

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14926

研究課題名（和文）胎盤合体化と内分泌機能の成熟制御機構を標的とした妊娠合併症治療戦略

研究課題名（英文）Targetable regulatory mechanism in placental syncytialization and endocrine function for treating the pregnancy complication

研究代表者

野口 幸希（Noguchi, Saki）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教

研究者番号：10803661

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：胎盤モデル細胞において、miR-126の発現上昇が胎盤関門形成に重要な細胞膜融合因子であるsyncytin-1/-2や胎盤関門に発現するトランスポーターSLC22A11などの発現を上昇させることを示した。これらより、妊娠高血圧腎症胎盤で報告されるmiR-126の発現変動は、胎盤関門機能の変動を反映している可能性が示された。また、胎盤栄養膜細胞の多能性維持を担うRNA結合タンパクLIN28AがmiR-126の標的となることを示した。miR-126について、胎盤における新たな役割を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR-126が胎盤における関門形成と内分泌機能に重要な分子の発現に影響することが示唆されたことから、miR-126が胎盤機能を反映する指標の一つとなる可能性を示すことができた。血管内皮における機能が主に解析されてきたmiRNAについて、胎盤における役割の解明に資する結果を得た。miR-126標的経路に対する解析は、妊娠高血圧腎症およびこれを原因とする胎児発育不全において胎児環境を正常化する治療の開発につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We indicated that miR-126, an angiogenic micro RNA enhances the expression of placental genes, such as syncytin-1/-2, fusogenic molecule for placenta barrier formation and SLC22A11, an estrogen precursor transporter at placental barrier, in trophoblast model cells. Thus, our results raised the possibility that the aberrant expression of miR-126 in preeclamptic placenta reflects placental barrier disfunction. Furthermore, the present study revealed that LIN28A, an RNA binding protein related trophoblast stemness, is a direct target of miR-126 in the trophoblast model cells. Therefore, these results suggested the new role of miR-126 in placental trophoblast.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：胎盤 胎盤関門 miRNA 合体化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症と胎児発育不全は、妊娠中期以降に発症し、妊娠高血圧腎症では胎児発育不全を伴うことが多い。これらは、胎児死亡だけでなく、出生後の児の発達遅延や、成人後の生活習慣病罹患リスクも上昇させるため、積極的に治療すべき疾患と位置付けられる。妊娠高血圧腎症や胎児発育不全に対する治療が、母児の将来にわたる生活の質を改善することは自明であるが、現在、薬物治療は母体の対症療法にとどまり、その効果は限定的である。

盤状構造を持つヒト胎盤において、胎児発達に特に重要な組織層は、絨毛部の栄養膜細胞である。栄養膜細胞同士は融合して合胞体となることで特異な物理的閉鎖組織を形成し、合胞体化と連動して、妊娠維持と胎児成長に必要な内分泌機能を獲得する。妊娠高血圧腎症や胎児発育不全を呈する妊婦の胎盤では、栄養膜細胞による閉鎖の形態や妊娠維持と胎児臓器成熟に重要なホルモンの分泌に異常が報告される。したがって、合胞体化と内分泌機能獲得による胎盤閉鎖成熟機構の解明は、妊娠高血圧腎症および胎児発育不全に対する創薬標的の発掘に重要であると考えられる。

ヒト胎盤栄養膜モデル細胞であるヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞は、アデニル酸シクラーゼ活性化剤 forskolin によって cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (protein kinase A, PKA) シグナルを活性化することで、合胞体化や内分泌機能に関わる遺伝子の発現を上昇させる。胎盤閉鎖の分化・成熟過程における制御機構を分子レベルで理解するにあたり、JEG-3 細胞における PKA 活性化で変動する micro (mi) RNA を解析した。その結果、妊娠高血圧腎症および胎児発育不全の胎盤や母体血で発現低下が報告される miR-126 の発現が、最も高い変動率で上昇した。したがって、miR-126 は、胎盤閉鎖の成熟制御に重要な役割を果たすと推測された。

2. 研究の目的

miR-126 が胎盤閉鎖の分化・成熟過程を標的とし、miR-126 による制御の不足が妊娠高血圧腎症や胎児発育不全の発症や進行に関与する可能性がある。しかし、miR-126 は血管内皮細胞において血管新生に働くことが知られる一方、胎盤栄養膜細胞における miR-126 の役割は不明である。そこで本研究は、「PKA 活性化が miR-126 の発現調節を介して、胎盤閉鎖の分化・成熟を司ることの実証」と「栄養膜細胞における miR-126 の直接標的遺伝子および miR-126 と胎盤閉鎖成熟を結ぶ経路の同定」を目的とした。これらによって「PKA シグナル活性化による miR-126 の発現上昇が胎盤栄養膜細胞の合胞体化と内分泌機能獲得の達成に寄与する分子機構の解明」を目指した。

3. 研究の方法

(1) miR-126 の過剰発現：JEG-3 細胞または BeWo 細胞にリポフェクション法によって miR-126 模倣体を導入した。JEG-3 細胞ではリアルタイム RT-PCR によって遺伝子発現変動を評価し、BeWo 細胞では、免疫染色を行い、一つの細胞膜 (E-cadherin) で囲まれた領域当たりの核数を評価した。

(2) miR-126 のノックダウン：Forskolin による PKA シグナルの活性化によって JEG-3 細胞を分化させ、リポフェクション法にて miRNA 阻害剤を導入することで miR-126 の機能を抑制した。RNA を抽出し、TaqMan MicroRNA アッセイで miRNA の発現抑制を評価し、リアルタイム RT-PCR によって mRNA の発現変動を評価した。

(3) ラット胎盤における miR-126 発現：妊娠 19.5 日目 SD ラット胎盤を脱着膜、着床連結帯、迷路部の 3 部位に切離して RNA を抽出し、各部位における miR-126 発現量を TaqMan MicroRNA アッセイで評価した。

(4) ルシフェラーゼアッセイ：JEG-3 細胞において、forskolin 添加によって発現が上昇し、miR-126 過剰発現によって発現が減少した遺伝子のうち、miWalk2.0 のデータベース横断的解析において複数の miRNA 標的配列予測アルゴリズムで標的と予測された遺伝子を選択した。当該遺伝子について、mRNA の 3' 非翻訳領域を介した miR-126 による発現制御を評価した。JEG-3 細胞における miR-126 標的候補遺伝子の 3' 非翻訳領域または標的配列を変異させた 3' 非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子下流に挿入したプラスミドベクターを構築し、これらにリポフェクション法にて miR-126 模倣体とともに JEG-3 細胞に導入した。3' 非翻訳領域を介した翻訳後制御をルシフェラーゼによる発光によって評価した。

(5) 標的遺伝子の過剰発現およびノックダウン：miR-126 の標的として同定した遺伝子の発現ベクターを構築した。標的遺伝子の発現ベクターまたは siRNA を JEG-3 細胞に導入し、リアルタイム RT-PCR によって胎盤閉鎖遺伝子の発現に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) miR-126 が栄養膜細胞の合胞体化に与える影響の検討

栄養膜モデル細胞であるヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞において miR-126 を過剰発現させることで、栄養膜細胞の合胞体化に必要な膜融合遺伝子である syncytin-1、syncytin-2、および syncytin-2 の受容体である MFSD2A の発現は有意に増加した。さらに別のヒト絨毛癌由来細胞株である BeWo 細胞に miR-126 を過剰発現させることによって、多核化した細胞の存在を観察できた。また、ラット胎盤における miR-126 の発現は、合胞体栄養膜細胞層によって構成される迷路部で最も高く、着床連結帯では、ほとんど検出されなかった。miR-126 は、血管内皮に高発現することから (Vasc Pharmacol. 2015;3:341-351)、血管に富む迷路部ではほかの部位よりも高水準で発現することが予測される。しかし、合胞体栄養膜細胞 における miR-126 の発現は、ヒトおよびラット胎盤で観察されることに加え (Dev Biol. 2019;449:21-34)、miR-126 が syncytin-1 および syncytin-2 の発現に影響を与えることが明らかになったことから、迷路部で高い miR-126 が血管内皮における発現のみを反映しているとは考えづらい。また、マウス妊娠中期にあたる妊娠 15.5 日目の miR-126 ノックアウトマウス胎盤では迷路部の萎縮が観察されるが、これは着床連結帯の肥厚の代償によるものとされている (Dev Biol. 2019;449:21-34)。一方、我々の結果は迷路部に発現する miR-126 が合胞体層形成そのものにも影響を及ぼす可能性を示すものである。これまで栄養膜細胞における miR-126 の役割は不明であったが、以上の結果より、miR-126 は、栄養膜細胞の合胞体化促進によって胎盤関門形成に寄与することが示唆された。

(2) 栄養膜細胞における miR-126 の標的遺伝子の探索

JEG-3 細胞を PKA シグナルの活性化によって合胞体栄養膜細胞様に分化させることで、miR-126 の発現は顕著に上昇する。一方、RNA 結合タンパク質である LIN28A の JEG-3 細胞における発現は、PKA シグナル活性化および miR-126 過剰発現のいずれによっても減少した。また、LIN28A は、miRwalk2.0 によるデータベース解析から、3 つのアルゴリズム (miRmap、PITA、RNAhybrid) において miR-126 の直接標的と予測された。LIN28A は栄養膜前駆細胞の多能性維持に働き、LIN28A のノックダウンはヒト栄養膜モデル ACH-3P 細胞の合胞体化を促進することが報告されることから (Biol Reprod. 2013;89:95) miR-126 は、3'非翻訳領域を介して LIN28A の発現を制御することで、JEG-3 細胞の分化誘導に働く可能性がある。そこで、miR-126 が LIN28A mRNA の 3'非翻訳領域を介して直接的に LIN28A の発現を抑制するかを検討した。LIN28A mRNA の 3'非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子下流に挿入したプラスミドを構築し、JEG-3 細胞に導入することで得られたルシフェラーゼ活性は、miR-126 の過剰発現によって有意に低下した。一方、LIN28A mRNA の 3'非翻訳領域に存在する miR-126 結合予測配列を変異させたレポータープラスミドでは、miR-126 の過剰発現によるルシフェラーゼ活性の低下は示されなかった。したがって、miR-126 が LIN28A mRNA の 3'非翻訳領域に結合することで、その発現を抑制することが示された。

(3) miR-126 標的遺伝子が栄養膜細胞の合胞体化に与える影響の検討

LIN28A が miR-126 の直接標的であることが示されたことから、miR-126 による栄養膜の合胞体化促進機構が LIN28A 発現抑制を介するのかが検討した。JEG-3 細胞に LIN28A を過剰発現させたところ、栄養膜細胞の細胞膜融合因子である syncytin-1 および syncytin-2 の遺伝子発現は減少傾向を示した。一方、JEG-3 細胞における LIN28A 発現を siRNA で抑制しても、syncytin-1 および syncytin-2 の発現は上昇しなかった。さらに、forskolin 処理した JEG-3 細胞に miR-126 阻害剤を添加することで、PKA シグナルによる miR-126 の発現誘導を抑制したとき、syncytin-1 および syncytin-2 の発現誘導は一部抑制されたが、LIN28A の発現に miR-126 阻害剤による影響は示されなかった。以上より、miR-126 による栄養膜の合胞体化促進機構に LIN28A が関与する証拠は示されなかった。妊娠高血圧腎症の胎盤においては、miR-126 の発現が低下し (J Cell Biochem. 2013;9:2148-2159, J Int Med Res. 2014;6:1243-1251)、syncytin-1 および syncytin-2 の発現も減少する (Mol Reprod Dev. 2008;75:175-183, Reprod Sci. 2011;18:1085-1091)。現在、妊娠高血圧腎症における syncytin-1/-2 の発現減少に関与する分子機構は明らかでないが、miR-126 による LIN28A の発現抑制を介した経路でこの現象が説明できる可能性は低い。

(4) miR-126 が内分泌関連遺伝子発現に与える影響の検討

ラット胎盤において、内分泌能を持つ海綿状栄養膜細胞や栄養膜巨細胞で構成される着床連結帯では、miR-126 がほとんど検出されなかった。一方、ヒトでは合胞体栄養膜細胞が内分泌器官としても機能することから、ヒト胎盤特有の内分泌機構に関与する遺伝子発現に miR-126 が与える影響を解析することとした。胎児 - 胎盤系における estriol 合成は、ヒトなどの一部の霊長類に特徴的な機構である。JEG-3 細胞に miR-126 を過剰発現させると、estriol 前駆体の胎盤への取り込みを担うトランスポーター (Endocrinology. 2016;156:2704-2712) : SLC22A11 の発現は、有意に上昇した。したがって miR-126 は、ヒト合胞体栄養膜の関門機能に加えて内分泌機能の獲得・維持にも関与する可能性が示された。

結論として、miR-126 は、栄養膜細胞の合胞体化促進反応に寄与することが示唆された。妊娠高血圧腎症では miR-126 発現が変動することから、妊娠高血圧腎症胎盤において報告される syncytin-1 および syncytin-2 の減少に、miR-126 による遺伝子発現制御の異常が関与する可能性が示された。ただし、その機構に関与する miR-126 の標的シグナル経路の同定については、さらなる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Yu, Nishimura Tomohiro, Higuchi Kei, Noguchi Saki, Tega Yuma, Kurosawa Toshiki, Deguchi Yoshiharu, Tomi Masatoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Transport of Pregabalin Via L-Type Amino Acid Transporter 1 (SLC7A5) in Human Brain Capillary Endothelial Cell Line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-018-2532-0	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 Nishimura Tomohiro, Sano Yuichiro, Takahashi Yu, Noguchi Saki, Uchida Yasuo, Takagi Akinori, Tanaka Takahiro, Katakura Satomi, Nakashima Emi, Tachikawa Masanori, Maruyama Tetsuo, Terasaki Tetsuya, Tomi Masatoshi	4. 巻 108
2. 論文標題 Quantification of ENT1 and ENT2 Proteins at the Placental Barrier and Contribution of These Transporters to Ribavirin Uptake	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3917 ~ 3922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2019.09.005	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 西村 友宏、野口 幸希	4. 巻 62
2. 論文標題 妊娠による生理学的変化と薬物動態	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊薬事	6. 最初と最後の頁 33 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 潘曉楽、野口幸希、安藤美鈴、竹村千尋、西村友宏、登美育俊
2. 発表標題 miR-126が栄養膜モデルJEG-3細胞における合胞体化促進因子の発現に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木林由佳、野口幸希、田辺美那子、齋藤義正、西村友宏、登美育俊
2. 発表標題 マウス栄養膜幹細胞3次元培養系における関門機能分子の発現誘導
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saki Noguchi
2. 発表標題 The role of OAT4, a bidirectional organic anion transporter, on drug distribution and excretion in humans
3. 学会等名 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naomi Fukazawa, Saki Noguchi, Kanako Furugori, Tomohiro Nishimura, Masatoshi Tomi
2. 発表標題 Identification of SLC22A11 promoter for placental OAT4 expression
3. 学会等名 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saki Noguchi, Moeko Tobita, Hayumi Atsuta, Rika Kimura, Ayaka Fukumoto, Tomohiro Nishimura, and Masatoshi Tomi
2. 発表標題 SUBSTRATE RECOGNITION AND CHLORIDE ION DEPENDENT TRANSPORT OF ANGIOTENSIN II RECEPTOR BLOCKERS BY OAT4
3. 学会等名 12TH INTERNATIONAL ISSX MEETING (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口幸希、古郡加奈子、深澤尚美、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 胎盤特異的なヒトSLC22A11 発現における転写制御の解析
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口幸希、高橋優、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 血漿中アミノ酸濃度変動がpregabalinの脳移行に与える影響
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舟橋和毅、野口幸希、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 OAT4/OAT3発現MDCK細胞を介したolmesartan経細胞輸送におけるOAT4の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 潘曉染、野口幸希、安藤美鈴、竹村 千尋、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 ヒト栄養膜由来JEG-3細胞の分化過程におけるmiR-126の役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口幸希、古郡加奈子、深澤尚美、西村友宏、中島恵美、登美斉俊
2. 発表標題 ヒトSLC22A11の胎盤特異的プロモーター領域の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 潘曉潔、野口幸希、安藤美鈴、竹村 千尋、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 ヒト絨毛癌由来JEG-3細胞の分化過程におけるmiR-126発現がLIN28A発現に与える影響
3. 学会等名 第3回トランスポーター研究会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noguchi S, Furugori K, Nishimura T, Nakashima E, Tomi M
2. 発表標題 Transcriptional regulatory element for the placental expression of organic anion transporter 4
3. 学会等名 International Federation of Placenta Associations (IFPA) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野口幸希、熱田萩弓、木村りか、飛田萌子、福本文香、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 有機アニオン系薬物トランスポーターOAT4を介したアンジオテンシンII受容体拮抗薬の輸送
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----