

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09821

研究課題名(和文) マイクロRNAを介した胎児胎盤母体間コミュニケーションメカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of feto-maternal communication via micro-RNA

研究代表者

宮坂 尚幸 (Miyasaka, Naoyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70313252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Nik-related kinase (NrK) 欠損マウスに高頻度に発生する分娩遅延のメカニズムを検討した。NrK欠損マウスとコントロールの胎盤における発現遺伝子比較により分娩誘発シグナルの候補遺伝子を発見した。また電子顕微鏡から、NrK欠損マウスのゴルジ体が拡張しており、何らかの物質が分泌不全になることで分娩遅延を誘発すると考えられた。また妊娠末期血液分析によりNrK欠損マウスの分娩遅延の原因がプロゲステロン低下不全によるものであることを発見した。ヒトにおける過期妊娠の機序を解明する目撃で、ヒト胎盤におけるNrKの発現を解析したところ、絨毛合体細胞層に発現していることを明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠42週以降の過期妊娠は母児の周産期予後が極めて不良であるが、ヒトにおける陣痛発来メカニズムは未だに解明されていない。NrK-knockout胎子を正常母体に移植したマウスにおいて高率に分娩遅延が発生し母児の死亡率が高いことから、胎子もしくは胎盤から何らかのシグナルが母体に作用して陣痛が開始されていることが示唆される。本研究ではNrKが陣痛発来を抑制するプロゲステロン関連の遺伝子を増強し、陣痛発来を促進するプロスタグランジン関連遺伝子を抑制することで分娩遅延を来すことを初めて証明した。また、NrKがヒト胎盤においても母体血と接触する合体細胞層に発現していることを世界に先駆けて証明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism responsible for the delayed delivery in Nik-related kinase (NrK)-knockout mice. By comparing the expressed genes in the term placenta between NrK-knockout and control mice, we found that progesterin and adipo Q receptor family member 9, and prolactin family members were upregulated and prostaglandin synthase cyclooxygenase 2 was down regulated in NrK-knock out mice. Electron microscopic study showed that placental Golgi bodies in NrK-knockout were significantly enlarged, which indicated secretion dysfunction of the placental products might be the cause of delayed delivery. Moreover, we found that insufficient progesterone reduction at term was the main reason for the delayed delivery in NrK-knockout mice. In addition, we investigated NrK expression in the human placenta in order to evaluate whether NrK was associated with the post term pregnancy. It was revealed the NrK was also expressed in syncytial trophoblasts in human placenta.

研究分野：周産期医学

キーワード：Nik-related kinase 分娩遅延 ノックアウトマウス 絨毛合体細胞層

## 1. 研究開始当初の背景

分娩予定日を超過した妊娠は、母児の予後が不良であることが知られており、周産期医療における重要な課題である。しかしながら、ヒトにおける分娩開始のメカニズムは未だに不明であることから、根本的な解決方法は得られていない。Nr<sub>k</sub> (Nik-related kinase) は、マウス胚体外組織から単離された X 染色体上の遺伝子であるが、Denda らは Nr<sub>k</sub> 欠損マウスでは胎盤が肥大し、高頻度で分娩遅延が起こることを報告した。さらに興味深いことに、Nr<sub>k</sub> 欠損胚を正常母獣に移植しても、同様に分娩遅延が起きることから、分娩開始は単なる母体側の能動的な変化ではなく、胎児から母体に何らかのシグナルが出され調整されている可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

Nr<sub>k</sub> ノックアウトマウスにおける分娩遅延の表現型を明確にする。

マウス胎盤における Nr<sub>k</sub> の局在部位を明らかにし、Nr<sub>k</sub> ノックアウトマウスにおける胎盤の形態的な異常の原因を解明する。

Nr<sub>k</sub> 遺伝子によって制御される陣痛関連物質が何であることを明らかにする。

ヒト胎盤においても Nr<sub>k</sub> が局在するか、するとしたらどの部位かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

Nr<sub>k</sub> ノックアウトマウスを作成し、その表現型である分娩遅延の実態を定量的に評価する。

ワイルドタイプマウスおよび Nr<sub>k</sub> ノックアウトマウスの胎盤を採取し、HE 染色・免疫染色・in situ hybridization・電子顕微鏡により、形態的の比較を行うと同時に、Nr<sub>k</sub> の局在を明らかにする。さらに、Nr<sub>k</sub> ノックアウトマウスと正常コントロールマウスにおける胎盤の遺伝子発現を比較するために RNA シークエンスによる比較検討を行う。

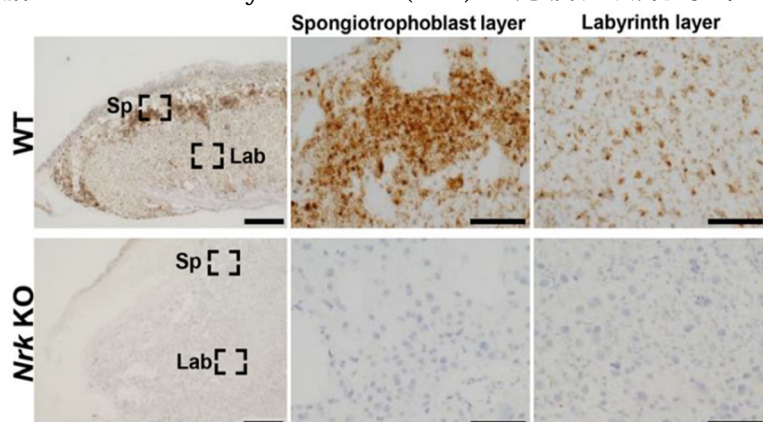
ヒト胎盤における Nr<sub>k</sub> の局在を明らかにするために HE 染色・免疫染色・in situ hybridization を行う。

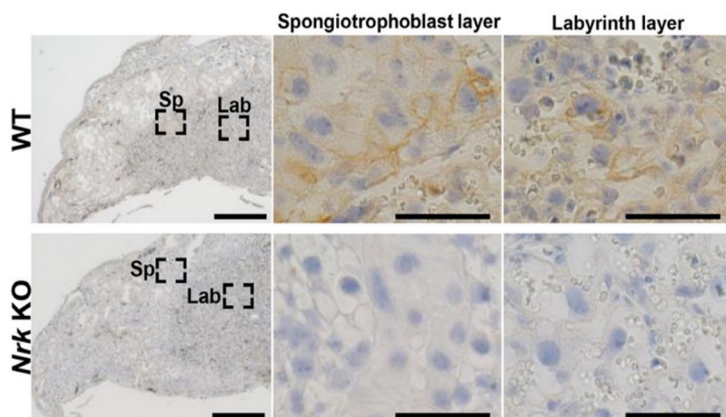
## 4. 研究成果

Nr<sub>k</sub> KO マウス同士の交配の分娩遅延率は 79.3% (23/29 例)で、WT マウス同士の 18.1% (4/22 例) に比し有意に高率であった(Student's t-test,  $p=0.000057$ )。

妊娠 18.5 日目のマウス胎盤の In situ hybridization (ISH) と免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry:

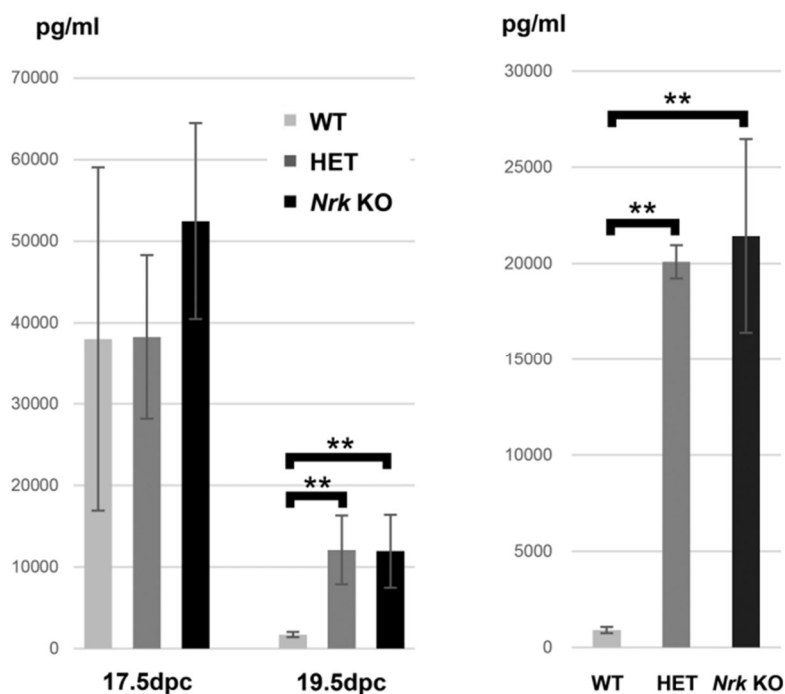
IHC)から Nr<sub>k</sub> は、胎盤スポンジ層だけでなくラビリンス層にも発現し、蛍光免疫染色でラビリンス層の TGC と Syn-T2 で発現していることを同定した。



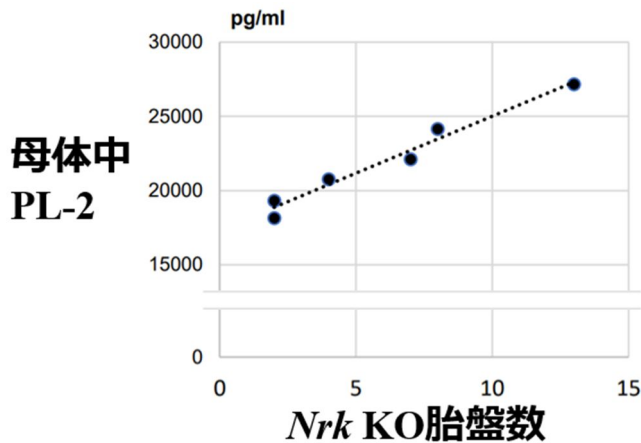


またヒト胎盤の ISH・IHC では、NRK は胎盤絨毛の合胞体栄養膜細胞 (Syn-T) に発現していることが明らかとなった。

分娩遅延の原因を特定するため、妊娠 19.5 日目の P4 の母体血中濃度を測定すると、WT マウスでは 1,711 pg/ml であったが、*Nrk* KO マウスでは 12,081 pg/ml と有意に高かった (Wilcoxon signed-rank test,  $p=0.0080$ )。また、妊娠 17.5 日目の PL-2 の母体血中濃度は WT マウスでは 894 pg/ml であったのに対し、*Nrk* KO マウスでは 21,426 pg/ml と有意に高値であった (Bonferroni multiple comparison test,  $p=0.0018$ )。同日の子宮内の *Nrk* KO 胎盤数と、母体血中の PL-2 濃度は正の相関を持っていた (Pearson's product-moment correlation,  $r=0.984$ ,  $p=0.00035$ )。



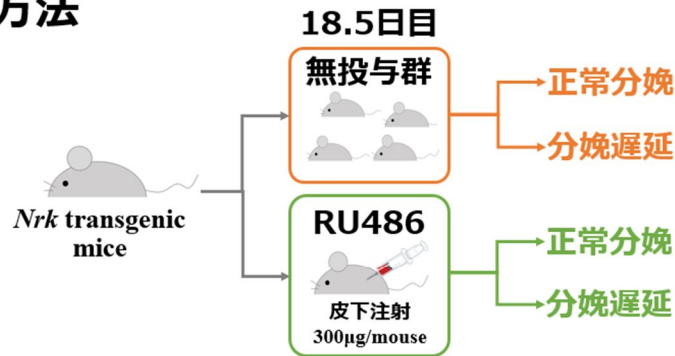
左図：プロゲステロン濃度 右図：PL-2 濃度



子宮内の *Nrk* KO 胎盤数と、母体血中の PL-2 濃度は正の相関を持つ

これらの結果から我々は *Nrk* KO マウスの分娩遅延の原因は妊娠黄体からの P4 の過剰分泌が原因であると考えた。この仮説を検証するため、P4 のアンタゴニストである RU486 を妊娠後期のマウスに投与し、分娩遅延をレスキューする実験を行った。分娩直前の *Nrk* トランスジェニックマウスに対して、1 個体 300 $\mu$ g の RU486 を皮下注射し、無投与群と投与群のマウスの分娩転帰を比較した。その結果、無投与マウスの分娩遅延の割合は約 70% であったのに対し、投与群では 5 例投与中一例も分娩遅延を認めなかった。

### 方法

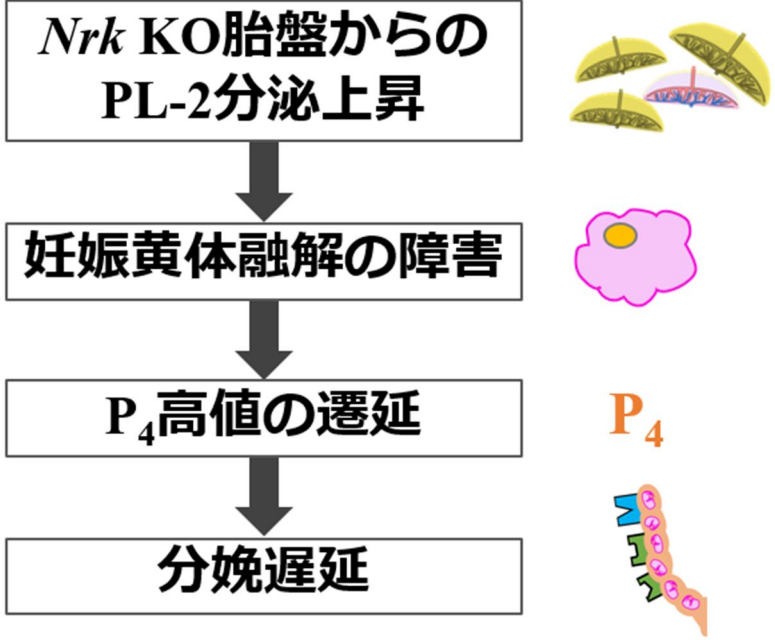


### 結果

	正常分娩	分娩遅延
無投与群	34 (30.9%)	76 (69.1%)
RU486	5 (100%)	0

$p = 0.003751$  Fisher's exact test

以上より、我々は *Nrk* KO マウスの分娩遅延の原因が、胎盤の異常により PL-2 の母体血中濃度が上昇することで、妊娠黄体の融解が障害され、妊娠黄体から P4 が過剰に分泌されることであるという一連の流れを突き止めた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Yomogita H, Miyasaka N, Kanai-Azuma M	4. 巻 10
2. 論文標題 A Review of Delayed Delivery Models and the Analysis Method in Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dev Biol	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jdb10020020	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 Yomogita H, Ito H, Hashimoto K, Kudo A, Fukushima T, Endo T, Hirate Y, Akimoto Y, Komada M, Kanai Y, Miyasaka N, Kanai-Azuma M	4. 巻 69
2. 論文標題 A possible function of Nik-related kinase in the labyrinth layer of delayed delivery mouse placentas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 32-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2022-120	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 -

〔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 蓬田裕、伊藤日加瑠、平手良和、宮坂尚幸、金井正美
2. 発表標題 マウス、ヒト胎盤におけるNr1h3下流遺伝子群と分娩遅延の関連について
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蓬田裕、伊藤日加瑠、平手良和、宮坂尚幸、金井正美
2. 発表標題 マウス・ヒトにおけるNr1h3遺伝子発現の比較検討
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------