

東島 愛 論文内容の要旨

主 論 文

Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy

胎児発育不全と関連する胎盤特異的 microRNA に関する研究

東島 愛、三浦清徳、三島博之、木下晃、城 大空、阿部修平、長谷川ゆり
三浦生子、山崎健太郎、吉田 敦、吉浦孝一郎、増崎英明

Prenatal Diagnosis (in press)
2013 年掲載予定

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：増崎 英明 教授)

緒 言

胎児発育不全 (FGR : fetal growth restriction) とは、妊娠週数および性別に応じた胎児の推定体重が基準値の 10 パーセント未満と定義され、子宮内胎児死亡など周産期合併症の危険性が高い病態である。FGR の発症原因として、妊娠高血圧腎症や妊娠糖尿病などの母体要因、あるいは胎児染色体異常などの胎児要因が知られているが、約 70% の FGR は原因不明である。その背景には、母体-胎児間の相互連絡機序に影響を及ぼす子宮-胎盤の機能不全の存在が示唆されているが、その分子メカニズムは未だ解明されていない。

microRNA(miRNA) は 21-25 塩基の RNA 分子であり、特定の遺伝子に相補結合することで発現を抑制する機能を有している。胎盤特異的に発現する miRNA の存在が知られており、それらは胎盤の発生・発育や妊娠の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。以前、私どもはマイクロアレイ解析により母体血漿中に流入する妊娠に関連した胎盤特異的 miRNA の存在を報告したが、それらは母体-胎児間の相互連絡機序に関与している可能性がある。一方、FGR の胎盤や母体血漿中における miRNA に関する知見は少なく、FGR に関連した胎盤特異的 miRNA の同定は FGR の分子メカニズムを解明する手がかりになることが期待される。

マイクロアレイ解析は網羅的スクリーニング法の一つであるが、スライド上にプロットされた既知の miRNA 以外は検出し得ないため、全ゲノムの情報を反映していない。一方、次世代高速シーケンス法は、35 塩基未満に断片化された全ての RNA 分子を一度に解析するという利点があり、21-25 塩基の miRNA に関する網羅的解析には本法の方が適していると考えられる。

本研究では、FGR の分子メカニズム解明の手がかりを得るため、FGR と関連する胎盤特異的 miRNA の特性について解析を加える。まず、次世代高速シーケンス法を用いてすべての胎盤特異的 miRNA を同定した。次いで、FGR の胎盤組織に限定して特異的である miRNA を同定した。さらに、そのうち母体血漿中に流入する妊娠に関連した FGR 胎盤特異的 miRNA を同定した。最後に、母体血漿中における FGR 胎盤特異的 miRNA の流入量について検討した。

対象と方法

本研究は、倫理委員会の承認と患者の同意を得て行われた。

- ① 胎盤特異的 miRNA (placenta-specific miRNA) の同定：妊娠末期における正常妊娠の胎盤組織、母体血および臍帯血を一組とし、計 2 組を採取した。次世代高速シーケンス法を用いて、母体血および臍帯血と比較して胎盤で特異的に発現している miRNA を placenta-specific miRNA として上位 10 個を同定した。
- ② FGR の胎盤組織に特異的な miRNA (FGR placenta-specific miRNA) の同定：次いで、定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて、10 個の placenta-specific miRNA のうち、正常妊娠の胎盤 (n=50) と比較して FGR の胎盤 (n=45) における発現量が有意に低いものを FGR placenta-specific miRNA として同定した。
- ③ 母体血漿中に流入する FGR 胎盤特異的 miRNA (FGR pregnancy-associated, placenta-specific miRNAs) の同定：分娩前後の母体血漿中における FGR placenta-specific miRNA 流入量を定量解析し、分娩後に流入量が有意に減少するものを FGR pregnancy-associated, placenta-specific miRNAs として同定した。
- ④ FGR 胎盤特異的 miRNA の母体血漿中への流入量に関する検討：最後に、FGR 例 (n=10) および正常妊娠例 (n=10) それぞれの母体血漿中における FGR placenta-specific microRNA の流入量を比較した。

結 果

10 個の placenta-specific miRNAs (has-miR-518b, has-miR-1323, has-miR-516b, has-miR-516a-5p, has-miR-525-5p, has-miR-515-5p, has-miR-520h, has-miR-520a-5p, has-miR-519d and has-miR-526b) が同定され、それらは全て 19q13.42 領域にクラスターを形成して存在していた (chromosome 19 miRNA cluster : C19MC)。そのうち、7 個 (has-miR-518b, has-miR-1323, has-miR-516b, has-miR-515-5p, has-miR-520h, has-miR-519d, has-miR-526b) が FGR placenta-specific microRNA として同定された (Mann-Whitney-U test, それぞれの P 値 <0.001 , <0.001 , 0.049 , 0.036 , <0.001 , <0.001 , および 0.003)。そして、正常胎盤組織と比較して FGR の胎盤組織において最も有意に発現量が低下していた 4 個の FGR placenta-specific microRNA (has-miR-518b, has-miR-1323, has-miR-520h and has-miR-519d) について、分娩前後の母体血漿中への流入量を検討し、いずれも FGR pregnancy-associated, placenta-specific miRNAs であることが確認された (Wilcoxon signed-rank tests, P 値 0.005)。しかし、母体血漿中に流入している FGR pregnancy-associated, placenta-specific miRNAs 量については、FGR 群と正常妊娠群に有意差は認められなかった (Mann-Whitney's U test, P 値 >0.05)。

考 察

次世代高速シーケンシング法による全ゲノムを対象としたスクリーニングで同定された placenta-specific microRNAs はすべて C19MC 領域に存在していた。C19MC 領域の miRNA は父性発現するゲノム刷り込み遺伝子であることが報告されており、胎盤および胎児の発育に重要な働きをしていると考えられる。したがって、C19MC 領域の FGR placenta-specific microRNA の発現低下が、FGR の病態形成に関連していることが示唆された。一方で、FGR は新生児期のみならず、冠動脈疾患や 2 型糖尿病、高脂血症などの生活習慣病の発症リスクにも関与していることが報告されている。出生時の胎盤における FGR placenta-specific microRNA の発現解析が、将来の生活習慣病の発症リスクの推定に役立つかもしれない。

また、本研究により正常妊娠と比較して FGR の胎盤において発現量が低下している placenta-specific miRNA の存在が明らかになったが、一方で正常妊娠と FGR とにおける母体血漿中の FGR pregnancy-associated, placenta-specific miRNAs 流入量に有意差は認められなかった。今後の研究で、胎盤組織と母体血漿中とにおける FGR placenta-specific microRNA の発現量に関する矛盾を解明することは、FGR の母体血漿中へ placenta-specific miRNA が流入するメカニズムを解明する手がかりになることが期待される。