

氏名	よしかわ けんいち 吉川 賢一		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1933 号		
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 17 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Diagnostic predictability of miR-4535 and miR-1915-5p expression in amniotic fluid for foetal morbidity of infection (羊水中 miR-4535 及び miR-1915-5p の発現解析は胎児感染を予測する検査となりうる)		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	高田 徹
	(副 査) 福岡大学	教授	廣松 賢治
	福岡大学	講師	中村 信之

内 容 の 要 旨

【目的】

本邦の早産率は約 6%です。早産の原因の一つは、子宮内感染による絨毛膜羊膜炎が大半の割合を占めています。絨毛膜羊膜炎は、現状では有用な診断方法が開発されていないため、抗菌剤治療の選択の有無あるいはその時期及び胎児娩出の時期を判断することに難渋する難治性疾患の一つとなっています。

絨毛膜羊膜炎は、妊娠中の子宮内感染により胎児由来の卵膜に炎症が波及する周産期特有の疾患です。妊娠中に一部の腔内細菌が子宮内や羊水に上行感染して、羊水の中の炎症が胎児に波及します。すなわち、絨毛膜羊膜炎になると、胎児はインターロイキン (IL) -6 を含む多くの炎症性サイトカインにさらされ、急速に胎児炎症反応症候群 (FIRS : Fetal inflammatory response syndrome) と呼ばれるサイトカインストームを発症します。FIRS が発症すると、二次的に新生児敗血症、新生児呼吸窮迫症候群を含む肺障害、肺炎、脳室内出血、脳室周囲白質軟化症、脳性麻痺、壊死性腸炎といった致死性の疾患の罹患率が上昇します。したがって、分娩前に FIRS の発症を予測することは非常に重要で、そのため FIRS を発症させる絨毛膜羊膜炎を早期に発見・診断する検査法の

開発が診療の現場では切望されています。

現在のところ、絨毛膜羊膜炎は、①母体の体温の上昇、②母体の白血球数増多、③母体の血清 CRP 値の上昇、④子宮の収縮亢進といった臨床的に基本となる症候や検査所見で診断されています。しかし、これらの絨毛膜羊膜炎の診断基準を満たした場合には、既に胎児感染をきたしていることがほとんどです。さらに、絨毛膜羊膜炎の確定診断は、分娩後に娩出された胎盤の病理組織を用いて診断します。そのため、妊娠中に絨毛膜羊膜炎を診断することは不可能ですので、絨毛膜羊膜炎を高い確率で予測診断する検査法の開発が課題となっています。

私たちは、これまでに羊水中のマイクロ RNA に対するアレイ解析を行って、miR-4535 および miR-1915-5p が重度の絨毛羊膜炎の有用なバイオマーカーであることを報告してきました。そこで、本研究では絨毛膜羊膜炎と関連の深い羊水中の miR-4535 値、miR-1915-5p 値、IL-6 値、16SrDNA コピー数と胎児感染との関係进行评估することで、羊水中の検査項目で胎児感染の予測診断の可能性について検討しました。

【対象と方法】

本研究で用いた羊水試料は、2009 年から 2019 年にかけて福岡大学病院（18 例）と国立病院機構佐賀病院（39 例）で、前期破水または切迫早産の診断で入院管理を要した 57 例の日本人妊婦から収集しました。すべての羊水穿刺は、無菌的に経腹超音波断層法下で経皮的に施行しました。

絨毛膜羊膜炎は、Blanc 分類に基づいて炎症性細胞の浸潤の程度で病理組織学的に診断されます。Blanc 分類では、炎症性細胞の浸潤が絨毛膜下にとどまっているものを Stage I、絨毛膜にまで波及しているものを Stage II、羊膜にまで波及しているものを Stage III と分類します。Blanc 分類 Stage I をグループ I、Stage II をグループ II、Stage III をグループ III と本文中では記載しています。

新生児の末梢血は出生直後に採取しました。出生時の血液検査で $WBC < 5,000 / \mu L$ または $WBC > 20,000 / \mu L$ 、 $CRP > 0.5 \text{ mg/mL}$ 、 $IgM > 20 \text{ mg/mL}$ の所見を示した場合には、新生児感染疑いと定義しました。さらに、新生児への抗菌薬の投与が出生直後より 5 日間以上必要であった場合を新生児感染症と定義しました。miR-4535 および miR-1915-5p の発現解析は、TaqMan®miRNA アッセイを使用してドロップレットデジタル PCR (ddPCR) を

用いて miRNA の発現量を定量しました。細菌量の指標である 16S rDNA コピー数の定量には、ユニバーサルプライマー (27Fmod 及び 338R) を使用し、EvaGreen を用いた ddPCR で定量を行いました。さらに、IL-6 の定量は ELISA 法を用いて行いました。

統計はマンホイットニーU 検定、カイ二乗検定を使用しました。ROC 曲線を作成し、AUC と Youden インデックスを求め、フィッシャーの正確確率検定を使用しました。p-値は <0.05 を統計学的に有意とし、統計ソフトは Windows ベースのシステムの GraphPad Prism v8.0 および SPSS v16.0 を使用しました。

【結果】

羊水中の miR-4535 値、miR-1915-5p 値、16S rDNA コピー数、IL-6 値は、Blanc 分類の Stage I 及び Stage II の症例に比較し、重症の絨毛膜羊膜炎 (Stage III) 症例では、有意に高値を示しました。また、羊水中の miR-4535 値、miR-1915-5p 値、IL-6 値は羊水中の 16S rDNA コピー数と有意に関連していました。

羊水中の miR-4535 値と miR-1915-5p 値は、新生児感染疑いを示唆する全ての指標 (出生時における新生児の血液検査で $WBC < 5,000 / \mu L$ もしくは $WBC > 20,000 / \mu L$ 、 $CRP > 0.5 \text{ mg/mL}$ 、 $IgM > 20 \text{ mg/mL}$) と有意に関連を認めました。16S rDNA コピー数は、白血球数との関連を認めませんでした。IL-6 値は、白血球数と IgM 値との関連を認めませんでした。

出生後に新生児感染症のため、長期間の医療介入 (新生児への 5 日間以上の抗菌薬投与) が必要であった症例において、羊水中の miR-4535 値と miR-1915-5p 値は、医療介入の無かった新生児感染の無かった症例に比較して、有意に高値を示しました。

新生児感染の罹患率予測において、ROC 曲線を作製しました。ROC 曲線から、miR-4535 値および miR-1915-5p 値の AUC 値はそれぞれ 0.737、0.673 と中等度、低度の有意な予測能を示しました。一方、16S rDNA コピー数、IL-6 値は、有意な予測能を示しませんでした。

【結論】

羊水中の miR-4535 および miR-1915-5p の発現は、絨毛膜羊膜炎と関連し、新生児感染の全ての検査指標とも関連を認めました。さらに、羊水中の miR-4535 および miR-1915-

5p の発現は、新生児への医療介入である新生児感染とも有意に関連しました。一方、16S rDNA コピー数及び IL-6 値は、絨毛膜羊膜炎との関連は示しましたが、新生児感染の全ての指標とは関連性を示しませんでした。また、16S rDNA コピー数及び IL-6 値は、新生児への医療介入である新生児感染とも有意な関連を認めませんでした。以上の結果から、羊水中の miR-4535 及び miR-1915-5p 発現解析は、新生児感染の罹患を予測する検査となることが示唆されました。

FIRS に関連が示唆される miR-4535 および miR-1915-5p の本来の機能については十分に理解されていません。また、miR-4535 および miR-1915-5p の発現と新生児感染に関連する既存の研究報告はなく、IL-6 を含む炎症性サイトカインが miR-4535 および miR-1915-5p の発現を調節できるかについても既存の報告はありません。今後は、miR-4535 および miR-1915-5p に対する大規模臨床研究による臨床的意義の解明や基礎的研究による生物学の特性の解明により、miR-4535 および miR-1915-5p の意義を明らかにする必要があると考えられました。

審査の結果の要旨

本論文は、羊水中の miR-4535 及び miR-1915-5p の発現解析が IL-6 や 16S rDNA コピー数よりも高い精度で胎児感染を予測するバイオマーカーとなりうることを示した。

絨毛膜羊膜炎は、妊娠中の子宮内感染により胎児由来の卵膜に炎症が波及する周産期特有の疾患であり、一部の腔内細菌が子宮内や羊水に上行感染し、母体や胎児の感染を起こす。絨毛膜羊膜炎になると、羊水中の炎症が胎児に波及し、胎児はインターロイキン (IL) -6 を含む多くの炎症性サイトカインにさらされ、急速に胎児炎症反応症候群 (FIRS: Fetal inflammatory response syndrome) と呼ばれるサイトカインストームを発症しうる。FIRS を発症すると、致死性の疾患の罹患率が上昇するのみならず、二次的に重篤な合併症や自閉症など神経発達障害の原因となりうる。そのため FIRS を発症させる絨毛膜羊膜炎を分娩前に早期に発見し、胎児感染を予測することは周産期医療の重要な課題の 1 つであり、早期に予測・診断する検査法の開発が診療の現場では切望されていた。

これまで一般臨床では、母体血液中の WBC や CRP、羊水中の IL-6 などが絨毛膜羊膜炎の指標として用いられてきたが、申請者らは、先行研究において羊水中の 2 種類のマイクロ RNA (miR-4535 と miR-1915-5p) が重度の絨毛羊膜炎の有用なバイオマーカーであることを

報告し胎児感染を早期発見できる可能性が示唆された (Kiyoshima ら, *Future Sci OA*, 2021)。本研究では絨毛膜羊膜炎と関連の深い羊水中の miR-4535 値、miR-1915-5p 値、IL-6 値、16SrDNA コピー数と出生直後の新生児の感染との関係性を評価することで、羊水中の検査項目による胎児感染の予測診断の可能性について検討した。

2009 年から 2019 年にかけて、前期破水または切迫早産の診断で入院管理を要した 57 例の日本人妊婦から経皮的羊水穿刺術にて羊水試料を収集した。絨毛膜羊膜炎の Blanc 分類に基づいて、Stage I をグループ I、Stage II をグループ II、Stage III をグループ III とした。出生時の新生児血液検査で WBC < 5,000 / μ L または WBC > 20,000 / μ L、CRP > 0.5 mg/mL、IgM > 20 mg/mL の所見を示した場合を新生児感染疑いと定義した。また、新生児への抗菌薬の投与が出生直後より 5 日間以上必要であった場合を新生児感染症と定義した。先行研究と同様に、miR-4535 と miR-1915-5p と 16S rDNA コピー数は droplet digital PCR (ddPCR) で定量し、IL-6 は ELISA 法で定量した。

羊水中の miR-4535、miR-1915-5p、16S rDNA コピー数、IL-6 は、いずれもグループ III 群では有意に高値であった。羊水中の miR-4535、miR-1915-5p、IL-6 は羊水中の 16S rDNA コピー数と有意に相関した。羊水中の miR-4535 と miR-1915-5p は、新生児感染を示唆する指標 (WBC、CRP、IgM) や新生児感染症と有意な関連を認めた。新生児感染の予測精度を ROC 曲線で評価したところ、16S rDNA コピー数と IL-6 では有意な予測能を示さなかったが、miR-4535 と miR-1915-5p では有意な予測能を示した。

以上より羊水中の miR-4535 及び miR-1915-5p 発現解析は、胎児感染の罹患を予測する検査となることが示唆された。

1. 斬新さ

ddPCR 法による羊水中の miR-4535 と miR-1915-5p の定量的な発現解析が、従来胎児感染の指標として報告されていた IL-6 や 16S rDNA コピー数の定量よりも高い精度で予測するバイオマーカーとなることを示した世界初の研究である。

2. 重要性

本研究により、絨毛膜羊膜炎における胎児感染の診断に、miR-4535 や miR-1915-5p が一般臨床で用いられる母体血液中の WBC や CRP、羊水中の IL-6 や 16S rDNA コピー数よりも高い予測精度を示す新たなバイオマーカーとなりうる事が明らかにされた。今後、胎児感染の病態解明のみならず、早期発見と予防的介入によって新生児の感染予防や予後の改善への発展が期待される。

3. 研究方法の正確性

本研究では、先行研究と同様に、定量精度が高く、高い感度をもつ ddPCR を使って羊水中 miRNA の発現量の絶対定量がなされており、優れた正確性が担保されている。

4. 表現の明確さ

本論文は明確な表現による質の高い論文で2021年8月23日付でPlacentaからオンライン出版されている。申請者のプレゼンテーションも明確なものであった。

5. 主な質疑応答

Q1：先行研究で次世代シーケンサー（NGS）や ddPCR を使って絨毛膜羊膜炎の起炎菌と考えられる細菌を 11 種類ほど同定し、絨毛膜羊膜炎はそれらの混合感染であることが多いという報告があったと思う。それらのように PCR 検査や次世代シーケンサーを用いて感染を引き起こす菌を評価することと、宿主側の炎症を反映していると考えられる miRNA を評価することは、どちらがいいのか。感度・特異度などの比較はどうか。

A1：先行研究(Urushiyama ら, *SciRep*, 2017)で述べたように、NGS を用いた細菌組成解析は菌を網羅的に検出できる反面、定量性に劣る。一方、ddPCR を使った 16S rDNA 量の定量は起炎菌の種類は同定できないものの、細菌量は正確に同定できる。先行研究の結果より、NGS を用いた細菌組成を解析するより ddPCR を用いた 16S rDNA 量を定量する方が診断精度は若干高かった。従って、本研究では起炎菌を評価する方法として、ddPCR を用いた 16S rDNA 量の定量を採用し、他の miRNA や IL-6 などのバイオマーカーと比較検討した。結果は、前述の通りであり、胎児感染の予測においては、16S rDNA 量と比べて miR-4535 や miR-1915-5p の方が感度は若干劣るものの特異度が優れており、Youden index や ROC 曲線の AUC も高値であった。なぜ miRNA の方が、感染そのものを評価する 16S rDNA 量よりも胎児感染と相関があったのかについては不明な点も多い。しかし多くの場合、感染の結果として炎症が起こるため、母体と胎児で炎症反応の起こり方は異なるものの、感染したのちに炎症反応が起こる過程で母体の炎症マーカーの中でも miRNA が胎児の炎症マーカーと最も相関が高かったのだろうと考えた。

今後については、新生児感染で治療を要した症例についてはマイクロアレイ解析の結果を見直す、NGS 解析においてもリード数を上げてより深く見直す、メタボローム解析を行う、機械学習や人工知能を用いて解析するなど、いわゆるオミクス解析等を行うことでさらなる病態解明を試みる予定である。その一方で、迅速型 NGS を用いた臨床研究を開始する予定であり、その中でも羊水の細菌組成と胎児感染の関連についても、より詳細な検討を行いたいと考えている。

Q2：図 3 で miR-4535 が上がっている症例に比べて 16S rDNA コピー数が上がっている症例の方が多ことから、16S rDNA コピー数がある程度以上検出されても miR-4535 が上がらない症例があることが伺える。その場合、菌の種類に違いがあるとか、炎症を起こしやすい菌とそうでない菌があるのではないかと思われるが、どのように考えるか。

A2：ご指摘の通り、菌の種類によって、炎症の起こしやすさや感染波及のしやすさ、胎児への毒性などに違いがあると考えます。また、これまでの報告からも、複数の菌が検出されるような羊水感染では炎症が起こりやすく、予後が不良となる可能性が高まると考えられ

る。クオラムセンシングという概念があるように、どのような菌の組み合わせが胎児にとって毒性が強いのか、炎症を起こしやすいのか、進展が早いのかなどについては、今後の研究における検討課題の1つと考える。

Q3：絨毛膜羊膜炎例で新生児の血清中でmiRNAは測っているのか。miRNAの産生細胞が胎児由来なのか母体由来なのかという疑問において、新生児でもmiRNAが検出されれば胎児がmiRNAを産生しているということになるのかと考えられないか。

A3：本研究では新生児のmiRNA量は定量していない。特に早産児では採取できる血液量が非常に少ないため、新生児のmiRNAを定量する研究は現状では難しいと推察する。先行研究(Kiyoshimaら, *Future Sci OA*, 2021)で述べたとおり、miRNAの産生細胞は基本的には母体由来と推測している。

Q4：miR-4535の機能はin silicoなどでも分かっていないのか？例えば、マクロファージ系の細胞に強制発現させるなどして分からないものか？

A4：現段階では我々が知る限り、in silicoなどでも、産生細胞や機能に関して明確に分かっていることはない。機能を解析するためには、コンストラクトを作製してセルソーティングする、また抗原提示細胞などに強制発現させるなどすべきだと考えている。しかし、実際に実験系を組むとなるとハードルが高く、現段階では実験計画を立案する段階まで至っていない。

Q5：腔内細菌叢をみることで、ある程度リスクがわかるのか？

A5：本研究ではなく先行研究(Urushiyamaら, *SciRep*, 2021)の内容となるが、我々は腔内細菌叢解析で絨毛膜羊膜炎の発症リスクを評価しうることを見出した。そのハイリスク症例に対しての抗菌剤による治療効果については、今後計画している特定臨床研究などを通して明らかとなるものと考えている。

Q6：羊水穿刺はリスクがそこまで高くなく、臨床的に頻繁に行うものなのか。

A6：一般に羊水穿刺の安全性は高く、妊娠初期に染色体検査目的で行われたりする。合併症としては破水や流産があるが、一般的にその頻度は0.1-0.3%程度と報告されている。子宮内感染を疑った際の羊水穿刺術では染色体検査時に使う穿刺針(22ゲージ針)よりも細い針(25ゲージ針)を使用可能であり、さらに侵襲性を低減できる。子宮内感染を疑った際の羊水検査の有用性は近年の報告で徐々に確立されつつあるものの、まだ保険適応になっていないなどの事情もあり、施行頻度は施設間でばらつきがある。中には、切迫早産の入院症例には原則全例羊水検査を実施している施設や同一症例で治療効果を判定する目的で複数回羊水検査を実施している施設もある。

Q7：FIRSとneonatal sepsisの違いは何か？同じものと考えてよいのか。

A7：どちらも細菌感染によってサイトカインストームを起こしている状態という点では非常に類似している。FIRS と新生児敗血症の違いは発症時期であり、胎児期に発症したものであれば FIRS、出生後に発症したものであれば新生児敗血症と診断される。

Q8：抗菌薬は5日間以上を定義しているが、その抗菌薬のタイミングは現場の医師が判断したのか。

A8：ご指摘の通りであり、新生児科の医師が感染リスクを評価して、予防的に抗菌薬投与を行うことも多い。しかし、感染がない症例では炎症所見は低値のまま横ばいで経過し、2-3日で終了する。本研究では、新生児科の周産期専門医に相談の上、5日間以上抗菌薬を投与した症例では実際に胎児感染があったと考えられる症例であるため、新生児感染症と定義した。

Q9：病原特異的な IgM 値であれば通常感染成立後1週間以上経過して上昇してくる。今回 IgM 値が高値だった症例は1週間程度前に感染が成立していると考えられる。これらが上昇する前に予防できるのが理想的と考えられるが、それに対する考察や今後の展望はあるか。

A9：現在一般臨床では、切迫早産などの症状を呈して入院となり、発熱や母体の炎症所見などから子宮内感染を疑い、疑われた症例については妊娠週数に応じて羊水検査を行う、抗菌薬投与開始する、妊娠終結するなどの対応を行なっている。しかし、ご指摘の通り、さらに前に胎児感染を来していた症例があり、そのような症例で発達障害のリスクも高まっていたと推察されるため、我々は前述のごとく先行研究(Urushiyama ら, *SciRep*, 2021)で、より早期に腔内細菌叢解析で絨毛膜羊膜炎の発症リスクを評価しうることを報告した。腔内細菌叢解析であれば、さらに早期(具体的には妊娠16-20週頃)にスクリーニング検査として実施することも可能であるため、現在それに向けた研究も行う予定である。

Q10:感染しているのは母体の常在菌ということであれば母体がIgGを持っているはずで、胎盤移行して胎児も感染から守られるはずなのに、どうして胎児に感染が成立するのか。

A10：実は正常分娩例の胎盤にも少なからず細菌叢が存在していると報告されており、何がどのくらいあるとどうなるのかという点に関しては、不明な点が多く存在する。なぜ感染すると陣痛が始まるのかも、正確には分かっていない。腔内には常在菌が多く存在するのにどうして一部の細菌だけが上行感染し、さらに一部の症例だけが胎児感染をきたすのかも分かっていない。どのくらいの時間経過で上行感染が成立しているのかも分かっていない。しかし、我々はある程度細菌量に依存して予後が悪くなる傾向を掴んでおり、腔内細菌叢の多様性が増えることで絨毛膜羊膜炎の発症リスクが高まることも分かっている。感染よりも炎症が妊娠や胎児にとって悪影響であることも分かっているのだが、それがなぜかは分かっていない。今後計画しているメタボローム解析などを用いたオミクス解析によって、病態の解明についても進めていきたいと考えている。

本論文は、発表と質疑応答の結果をふまえて主査および副査の審議の結果、学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。