

令和元年6月26日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20164

研究課題名(和文)19番染色体マイクロRNAクラスタに着目したトロホプラスト形成の機構解明

研究課題名(英文)Elucidating the mechanism of trophoblast development by focusing on chromosome 19 microRNA cluster.

研究代表者

倉品 隆平(Kurashina, Ryuhei)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：50409158

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)：胎盤形成機構の一端を明らかにするため、C19MC(chromosome 19 microRNA cluster)由来のマイクロRNAであるC19MC-miRNAが、トロホプラストがシンシチウム化する際、いかに発現しているか見出すため実験を行った。絨毛癌細胞株BeWoを培養、帝王切開胎盤由来の栄養膜を初代培養し、それぞれ実験的シンシチウム化とした。回収した細胞をマイクロRNAアレイ解析し、特異的なC19MC-miRNAを見出した。いずれの実験でもmiR-498, miR-517a-3p, miR-1323が強く発現しており、BeWoでは、miR-371b-5pの発現が特徴的に見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がんなどの深刻な疾患の病態に、タンパク質を作る情報を持たないノンコーディングRNAの関与が見いだされ、疾病の早期発見にも用いられるようになってきました。胎盤の形成に強くかかわる19番染色体特異的マイクロRNAクラスタ(C19MC)や同由来のマイクロRNA(C19MC-miRNA)のはたらきを解明することは、妊娠の成り立ちの理解を深め、妊娠高血圧や胎児発育遅延などの妊娠における異常病態の理解にもつながることが期待されます。以上の点で本研究の学術的意義や社会的意義があるものと考えます。本研究課題によって、C19MC-miRNAのはたらきの一端を明かすことができたと考えています。

研究成果の概要(英文)：In late years, it was revealed that C19MC-miRNA had the role in important part of placenta development gradually. The purpose of this study is to elucidate how C19MC-miRNA involves in the process of trophoblast syncytialization, thus, ascertain the key to find out the role of C19MC-miRNA during pregnancy lead to contribute to solve the mechanism of maintaining pregnancy.

The choriocarcinoma cell line BeWo and the primary trophoblast cells derived from term placentae which taken at elective cesarean section were used respectively for cell culture. For mimicking syncytialization, forskolin was added to culture medium for promoting cell fusion. Collected cells were examined microRNA array analysis for profiling and expression analysis.

As results, miR-498, miR-517a-3p and miR-1323 were commonly highly expressed C19MC-miRNA in both culture cells. Especially in BeWo miR-371b-5p was highly expressed in accordance with syncytialization.

研究分野：産婦人科学

キーワード：トロホプラスト マイクロRNA C19MC シンシチウム化

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

1. 研究開始当初の背景

C19MC (chromosome 19 microRNA cluster: 19 番染色体特異的マイクロ RNA クラスタ) は、人のマイクロ RNA 遺伝子クラスタとして最大であり、19 番染色体上の、わずか 100kB 余の塩基配列上に 46 個のマイクロ RNA 発現遺伝子を有し、56 個の成熟マイクロ RNA を発現するユニークな存在です。これら C19MC により発現するマイクロ RNA (以下、C19MC-miRNA) は、いくつかの種類で腫瘍 (乳癌、前立腺癌、甲状腺腫等) に見出されるものの、とくに胎盤に特異的に発現するという点で極めてユニークな存在です。

近年、C19MC-miRNA が胎盤形成に重要な役割を持っていることが少しずつ明らかになって来ました。

Xie L.らによれば、トロホプラストが絨毛外栄養膜 (EVT) として子宮脱落膜へ浸潤する際に C19MC が関与しているとしています。

C19MC microRNAs regulate the migration of human trophoblasts. Xie L, Mouillet JF, Chu T, Parks WT, Sadovsky E, Knöfler M, Sadovsky Y. *Endocrinology*. 155(12) 4975-85. 2014.

一方、トロホプラストは互いに融合して多核・一層の合胞体化栄養膜細胞層 (syncytiotrophoblast) を形成し、母体血液が循環する絨毛間腔と胎児血管との重要なバリアを形成し、母体胎児血液関門を構成していますが、トロホプラストに特異的に発現する C19MC-miRNA が、シンシチウム化する際にどのような働きをするかについては、いまだ明確な検討結果は見出されていません。

倉品らが属する日本医科大学産婦人科では、同大学分子解剖学教室との共同研究により、胎盤特異的な miRNA をプロファイリングし、

Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, et al. *Biol Reprod*. 81 717-729. 2009

絨毛栄養膜細胞層、絨毛間質、胎児血管のそれぞれの構成要素により C19MC-miRNA 発現のプロファイルが異なることを見出し、C19MC-miRNA が栄養膜に多く局在することを示して来ました。

Placenta-specific miRNA (miR-512-3p) targets PPP3R1 encoding the calcineurin B regulatory subunit in BeWo cells. [Kurashina R](#), Kikuchi K, Iwaki J, Yoshitake H, Takeshita T, Takizawa T.

J Obstet Gynaecol Res. 40(3) 650-660. 2014

2. 研究の目的

『トロホプラストがシンシチウム化する際、C19MC が如何にかかわるか』を検討し妊娠における C19MC の役割の一端をつきとめて、妊娠維持や異常妊娠病態解明に寄与することを目的として、以下のような研究を行いました。

3. 研究の方法

機関内倫理委員会による承認のもと、以下の方法で実験を行いました。

(1) 絨毛癌細胞株 BeWo (細胞番号 JCRB9111: JCRB 細胞バンク) を用い、DMEM/F-12 + 10%FBS にて、培養フラスコ内に BeWo 細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度で播種し、37℃、5% CO₂ 環境下で培養しました。セミコンフルエントとなった段階で、フォルスコリン 20 μM 添加群と非添加群に分け 24 時間後と 72 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出キット Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて RNA を抽出。

得られた totalRNA より、FlashTag™ HSR Biotin RNA Labeling kit (Affymetrix, CA, USA) により miRNA をビオチン標識し、miRNA array ver.4.0 (Affymetrix) を用いてアレイ上に miRNA をハイブリダイズさせ (48℃、16 時間)、Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて染色後、GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) によりシグナルを検出しました。なお、アレイ解析に先立ち、抽出された RNA の確認には、Nanophotometer (Implen, Munich, Germany) を用いて totalRNA を定量しました。

得られた結果を、解析用ソフトウェア Expression Console™ software 1.4 (Affymetrix) Transcriptome Analysis Console 3.0 (Affymetrix) を用いて解析。シンシチウム化が促進されたフォルスコリン添加群と、対照となる非添加群とで C19MC-miRNA の発現を比較しました。

(2) 正常妊娠の正期予定帝王切開娩出胎盤を検体として用い、採取した胎盤組織を直ちに洗浄後細切し、0.25%トリプシン (Sigma-Aldrich) および 0.25% コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) 液で 37℃ 20 分間穏やかに震盪。得られた細胞懸濁液を濾過後、遠心分離 (300g × 10 分) し、再懸濁しました。この懸濁液をパーコール重層液上に積層し遠心分離 (2800g × 25 分) し、栄

養膜細胞層を回収しました。回収した栄養膜細胞を DMEM/F-12 + 15%FBS にて 37 °C、5% CO₂ 環境下で培養し、初代培養モデルとしました。セミコンフルエントとなった段階で、(1)細胞株 BeWo の実験と同様にフォルスコリン添加群と非添加群に分け、24 時間後と 72 時間後に細胞を回収し、totalRNA を抽出。(1)と同様の実験を行いプロファイリングしました。

4. 研究成果

アレイスキャナにより検出したシグナルは、Tukey's biweight algorithm により発現強度が示され、BeWo 由来の totalRNA、ヒト胎盤栄養膜初代培養細胞由来の totalRNA のいずれからも、C19MC-miRNA を検出しました。

「3 研究の方法(1)」で述べた 絨毛癌細胞株 BeWo を 72 時間培養し回収した検体において、フォルスコリン添加・非添加いずれにおいても強く発現していた上位 80 種の C19MC-miRNA を以下に示します。

hsa-miR-512-3p, hsa-miR-1323, hsa-miR-517a-3p, hsa-miR-517b-3p, hsa-miR-498, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-516b-5p, hsa-miR-526b-5p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516a-1, hsa-miR-516a-2, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-525, hsa-miR-371a-5p, hsa-miR-518f-5p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-518c-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-526a, hsa-miR-520c-5p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-523-3p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-520g-3p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-517-5p, hsa-miR-518e-3p, hsa-miR-523, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-519d-3p, hsa-miR-527, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-520c, hsa-miR-519e-5p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-527, hsa-miR-519a-3p, hsa-miR-519b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-1227-5p, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-518b, hsa-miR-517c-3p, hsa-miR-516b-2, hsa-miR-518f-3p, hsa-miR-520a, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520f-3p, hsa-miR-519d-5p, hsa-miR-521, hsa-miR-522-3p, hsa-miR-1909-3p, hsa-miR-642a-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520h, hsa-miR-181d-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-1283-2, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-1283-1, hsa-miR-371b-5p, hsa-miR-518c-3p, hsa-miR-522, hsa-miR-373-5p, hsa-miR-520f-5p, hsa-miR-1283.

これらのうち、フォルスコリン添加群で、非添加群に比して有意に強く発現していたのは、hsa-miR-371b-5p であり (Bi-weight Avg Signal (log₂): 7.16 vs 2.61., Fold Change: 23.42), 添加群の中でフォルスコリン添加後 24 時間後回収検体と 72 時間後回収検体でも、24 時間後回収検体に比して 72 時間後検体で有意に強く発現していました (Bi-weight Avg Signal (log₂): 7.16 vs 4.09., Fold Change: 8.42)。

「3 研究の方法(2)」で述べた、正常妊娠の正期予定帝王切開娩出胎盤から抽出したヒト胎盤栄養膜初代培養細胞については、フォルスコリン添加・非添加いずれにおいても強く発現していた上位 48 種の C19MC-miRNA を以下に示します。

hsa-miR-517a-3p, hsa-miR-1323, hsa-miR-498, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-526a, hsa-miR-525, hsa-miR-516a-2, hsa-miR-518b, hsa-miR-519b, hsa-miR-520c, hsa-miR-516b-2, hsa-miR-522, hsa-miR-520h, hsa-miR-527, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-520a, hsa-miR-520g, hsa-miR-520g, hsa-miR-517a, hsa-miR-521-1, hsa-miR-519d, hsa-miR-512-1, hsa-miR-512-2, hsa-miR-520b, hsa-miR-516b-1, hsa-miR-518a-2, hsa-miR-519c, hsa-miR-1283-2, hsa-miR-520d, hsa-miR-1283-1, hsa-miR-515-1, hsa-miR-515-2, hsa-miR-519a-1, hsa-miR-518a-1, hsa-miR-518f, hsa-miR-517c, hsa-miR-526b, hsa-miR-519a-2, hsa-miR-520e, hsa-miR-524, hsa-miR-520f, hsa-miR-517b, hsa-miR-371a, hsa-miR-526a-1, hsa-miR-518e, hsa-miR-518d, hsa-miR-373, hsa-miR-372.

ヒト胎盤栄養膜初代培養細胞については、フォルスコリン添加群、非添加群との比較でアレイ検体ごとのばらつきが大きく、フォルスコリン添加において有意に強く発現する C19MC-miRNA の特定には至りませんでした。

以下の 3 種類の C19MC-miRNA は、絨毛癌細胞株 BeWo の実験的シンシチウム化実験、ヒト胎盤栄養膜初代培養細胞のシンシチウム化実験のいずれにおいても強く発現していることが示されました。すなわち、アレイ解析の結果、シグナル強度として最上位にランクされていました。

	BeWo	Primary Trophoblast
hsa-miR-498	13.74	10.27
hsa-miR-517a-3p	13.60	13.01
hsa-miR-1323	13.73	12.09

Transcriptome Analysis Console 3.0 (Affymetrix)による microRNA 発現強度を示す。数値は Bi-weight Avg Signal (log₂)

本申請研究年度内に、syncytin 強発現・発現抑制環境下における、C19MC-miRNA の機能解析を試みましたが、安定した実験結果を得る前に研究年度終了に至りました。

現在，得られた結果から，研究論文としてまとめるべく，投稿準備中です．

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

緊急対応を必要とする胎盤遺残のリスク因子の検討 市川 智子，桑原 慶充，米澤 美令，大内 望，倉品 隆平，澤 倫太郎，竹下 俊行 日本周産期・新生児医学会雑誌 54 巻 2 号 P528 2018 年

子癇発作に Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome(PRES)を合併した 4 例 倉品 隆平，桑原 慶充，米澤 美令，大内 望，市川 智子，澤 倫太郎，竹下 俊行 日本妊娠高血圧学会雑誌 24 巻 P84 2017 年

分娩第 2 期所要時間と臍帯動脈血乳酸値についての検討 倉品 隆平，桑原 慶充，伊藤 麻利江，米澤 美令，大内 望，市川 智子，澤 倫太郎，明樂 重夫，竹下 俊行 日本周産期・新生児医学会雑誌 53 巻 2 号 P544 2017 年

重症妊娠悪阻入院症例における長期化予測因子の検討 倉品 隆平，大内 望，米澤 美令，伊藤 麻利江，澤 倫太郎，桑原 慶充，明樂 重夫，竹下 俊行 日本産科婦人科学会雑誌 69 巻 2 号 P914 2017 年

重症妊娠悪阻における入院長期化予測因子の検討 倉品 隆平，大内 望，神戸 沙織，米澤 美令，桑原 慶充，澤 倫太郎，竹下 俊行 日本周産期・新生児医学会雑誌 52 巻 2 号 P43 2016 年

【周産期医学必修知識第 8 版】 産科編 絨毛膜下血腫 倉品 隆平，桑原 慶充，竹下 俊行 周産期医学 46 巻増刊 P211-213 2016 年

〔学会発表〕(計 2 件)

19 番染色体上にクラスターを形成する胎盤特異的 miRNA について．第 23 回日本胎盤学会学術集会 ワークショップ 3 「胎盤研究の新展開」倉品隆平，神戸沙織，間瀬有里，石川 源，瀧澤俊広，竹下俊行．2015 年

癒着胎盤病理検体に見るマイクロ RNA の発現解析．第 23 回日本胎盤学会学術集会 シンポジウム 「癒着胎盤の基礎と臨床」石川 源．2015 年

6．研究組織

(1)研究分担者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石川 源

ローマ字氏名：Gen Ishikawa

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。