

令和元年5月28日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2018

課題番号：26870624

研究課題名(和文)母体血中RNAを用いたHLA遺伝子の動態解析～胎児バイオマーカー開発への展開

研究課題名(英文)Analysis of HLA-related RNA in maternal blood as a fetal biomarker to assess perinatal complications

研究代表者

林 昌子(Hayashi, Masako)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：80421171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤には、免疫応答に関わる古典的クラスIのHLAが存在せず、代わりにHLA-G、E、Fが存在するとされる。そこで、本研究では妊娠関連疾患とHLA-G、HLA-E、HLA-Fの関連を調べた。その結果、HLA-EとFに関しては今回調査した病態との関連性が見いだせなかったが、HLA-Gでは、癒着胎盤がある症例で無い症例と比較してHLA-G陽性細胞の割合が高く、癒着胎盤にHLA-Gが関与すると推定された。そこで母体血のHLA-G関連mRNA断片の検出を試みたが、検討に必要な濃度のmRNAを抽出することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癒着胎盤は、発症すると分娩後異常出血を引き起こし、母体の生命を脅かす病態であるが、分娩前に確実に診断する方法はまだ無い。今回の研究では、癒着胎盤の胎盤においてHLA-Gの細胞が多いことが確認された。HLA-Gは胎盤以外の組織ではほとんどみられないため、母体血などを用いて胎盤のHLA-Gの増加を検出できる方法が確立されれば、分娩前に癒着胎盤のリスクを推定することが可能となり得る。今回の研究で試みたものの困難ではあったが、今後HLA-G関連RNAの定量や、その他の方法を用いて、胎盤HLA-Gの定量が可能となれば、癒着胎盤のリスク推定につながられるのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：In the human placenta, it has been previously reported that there is no classical class I HLA on the human placenta, and there is HLA-G, E, and F instead of classical class I HLA. In this study, we studied the association between pregnancy related complications and HLA-G, HLA-E and HLA-F. As a result, although the relationship between pregnancy complications and HLA-E or HLA-F was not found, the percentage of HLA-G positive cells was higher in the cases of placenta accreta compared with the cases without placenta accreta. The result suggested that HLA-G may contribute to develop placenta accreta. Furthermore, we tried to detect maternal blood HLA-G-related mRNA fragments, but it was not possible to extract mRNA at the concentration required.

研究分野：産婦人科学一般、周産期学、婦人科腫瘍

キーワード：妊娠 周産期 ヒト白血球抗原 HLA-E HLA-F HLA-G 妊娠合併症 癒着胎盤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群、絨毛膜羊膜炎、妊娠糖尿病、子宮内胎児発育不全などは胎盤で免疫応答反応が起こる疾患である。これらの疾患は母児に重大な影響を及ぼす疾患だが、予知や早期発見が困難で、病態が進行してから発見されるものや、正確な診断には危険性の高い胎児採血などの診断が必要な病態も存在する。母体採血によりこれらの病態を早期診断できればこれは非常に有用な方法となる。

胎盤には、免疫応答に関連する HLA のうち、古典的クラス I の HLA が発現せず、代わりに HLA-G、HLA-E、HLA-F が発現すると言われている。免疫応答反応が起こるといわれている妊娠高血圧症候群、絨毛膜羊膜炎、妊娠糖尿病、子宮内胎児発育不全などの疾患では HLA-G,E,F の発現が変化している可能性があると考えられる。一方で、母体血漿には自身由来の DNA、RNA 断片のほかに胎盤由来の DNA、RNA 断片が出現する事が知られている。

### 2. 研究の目的

MHC 分子は細胞表面に存在する細胞膜貫通型糖タンパク分子であり、細胞内のさまざまなタンパク質の断片(ペプチド)を細胞表面に提示する。ヒトの MHC は HLA である。HLA は免疫反応に関連し、また炎症や感染の際も免疫反応をおこすとされるが、胎盤には古典的 HLA クラス I が存在せず、HLA-E、HLA-F、HLA-G が存在するとされる。

そこで、本研究は、以下の(1)~(3)のごとく、HLA-G、HLA-E、HLA-F と周産期合併症との関連を調べることを目的とした。

#### (1) 周産期合併症と胎盤 HLA-E HLA-G HLA-F の発現の関連についての検討

妊娠中の様々な病態と胎盤の HLA E,F,G の発現についての関連について検討する。

#### (2) 癒着胎盤と癒着胎盤の無い症例での胎盤組織中の HLA-G 発現細胞割合の比較

臨床的に癒着胎盤が確認された症例と、癒着胎盤をはじめ胎盤関連疾患の無い症例を比較し、癒着胎盤有無と HLA-G の発現に相関が認められるかどうかを検討する。

#### (3) 癒着胎盤と HLA-G 関連母体血中 RNA との関連についての検討

(1)(2)の検討の結果、癒着胎盤において HLA-G 陽性細胞の割合が高いことが予測されたため、母体血中における HLA-G 産生に関わる RNA 断片を定量し、癒着胎盤との関連を調べる

### 3. 研究の方法

#### (1) 周産期合併症と胎盤 HLA-E HLA-G HLA-F の発現の関連についての検討

本研究は日本医科大学倫理委員会の承認を受けて実施した。当院では病理組織検査に提出した胎盤検体をホルマリン固定の上、パラフィン包埋にて保存している。2011年~2016年に当院で分娩し、胎盤を病理組織検査に提出した症例より、以下の対象疾患症例のうち年次の新しい順に各3症例を抽出し、検討に用いた。対象疾患は正常妊娠、微弱陣痛、臨床的絨毛膜羊膜炎、早産、常位胎盤早期剥離、前置胎盤、前置癒着胎盤とした。胎盤は娩出後速やかに余分な血餅などを丁寧に取り除き、水分を十分に拭いた後、10%(v/v)ホルマリン水溶液に浸漬した。常温で24時間~48時間の浸漬の後、胎盤の臍帯付着部付近、胎盤辺縁と臍帯付着部との中間付近の任意の部位、臍帯の中間部付近、卵膜、その他所見のある任意の部位、についてパラフィン包埋した組織を作成し、この組織のブロックを、滑走式ミトクロームにて4μmで細切して免疫組織化学染色に用いた。HLA-G抗体はAnti-HLA G antibody [4H84] ab52455, (abcam, Tokyo, Japan)、HLA-F抗体はAnti-HLA F antibody [EPR6803] ab126624, (abcam, Tokyo, Japan)、HLA-E抗体はAnti-HLA E antibody HPA031454, (Atlas Antibodies AB, Stockholm, Sweden)を用いた。評価は×4~40の対物レンズの光学顕微鏡で行い、臍帯、卵膜、胎盤について観察した。他の疾患の症例と比較して特異な染色部位や染色された細胞の割合の差がある部位を検索し、特徴的な部位がある場合はその部位、無い場合は胎盤の母体面から絨毛部分にかけて写真に記録した。

#### (2) 癒着胎盤と癒着胎盤の無い症例での胎盤組織中の HLA-G 発現細胞割合の比較

対象症例は2006年から2018年まで臨床的に癒着胎盤と診断された症例を癒着胎盤群、2016年から2018年までの胎盤関連合併症の無い症例を対照群とした。この研究では用手剥離を行ったが強固な癒着のために完全剥離ができなかったものを臨床的に診断された癒着胎盤とした。対照群からは、妊娠高血圧症候群、胎児異常、胎児発育不全、胎盤早期剥離、絨毛膜羊膜炎、および子宮内胎児死亡を除外した。対象症例の胎盤からパラフィン包埋の検体を作成し、その検体を薄切してヘマトキシリン&エオジン染色と抗ヒト HLA-G 抗体 Anti-HLA G antibody [4H84] ab52455, (abcam, Tokyo)を用いた免疫組織化学染色を行った。胎盤から収集された全ての部分について、HLA-G 蛋白の発現を評価した。2人の検者が40xの光学顕微鏡で同時に評価し、最も HLA-G 陽性割合の高い部位を決定し、写真撮影した。これらの撮影部分を、2名の検者により別々に、HLA-G 陽性領域の割合について HLA-G proportion score 1(0-20%)、2(21-40%)

3 (41-60%)、4 (61-80%)、および5 (81~100%)として評価した。2人の試験官が評価したスコアの平均値を分析に用いた。さらに、HLA-G タンパク質が発現している部位を観察するために、同じ部位のH&E染色のサンプルも調べた。統計解析はSPSS 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)およびExcel spreadsheet (Microsoft, Redmond, WA, USA)を用いて行った。連続変数についてはMann-Whitney U検定を、カテゴリ変数についてはカイ二乗検定を使用した。P<0.05を統計的に有意と見なした。

### (3) 癒着胎盤とHLA-G関連母体血中RNAとの関連についての検討

予定帝王切開による分娩4週間以内の母体2名と、生殖可能年齢の非妊娠女性2名よりEDTA入りスピッツで7mlx2本を採血、氷上保存して30分以内にRNA抽出を行った。RNA抽出はmirVana™ PARIS™ Kit (AM1556), Life Technologies Japan, Tokyo, Japanを用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 周産期合併症と胎盤HLA-E HLA-G HLA-Fの発現の関連についての検討

正常妊娠、微弱陣痛、臨床的絨毛膜用膜炎、早産、常位胎盤早期剥離、前置胎盤、前置癒着胎盤の各病態の検体について、HLA-E, HLA-F, HLA-G抗体を用いた免疫組織化学染色を行った結果、臍帯と卵膜については病態による差は認められなかった。胎盤については、HLA-E抗体とHLA-F抗体で病態による差が認められなかったが、HLA-G抗体による免疫組織化学染色の結果、癒着胎盤で免疫染色される細胞の割合が高いように観察された(図1-A, 1-C)。

### (2) 癒着胎盤と癒着胎盤の無い症例(対照症例)での胎盤組織中のHLA-G発現細胞割合の比較

研究期間中に癒着胎盤群として8例、対象症例として14例の症例が集められた。対照群には、微弱陣痛6例、胎児機能不全(明らかな胎盤の異常が無いもの)3例、既往帝王切開の陣痛発来または破水2例、母体の卵巣嚢腫茎捻転1例、および分娩進行中の母体意識喪失(ヒステリー)の1例が含まれていた。症例の背景を表1に示す。生殖補助医療(ART)で妊娠した割合は、癒着胎盤群で高かったが、他の背景は癒着胎盤群と対照群で差はなかった。両群間で分娩時週数、児の出生体重、および帝王切開率にも差は認められなかった。当然のことながら、総出血量と輸血率は癒着胎盤群で有意に高かった。免疫組織化学的染色により、HLA-G陽性細胞は細胞質および膜が染色されていた。HLA-Gは癒着胎盤群(図1-A, B)と対照群(図1-C, D)の両方で発現しており、HLA-G陽性細胞の割合が最も高い部分は主に胎盤のbasal plateと胎盤中隔から構成されていた。癒着胎盤では、最もHLA-G陽性細胞の割合が高い部位では、basal plateは蛇行し複雑な形状をしているように観察された。抗HLA-G抗体によって染色された主な細胞は、その形態から絨毛外栄養膜細胞であると考えられた。HLA-G proportion scoreは、癒着胎盤群の方が対照群の場合よりも有意に高かった[median (range): 3.25 (2.5 - 4.5) 対 2.0 (1 - 3.5), p <0.01] (図2)。

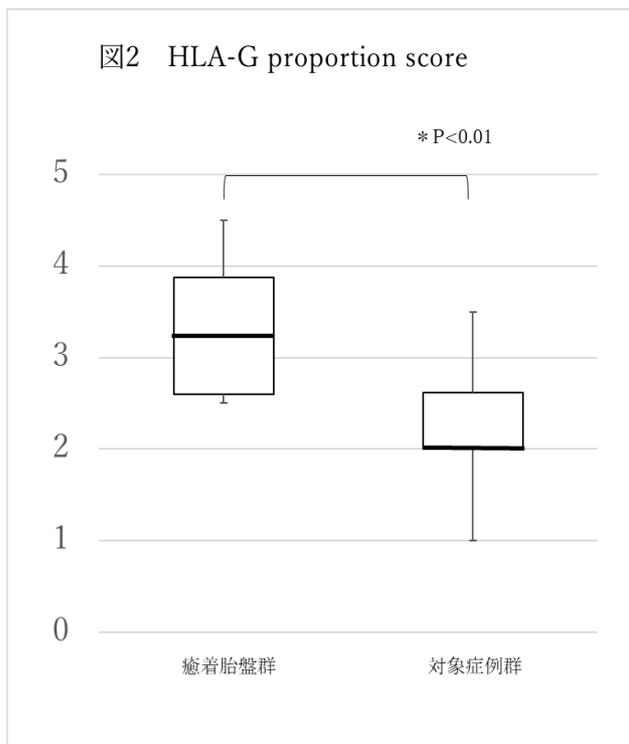
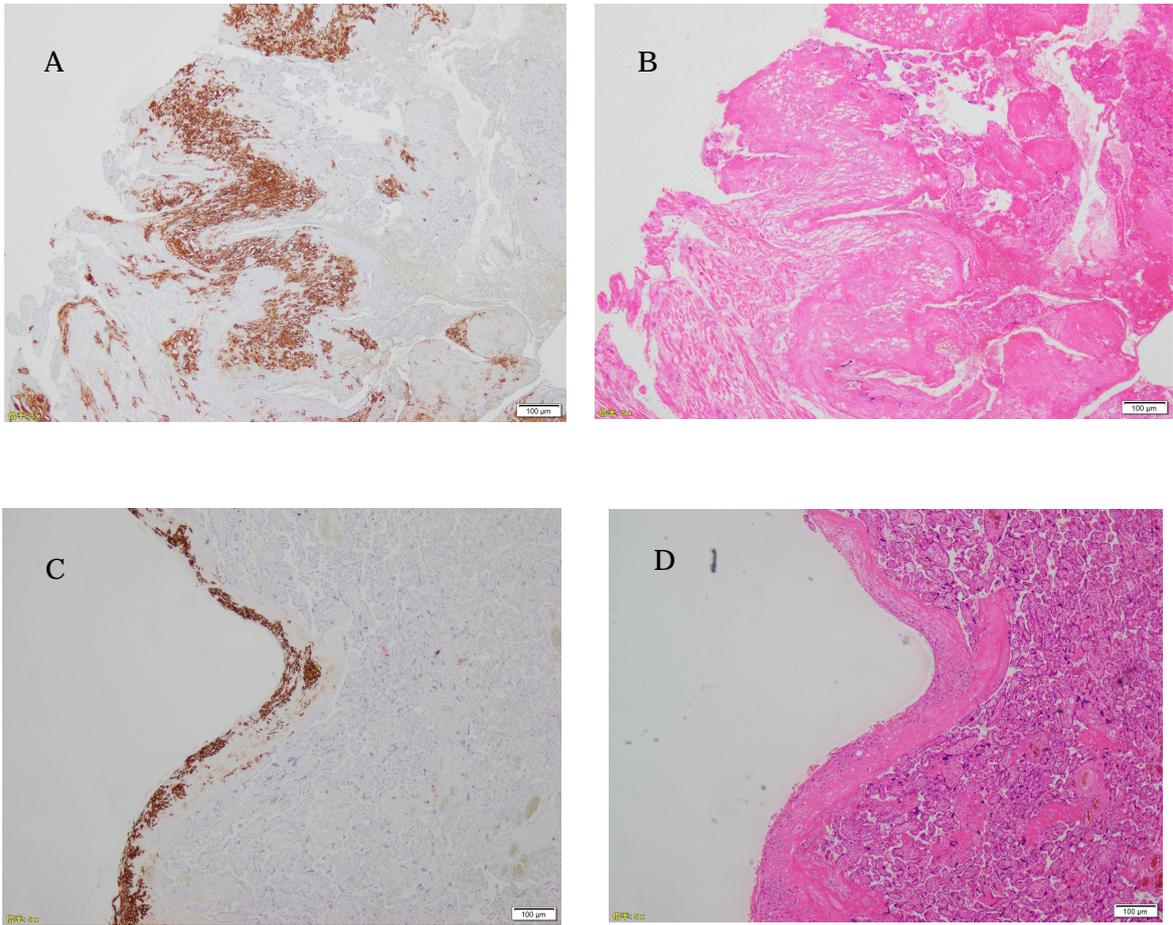
表1 対象症例の背景と周産期転帰

	癒着胎盤群 n=8	対照症例群 n=14	p
<b>背景</b>			
母体年齢 (y)	37 (30 - 41)	31 (21 - 41)	0.15
初産	5 (62.5)	11 (78.6)	0.41
経産	3 (37.5)	3 (21.4)	
既往帝王切開回数	0 (0-1)	0 (0-2)	0.27
ARTによる妊娠	3 (37.5)	0 (0)	0.04
<b>周産期転帰</b>			
分娩時妊娠週数 (w)	38.7 (37.1 - 41.3)	39.9 (34.6 - 41.7)	0.13
<b>分娩様式</b>			
経膈分娩	2 (25.0)	2 (14.2)	0.53
帝王切開分娩	6 (75.0)	12 (85.8)	
出生体重	3022 (2120 - 3610)	2865 (1945 - 3695)	0.37
分娩時出血量(ml)	2877 (2550 - 7500)	725 (112-1920)	<0.01
輸血症例数	8 (100)	0 (0)	<0.01

数値は n (%) または median (range)

\*ART=assisted reproductive technology

图 1



(3) 癒着胎盤と HLA-G 関連母体血中 RNA との関連についての検討

本検討では血清中の RNA 断片を採取するために検体を採取し検討したが、分光光度計で検出できる濃度での RNA 抽出ができなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件 (2 件準備中))

- 1 . HLA-G and placenta accreta. Masako Hayashi ら: 投稿中
- 2 . Incidence of and risk factors for placenta accreta in pregnancies conceived by assisted reproductive technology. Masako Hayashi ら: 投稿中

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名 : 片山 博徳、 細根 勝

ローマ字氏名 : Hironori Katayama, Masaru Hosone

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。