa-miR-136	14q32	0.738912	15.5291	12.5877	54.0173
hsa-miR-136*	14q32	2.68964	27.5685	43.0079	197.283
hsa-miR-433	14q32	0.561573	4.0713	7.95472	8.36887
hsa-miR-323-3p	14q32	0.91625	4.85648	12.7334	6.17424
hsa-miR-494	14q32	0.325121	3.69325	4.48728	3.54068
hsa-miR-409-3p	14q32	2.77831	11.5741	35.8691	4.85746
hsa-miR-431	14q32	1.56649	11.4287	19.7557	7.66659
hsa-miR-654-5p	14q32	1.12315	4.56567	13.6367	1.6094
hsa-miR-376a*	14q32	0.679799	3.51876	7.86731	10.1248
hsa-miR-379*	14q32	0.177339	1.22139	2.01053	0.64376
hsa-miR-377*	14q32	0.147782	0.901501	1.6026	1.3753

網羅的解析により、母体血と比較して胎児血で高発現する micro RNA が同定され、それらのほとんどが C14MC に存在することが明らかになった (表 1)。母体血漿中で胎児特異的 microRNA 流入量を定量することは、羊水塞栓症の病態を解明する手がかりになると期待された。

胎盤特異的 microRNA の臨床的意義: 母体血漿中 miR-517a 流入量により、area under the curve 0.9654 (95% confidence interval: 0.9172-1.0) の精度で異所性妊娠/自然流産と正常妊娠とを鑑別し得た (図 1)。

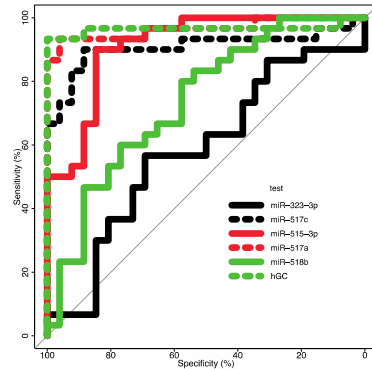


図 1. 母体血漿中胎盤特異的 microRNA(miR-517a) 流入量を用いた異所性妊娠と自然流産との鑑別精度

胎児特異的 microRNA の臨床的意義: 母体血漿中 miR-323-3p 流入量により、area under the curve 0.7454 (95% confidence interval: 0.5558-0.9349) の精度で異所性妊娠と自然流産とを鑑別し得た (図 2)。

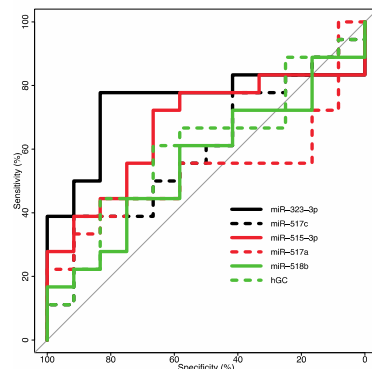


図 2. 母体血漿中胎児特異的 microRNA (miR-323-3p) 流入量を用いた異所性妊娠と自然流産との鑑別精度

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)

東島 愛、増崎英明

胎盤機能の評価 臨床婦人科産科 増刊

号 妊婦健診のすべて 69(4): 246-254,
2015 (査読無)

Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Fuchi N, Tsukamoto O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Masuzaki H. Circulating levels of pregnancy-associated, placenta-specific microRNAs in pregnant women with placental abruption. *Reproductive Sciences* (in press). pii: 1933719116653837(査読有)
Hasegawa Y, Miura K, Higashijima A, Abe S, Miura S, Yoshiura KI, Masuzaki H. Increased levels of cell-free miR-517a and decreased levels of cell-free miR-518b in maternal plasma samples from placenta previa pregnancies at 32 weeks gestation. *Reproductive Sciences*. 2015; 22: 1569-1576. doi: 10.1177/1933719115589407 (査読有)

Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Tsukamoto O, Hasegawa Y, Abe S, Naoki Fuchi N, Miura S, Kaneuchi M, Masuzaki H. Circulating levels of C19MC-cluster microRNAs in pregnant women with severe pre-eclampsia. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2015; 41: 1526-1532. doi: 10.1111/jog.12749 (査読有)

Miura K, Higashijima A, Mishima H, Miura S, Kitajima M, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Pregnancy-associated microRNAs in plasma as potential molecular markers of ectopic pregnancy. *Fertility and Sterility* 2015; 103: 1202-1208. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.041 (査読有)

Miura K, Higashijima A, Hasegawa Y, Abe S, Miura S, Fuchi N, Murakami Y, Kinoshita A, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Circulating levels of maternal plasma cell-free miR-21 are associated with maternal body mass index and neonatal birth weight. *Prenatal Diagnosis* 2015; 35: 509-511. doi: 10.1002/pd.4509(査読有)
Morisaki S, Miura K, Higashijima A, Abe S, Miura S, Hasegawa Y, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Effect of labor on plasma concentrations and postpartum clearance of cell-free, pregnancy-associated, placenta-specific microRNAs. *Prenatal Diagnosis*. 2015;35:44-50. doi: 10.1002/pd.4479 (査読有)

Miura K, Morisaki S, Abe S, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Tateishi S, Mishima H, Yoshiura K, Masuzaki H.

Circulating levels of maternal plasma cell-free pregnancy-associated placenta-specific microRNAs are associated with placental weight. *Placenta*. 2014; 35: 848-851. doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.002 (査読有)

Miura K, Hasegawa Y, Abe S, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Kinoshita A, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Clinical applications of analysis of plasma circulating complete hydatidiform mole pregnancy-associated miRNAs in gestational trophoblastic neoplasia: A preliminary investigation. *Placenta*. 2014; 35: 787-789. doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.004 (査読有)

Tsukamoto O, Miura K, Mishima H, Abe S, Kaneuchi M, Higashijima A, Miura S, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Identification of Endometrioid Endometrial Carcinoma-associated microRNAs in Tissue and Plasma. *Gynecologic Oncology* 2014;132:715-721. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.01.029 (査読有)

Miura K, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Yamasaki K, Abe S, Hasegawa Y, Kaneuchi M, Yoshida A, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn*. 2014;34:345-349. doi: 10.1002/pd.4307 (査読有)

[学会発表](計 8件)

The 19th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy (Marriott Marquis Washington) 12-15 July 2015
Pregnancy-associated microRNAs in plasma as potential molecular markers of ectopic pregnancy
Kiyonori Miura, Ai Higashijima, Yuri Hasegawa, Shoko Miura, Atsushi Yoshida, Masanori Kaneuchi, and Hideaki Masuzaki

第 67 回日本産婦人科学会学術講演会 (2015.4.9-12、パシフィコ横浜、横浜市)
異所性妊娠における母体血漿中胎盤特異的 microRNA 流入量の臨床的意義に関する検討

東島 愛、三浦清徳、長谷川ゆり、原田 亜由美、北島道夫、増崎英明

The 18th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy 2014.7.20-7.23 (Brisbane, Australia)
Miura K, Higashijima A, Hasegawa Y,

Miura S, Yoshiura KI, Masuzaki H. Microarray screening of amniotic fluid-specific genes in maternal plasma. 2014; 34 (Suppl. 1): 60. (Abstract: P-80)

第 59 回日本人類遺伝学会(タワーホール船堀、東京) 2014.11.19-22

森崎慎太郎、三浦清徳、東島 愛、阿部修平、三浦生子、長谷川ゆり、吉田 敦、金内優典、吉浦孝一郎、増崎英明

母体血漿中への妊娠関連胎盤特異的 microRNA の流入量および分娩後の消失速度と陣痛との関連について(304-1, 抄録集 303 頁)

第 59 回日本人類遺伝学会(タワーホール船堀、東京) 2014.11.19-22 東島愛、三浦清徳、三島博之、木下晃、塚本大空、阿部修平、長谷川ゆり、吉田 敦、吉浦孝一郎、増崎英明

母体血と比較して胎児血で高発現する micro RNA の同定(304-2, 抄録集 303 頁)

第 59 回日本人類遺伝学会(タワーホール船堀、東京) 2014.11.19-22 長谷川ゆり、三浦清徳、東島 愛、阿部修平、三浦生子、吉田 敦、金内優典、吉浦孝一郎、増崎英明

母体血漿中 miR-517a および miR518b は前置胎盤に対する帝王切開の出血量に関連する(304-3, 抄録集 303 頁)

第 59 回日本人類遺伝学会(タワーホール船堀、東京) 2014.11.19-22

淵 直樹、三浦清徳、東島 愛、長谷川ゆり、阿部修平、三浦生子、村上優子、三嶋博之、木下 晃、金内優典、吉浦孝一郎、増崎英明

母体血漿中 cell-free microRNA 流入量と母体の body mass index および新生児出生体重との関連(304-4, 抄録集 304 頁)

第 59 回日本人類遺伝学会(タワーホール船堀、東京) 2014.11.19-22

村上優子、三浦清徳、東島 愛、長谷川ゆり、阿部修平、三浦生子、三嶋博之、

木下 晃、金内優典、吉浦孝一郎、増崎英明

双胎間輸血症候群発症予測における母体血漿中胎盤特異的 cell-free mRNA の有用性に関する検討(304-5, 抄録集 304 頁)

〔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

東島 愛 (HIGASHIJIMA, Ai)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：00549595