

論文内容の要旨

Expression level of long noncoding RNA H19 of normotensive placentas in late pregnancy relates to the fetal growth restriction.

妊娠後期における正常血圧妊婦の胎盤中の Long noncoding RNA H19 発現量は胎児発育不全に関連している

日本医科大学大学院 医学研究科 女性生殖発達病態学分野

大学院生 角田 陽平

The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research 掲載予定

【背景と目的】

胎児発育不全 (Fetal growth restriction、以下 FGR) は新生児死亡や新生児合併症のリスクを上昇させると言われているが、その多くの病因は不明である。Long noncoding RNA H19 (H19) は胎盤絨毛に豊富に発現している遺伝子で、過去の報告では H19 が FGR 発症に関与している可能性が示唆されている。しかし、FGR 胎盤における H19 の機能はいまだに不明である。本研究では妊娠 34 週以降の妊娠合併症のない胎盤で、H19 発現と FGR の関連性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

日本医科大学付属病院で 2014 年から 2017 年の妊娠 34 週から 41 週の単胎妊婦から得られたホルマリン固定後の胎盤を集積した。日本小児科学会の在胎期間別出生時体格標準値を参考に出生体重が 10%タイル未満であった児から得た胎盤を Small for gestational age (SGA) 胎盤とし、10%タイルから 90%タイル未満の出生体重児から得た胎盤は Appropriate for gestational age (AGA) 胎盤とした。本研究は、妊娠高血圧腎症、高血圧合併妊娠、癒着胎盤、妊娠糖尿病、糖尿病合併妊娠、子宮内感染、新生児奇形、児の染色体異常を認めない SGA 胎盤 14 例と AGA 胎盤 18 例を用いた。胎盤組織の病理学的特徴を評価するために、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色、マッソントリクローム染色、P63 と CD34 の免疫染色を行った。また、In situ hybridization (ISH) 法を用いて胎盤組織における H19 の局在を観察した。染色スライド標本はバーチャルスライドスキャナ Leica SCN 400 でスキャン (倍率 200 倍) して得られた TIFF 画像を病理学的分析に使用した。分析には画像解析ソフトウェアの QuPath version 0.2.0 と Image J version 1.52 を使用した。絨毛内血管と末端絨毛の評価は、胎盤梗塞や絨毛間フィブリン沈着している部位を避けて、倍率 200 倍で無作為に 5 視野選択した。径 80 μ m 以下の絨毛を末端絨毛と定義し、1 視野の末端絨毛数をカウントした。絨毛内血管数は CD34 の免疫染色を参考に H&E 染色スライドにおいて末端絨毛内の赤血球を含む血管数をカウントした。絨毛間質内の線維化の評価には、マッソントリクローム染色を施行し、1 スライドにおいて 1 mm 四方の region of interest (ROI) をランダムに 10 視野設定し、ROI 内の青染されたコラーゲン成分の比率を測定して線維化を評価した。細胞性栄養膜細胞に特異的に発現する P63 の免疫染色を行い、1 スライドにおいて同様に ROI を 10 視野選択し P63 陽性細胞の比率を評価した。胎盤組織のホルマリン固定組織から total RNA を抽出し reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) 法を用いて H19 の発現量と H19 との関連が知られている insulin-like growth factor 2 (IGF2) と decorin (DCN) の発現量も解析した。本研究は日本医科大学付属病院倫理委員会にて承認を得た (30-06-943、2018 年 6 月 20 日承認)。

【結果】

SGA 胎盤は 14 例、AGA 胎盤は 18 例得られた。妊娠中の喫煙者は見られなかった。ま

た、いずれの SGA 例で臍帯動脈拡張期血流異常や羊水過少症は認めなかった。年齢、経産、妊娠初期の BMI、生殖補助医療技術による妊娠、分娩週数、胎盤重量では SGA と AGA の間に有意な違いは見られなかった。出生時体重は SGA で有意に低値を示した ($P=0.002$)。H&E 染色、マッソントリクローム染色、免疫染色による病理学的分析の結果、末端絨毛数、末端絨毛内血管数、絨毛間質の線維化、細胞性栄養膜細胞の比率において、SGA と AGA の間に有意な差は認められなかった。ISH 法により H19 の発現は絨毛間質と血管内皮細胞、細胞性栄養膜細胞の核と細胞質に局在を認めた。一方で、合胞体栄養膜細胞は H19 の局在は認められなかった。RT-qPCR の結果から、H19 発現が AGA 胎盤より SGA 胎盤において有意に減少していた ($P=0.002$)。また、IGF2 も SGA 胎盤において有意に発現が減少していた ($P=0.037$)。一方で DCN 発現は有意ではなかったものの、SGA 胎盤において減少している傾向が見られた ($P=0.099$)。

【結論】

本研究で、病理学的異常や合併症のない妊娠後期の SGA 胎盤において H19 発現が減少していることを見出し、H19 が妊娠後期における胎児発育の制御や FGR の発症に関連している可能性を示唆した。