

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16302

研究課題名(和文) 胎児機能と関連する分子マーカーの同定とその臨床的意義に関する研究

研究課題名(英文) Identification of molecular markers for fetal function

研究代表者

永田 愛(東島愛)(NAGATA (HIGASHIJIMA), Ai)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：00549595

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)：母体血液細胞に比し胎児/新生児の血液細胞で高発現を示す15個のmiRNAを同定した。絨毛膜板、絨毛および脱落膜より培養した間葉系幹細胞(MSC)における妊娠関連miRNAの発現パターンを解析したところ、miR-518bおよびmiR-517aは、胎児由来である絨毛膜板および絨毛由来MSCにおいて母体由来である脱落膜由来MSCに比較して有意に発現が高かった。また、絨毛由来MSCにおけるこれら2つのmiRNAの発現量は、妊娠時期による影響を受けず一定であった。さらにmiR-518bを絨毛由来MSCに導入し、miR-518bが調節する遺伝子を解析したところ、13個の候補遺伝子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

産科医療における出生前の胎児機能評価には限界が知られており、新たな検査法の開発が望まれている。母体血漿中には胎児・胎盤由来のcell-free mRNA (cff-mRNA)が流入している。その流入源のひとつは胎盤であることが知られているが、胎児由来のものも存在していると考えられる。母体血漿中における胎盤特異的cff-mRNA流入量の変化と胎盤機能との関連が示唆されていることより、胎児特異的miRNAは胎児機能を推定する分子マーカーとして利用できる可能性がある。また、胎盤由来間葉系幹細胞は、妊娠関連疾患の分子メカニズムの解明や、細胞治療の有用なツールとなりうることで期待される。

研究成果の概要(英文)：We selected 15 microRNAs(miRNAs) which shows significantly higher expression in maternal blood cells than foetal and neonatal blood cells. We separated mesenchymal stem cells(MSCs) from the chorionic plate(CP-MSCs), chorionic villi(CV-MSCs) and decidula basalis (DB-MSCs) of human term placental tissue. miR-518b and miR-517a (placental-specific miRNAs) were clearly expressed in CP-MSCs and CV-MSCs of foetal origin, but were barely expressed in DB-MSCs of maternal origin. Furthermore, expression levels of placenta-specific miRNAs in CV-MSCs remained stable across different pregnancy phases. miR-518b was transfected in CV-MSCs and microarray analysis was used to screen for miR-518b target genes. placenta-derived MSCs, especially CV-MSCs, are a potential tool for investigating the role of placental miRNAs in pregnancy-related disorders.

研究分野：周産期遺伝学

キーワード：胎児特異的 胎児機能 microRNA 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在の産婦人科臨床で用いられている検査法では、羊水を用いて胎児肺成熟度を評価することはできるが、一般的に、胎児神経系の発達度や胎児消化管の成熟度など、肺以外の胎児機能の成熟度を評価することは難しい。胎児機能が出生前に正確に評価可能になれば、より詳細な胎児モニタリングが可能になり、周産期医療の向上に寄与するばかりか、子宮内での胎児機能確立のメカニズム解明に大いに貢献すると期待される。母体の血漿中に流入している胎児由来cell-free mRNA(cff-mRNA)およびcell-free microRNA (cff-miRNA)の定量化は胎児機能の推定に応用可能と期待されている。これまでに私どもは、母体血漿中に流入する胎盤特異的miRNAを同定し、その定量化と妊娠高血圧症候群や胎児発育不全の病態との関連を報告している(Clinical Chemistry 2010 and 2013, Prenatal Diagnosis 2013)。間葉系幹細胞は骨髄をはじめ、全身の臓器に存在することが知られている。間葉系幹細胞は多分化能や自己増殖能のみならず、免疫調節能や抗炎症作用、様々な液性因子分泌作用を有することから再生医療の医療資源として使用されている。間葉系幹細胞は臨床の現場で実際に使用されている一方で、胎盤に存在するMSCが胎盤の発育や機能にどのような影響を与えるかについてはわかっていない。またそれらを明らかにすることで、これまで報告されているような胎盤由来間葉系幹細胞を用いた妊娠関連疾患の医療への発展に寄与できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

産科医療における出生前の胎児機能評価には限界が知られており、新たな検査法の開発が望まれている。子宮内における胎児神経、内分泌代謝や各臓器の発達・成熟度などの胎児機能が出生前に高精度に評価可能になれば、より詳細な胎児モニタリングが可能になる。そこで、本研究では、母体を通じて得られる胎児の分子情報(羊水あるいは母体血中に浮遊する羊膜、胎児、羊水細胞それぞれに由来するmRNA/miRNA)に着目し、妊娠経過に伴う胎児成熟の分子病態解明に迫り、羊水検査ならびに母体の血液検査による総合的な胎児機能評価法の確立を目指す。また、間葉系幹細胞の機能の解析を行うにあたり、これまで私どもが報告してきた妊娠関連miRNAに注目した。胎盤のみに発現するmicroRNAは胎盤の発育や妊娠の維持に対して重要な働きをしていると考えられ、それらは母体血漿中に流入しバイオマーカーとしても有用であると考えられる。また、妊娠関連miRNAは妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの病態形成においても関与が示唆されている。本研究では正常胎盤組織から間葉系幹細胞を初代培養し、それら間葉系幹細胞における妊娠関連miRNAの発現解析およびその調節機構について検討することを目的とした。まず、正常胎盤からの胎盤由来間葉系幹細胞の分離同定、次にそれら間葉系幹細胞における妊娠関連miRNAの発現について解析し、最後に妊娠関連miRNAの遺伝子調節機構について検討した。

3. 研究の方法

(1)臍帯血、胎児血を用いた胎児特異的miRNAの同定

妊娠37週正常妊娠の母体血、臍帯血、新生児血および胎盤組織を一組とした。それぞれの検体よりRNAを抽出し、50b未満のRNA断片を選択、cDNAライブラリーを作成して次世代シーケンスを用いて塩基配列を決定し、それらをヒトゲノムデータベースにマップした。各検体でマップされたリード数を100万リードあたりのリード数(read per million: RPM)に換算して、検体間の発現量を比較した。母体血で100リード未満かつ母体血に対して臍帯血あるいは新生児血で10倍以上の発現量を示すものをfetal blood cell specific miRNAとした。発現解析にはSOAP :Short Oligonucleotide Analysis Package を用いた。

(2)胎盤由来間葉系幹細胞の検討

正常胎盤からの胎盤由来間葉系幹細胞の分離・同定

妊娠38週に選択的帝王切開術で得た正常胎盤について、胎盤内の部位において間葉系幹細胞の性質が異なるかどうかを確認するため、胎児由来部分として絨毛膜板、絨毛、母体由来部分として脱落膜それぞれから間葉系幹細胞を初代培養した。酵素処理を行わないexplant法という方法を用いて、組織片からmigrationした細胞をMSCとして回収した。さらに、STR-PCRを用いたDNA多型解析により、胎児由来・母体由来の間葉系幹細胞に異なる成分の混入がないことを確認した。

胎盤由来間葉系幹細胞における妊娠関連miRNAの発現解析

胎盤各部位から分離した間葉系幹細胞の機能的差異について検討するため、羊膜由来、臍帯のワルトンゼリー、臍帯血由来の間葉系幹細胞を使用して妊娠関連miRNAの発現解析を行った。妊娠関連miRNAは我々が報告してきたmiR-323-3p、miR-518b、miR-517aについて検討した。

妊娠関連miRNAの遺伝子調節機構の解明

胎盤の各部位で発現パターンが異なる妊娠関連miRNAのうち、絨毛由来MSCで高発現していたmiR-518bは妊娠高血圧腎症の予測マーカーとしての報告があるが、miR-518bがどのような遺伝子を調節しているかはわかっていない。そこで、miR-518bの遺伝子調節機構を解明するため、絨毛由来MSCにmiR-518b mimicをトランスフェクションし、DNAマイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 臍帯血、胎児血を用いた胎児特異的miRNAの同定

母体血液細胞に比べ胎児/新生児の血液細胞で高い発現を示すmiRNAとして、15個のmiRNA(miR-370, miR-452, miR-485-5p, miR-432, miR-136, miR-136*, miR-433, miR-323-3p, miR-494, miR-409-3p, miR-431, miR-654-5p, miR-376a*, miR-370*, miR-377*)が同定された。さらにこれらのうち、miR-452を除く14個のmiRNAは14番染色体のmicroRNA clusterに存在していた。これらのmiRNAは胎盤でも高発現していたため、胎盤と比較して臍帯血で2倍以上の発現を示すものを解析したところ、miR-370, miR-409-3p, miR-654-5pが選択された。これら3つのmiRNAは、より胎児の状態を反映している可能性が示唆された。

(2) 胎盤由来間葉系幹細胞における妊娠関連miRNAの発現解析

胎児由来のものとして絨毛膜板、絨毛、母体由来として脱落膜、臍帯組織、臍帯血由来の間葉系幹細胞の発現結果を示す。全身の臓器で発現しているmiR-21はすべてのMSCで発現を認めしたが、これら3者間で差は認めなかった。miR-323-3pについてもいずれの間葉系幹細胞でも発現していたが、とくに脱落膜由来に比べ、絨毛膜板、絨毛由来の間葉系幹細胞において高く発現していた。miR-518b、517aは絨毛膜板および絨毛由来の間葉系幹細胞において高発現し、脱落膜由来の間葉系幹細胞ではほとんど発現せず、臍帯組織や臍帯血由来の間葉系幹細胞では全く発現していなかった(図1)。

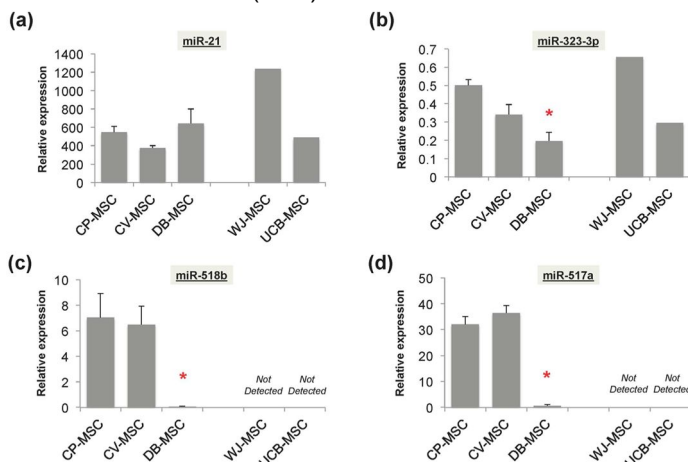


図 1. 胎盤由来間葉系幹細胞における妊娠関連miRNAの発現

CP-MSC : 絨毛膜板由来間葉系幹細胞

CV-MSC : 絨毛由来間葉系幹細胞

DB-MSC : 脱落膜由来間葉系幹細胞

*p < 0.05 vs. CP-MSCs and CV-MSCs

さらに、異なる妊娠時期における妊娠関連 miRNA の発現の比較を行うため、妊娠初期の絨毛からも同様の方法で間葉系幹細胞を分離同定した。結果、いずれの miRNA においても妊娠時期による発現比の違いは認めなかった(図 2)。

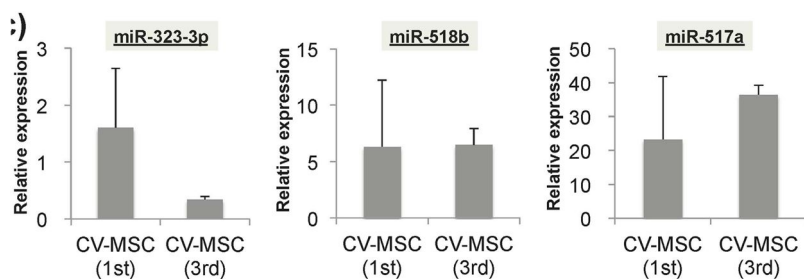


図 2. 妊娠初期および後期の絨毛由来間葉系幹細胞における miRNA の発現比較

(3) 妊娠関連 miRNA(miR-518b)の遺伝子調節機構の解明

miR-518b をトランスフェクションし、これをマイクロアレイで解析した。2 倍以上発現が上昇している遺伝子として 112 個、1/2 倍以上発現が低下している遺伝子として 124 個が抽出され、その中から妊娠高血圧腎症や胎児発育不全の病態と関連する遺伝子を抽出した(表 1, 2)。

表 1. 発現が上昇していた遺伝子

Gene symbol	Gene name	Fold change	Pregnancy-related disorders	Reference
CD69	CD69 molecule	3.179	PE, FGR	Vianna P. (2016)
HPX	Hemopexin	2.721	PE	Bakker W.W. (2009)
SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	2.248	PE	Wikstrom A.K. (2009)
LPA	Lipoprotein, Lp(a)	2.201	PE	Manten G.T. (2005)
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2.113	PE	Chaemsai thong P. (2014)
STC1	Stanniocalcin 1	2.039	PE, FGR	Juhanson P. (2016)

表 2. 発現が低下していた遺伝子

Gene symbol	Gene name	Fold change	Pregnancy-related disorders	Reference
TH	Tyrosine hydroxylase	2.964	PE	Rajakumar A. (2004)
HSD3B1	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	2.572	PE	Shimodaira M. (2012)
EDNRA	Endothelin receptor type A	2.639	PE, FGR	Bigham A.W. (2014)
AGER	Advanced glycosylation end	2.220	PE, FGR	Shao J. (2016)

	product-specific receptor			
WNT2	Wingless-type MMTV integration site family member 2	2.116	PE, FGR	Zhang M. (2016)
C9	Complement component 9	2.073	PE, FGR	Derzsy Z. (2010)
TRPM2	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2	2.042	PE, FGR	Blumenstein M. (2012)

PE : Preeclampsia (妊娠高血圧腎症) FGR : Fetal growth restriction(胎児発育不全)

胎盤由来間葉系幹細胞において、miR-518 b に調節される 13 個の候補遺伝子を同定し、それらは妊娠高血圧腎症や胎児発育不全の病態形成に関与していると報告されていた。以上より、胎盤由来間葉形幹細胞は、妊娠関連疾患の分子メカニズムの解明や細胞治療の有用なツールとなりうることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura K, Hasegawa Y, Yamada M, Higashijima A, Miura S, Kaneuchi M, and Masuzaki H	4. 巻 39
2. 論文標題 Expression levels of C19MC and C14MC microRNAs in complete hydatidiform moles and ovarian mature cystic teratomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Gynaecological Oncology	6. 最初と最後の頁 277-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12892/ejgo4014.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Yuko, Miura Kiyonori, Sato Shuntaro, Higashijima Ai, Hasegawa Yuri, Miura Shoko, Yoshiura Koh-ichiro, Masuzaki Hideaki	4. 巻 44
2. 論文標題 Reference values for circulating pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 840～851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.13610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horie Ichiro, Haraguchi Ai, Ito Ayako, Nozaki Aya, Natsuda Shoko, Akazawa Satoru, Mori Yoshitaka, Ando Takao, Higashijima Ai, Hasegawa Yuri, Yoshida Atsushi, Miura Kiyonori, Masuzaki Hideaki, Kawakami Atsushi, Abiru Norio	4. 巻 11
2. 論文標題 Impaired early phase suppression of glucagon secretion after glucose load is associated with insulin requirement during pregnancy in gestational diabetes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 232～240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimada Takako, Higashijima Ai, Fukushima Ai, Komatsu Nahoko, Noguchi Masashi, Ohashi Kazuaki, Hasegawa Yuri, Miura Kiyonori	4. 巻 45
2. 論文標題 Malignant transformation from mature cystic teratoma of the ovary	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 1957～1960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Miura K, Higashijima A, Miura S, Hasegawa Y, Masuzaki H
2. 発表標題 Decreased cell-free but not exosomal miR-518b in maternal plasma is caused by amniocentesis
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東島 愛
2. 発表標題 胎盤由来microRNA
3. 学会等名 第25回日本胎盤学会学術集会（ワークショップ）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学産婦人科ホームページ http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/gyneclogy/

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----