

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18650

研究課題名(和文) 妊娠初期における超早産バイオマーカー探索:エクソソーム中胎盤特異的miRNA

研究課題名(英文) Biomarkers of preterm deliveries in the first trimester: exosomal placenta-specific microRNA

研究代表者

高橋 宏典 (Takahashi, Hironori)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：80544303

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)：1. 妊婦血漿から超遠心法でエクソソームを抽出した。CD9が新たな血漿由来エクソソームマーカーになることを見だし、妊娠高血圧腎症では血漿エクソソーム量が増加した。
2. 妊娠糖尿病を発症した例とコントロール5症例の血漿から、サイトカインアレイを施行し、両群間に発現差のみられたサイトカインのうちCXCL5に注目し、CXCL5値をELISA測定(380例)したが、両群間で有意差はみられなかった。
3. 妊娠高血圧症候群において、-hydroxybutyrate (BHB) は、NLRP3インフラマソームの活性化を抑制し、妊娠高血圧症候群や早産の病勢を抑制できる可能性を絨毛細胞株で示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠初期血漿を集積し、その後に発症した妊娠合併症とコントロールを用い、バイオマーカーの探索を行った。血漿中の蛋白だけでなく、エクソソームにも研究範囲を広げ、探索した。今回明らかにした知見の中では妊婦血漿のエクソソームマーカーとして、CD9を用いることが、最も有用であることを示したことは特筆すべき事項である。従来は血漿(血清)中のエクソマーカーとしてはCD9以外を用いているものが多く、これらを再検証する必要性が示唆された。超早産例等のバイオマーカーは見付けるところまで至らず、今後の研究課題である。

研究成果の概要(英文)：1. Exosomes were extracted from pregnant women's plasma using ultracentrifugation. CD63 had been the most common exosome marker of pregnant women; however, it did't express in pregnant women's plasma. Alternatively, CD9 constantly expressed and can be a novel plasma-derived exosome marker. We also showed that exosomes in women with preeclampsia significantly increased.
2. Cytokine arrays were performed using plasmas in patients with gestational diabetes mellitus and their controls. Of those, we focused on CXCL5. we examined plasma CXCL5 levels using ELISA (380 cases). No significant differences between the two groups were noted.
3. -hydroxybutyrate (BHB) inhibits the activation of the NLRP3 inflammasome in women with preeclampsia using trophoblast cells. It can reduce the progression of preterm delivery or preeclampsia.

研究分野：周産期学

キーワード：絨毛膜栄養膜 妊娠高血圧腎症 妊娠糖尿病 バイオマーカー エクソソーム サイトカインアレイ
インフラマソーム

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠 28 週未満の「超早産」では児が未熟なため、新生児死亡や脳性麻痺を生じやすく、超早産の減少が周産期学の最重要課題である。ただ病態は未解明で早産ハイリスク患者の抽出法も未解決である。妊娠初期に早産ハイリスク患者を抽出できることが理想的であるが、これを満たすバイオマーカーは存在しない。妊娠初期には胎盤が形成され、早産例も胎盤形成障害が一因であり、炎症が疾患発症の鍵にもなる。我々は胎盤特異的 microRNA(miRNA) に注目した。第 19 番染色体上の長腕にコードされる 46 種類の miRNA である。これらは胎盤からしか放出されず、胎盤形成にも関与することが既知である。さらに母体血中にこれらの miRNA が妊娠初期から検出される。miRNA は血液などの体液中ではそのほとんどは小型小胞体(50-150nm)のエクソソームに入るので、エクソソームを抽出した後に解析した方が正確に測定できる可能性を有する。早産と同様に胎盤形成障害から発生する妊娠高血圧腎症(preeclampsia: PE)や妊娠糖尿病も同様な研究が検討できる。我々は長年、当院で周産期管理を施行している妊婦の妊娠初期段階の血清および血漿を保存し、1,000 例は超えている。今回、この検体を用い、これら産科重要疾患の病態解明とバイオマーカーの探索をすすめられないかと考えた。

2. 研究の目的

a. 血液由来のエクソソーム中胎盤特異的 miRNA や蛋白は妊娠初期における早産、妊娠高血圧腎症、妊娠糖尿病の新規バイオマーカーになり得るのか、b. これらの分子が胎盤形成(絨毛細胞浸潤)を障害し、上記の疾患の病態形成に関与しているか、を明らかにすることである。

3. 研究の方法

a. 当院で周産期管理を施行した切迫早産で入院管理した妊婦、妊娠高血圧腎症を発症した妊婦、妊娠糖尿病を発症した妊婦、これと週数をマッチさせた疾患を有さない妊婦の血液(血漿、血清)を採取する。同時に妊娠初期検査を行うタイミング(妊娠 10-14 週)で同意取得し、血液(血漿、血清)を採取する。上記の血液検体から以下を抽出する。

- (1) 核酸：キットを用い、RNA を抽出する。
- (2) エクソソーム：超遠心法(They, 2006)を応用し、抽出。BeWo 細胞上清、および妊婦の血漿 2 mL を分画超遠心法(110,000 g で 2 時間超遠心し、さらにその上清を 110,000 g で 70 分間の超遠心を 2 回繰り返す)で精製し回収する。回収物がエクソソームであるか確認するため、ウェスタンブロット法でエクソソーム特異的マーカー(CD63、CD9、および Flotillin-1)が陽性であるかを確認し、その後電子顕微鏡とナノトラッキング法で 50-150 nm の粒子サイズであるかを確認する。
- (3) 蛋白：血漿中の蛋白定量については ELISA 法またはウェスタンブロット法を用いる。細胞、エクソソームについては M-PER で抽出し、ELISA またはウェスタンブロット法で解析する。

b. 血液を利用したバイオマーカー研究：RNA、蛋白、エクソソーム中における miRNA またはターゲットとする蛋白をリアルタイム PCR、ELISA、ウェスタンブロットで発現解析する。疾患 vs. コントロールで発現を比較検討した。網羅的な発現比較はサイトカインアレイや miRNA アレイを施行する。

c. 胎盤絨毛栄養膜を用いた研究

ヒト胎盤絨毛細胞、絨毛栄養膜株 (BeWo、JEG3、HTR8/SVneo) を用い、in vitro 実験を施行する。ターゲットとなる分子の免疫組織染色、ウェスタンブロット、リアルタイム PCR を施行する。胎盤特異的 miRNA をトランスフェクション法で過剰発現または抑制させる。その後、EVT 浸潤能 (スクラッチ法)、増殖能 (蛍光色素)、アポトーシス率 (蛍光色素) を計測する。ターゲットとなる miRNA が見いだせば、強制発現やノックダウンで調整し、上記で記載した機能実験や関連分子の発現を観察する。

4. 研究成果

- a. 妊娠初期血液検体採取：2024 年 3 月までに妊娠初期検体を約 1500 例収集し得た。このうち、周産期予後が明らかになった症例も 1200 例を超えた。
- b. WNT サブタイプの 3A、5A、10B が絨毛細胞の浸潤を促進させることを見いだした。
- c. 妊娠高血圧腎症において S100A9 変化が病態形成の一因と考え、実際に S100A9 発現は同症候群患者の血漿中と胎盤中とでともに増加した。S100A9 は胎盤組織および絨毛細胞において、NLRP3 インフラマソームを活性化させ、IL-1 分泌が増加した (Ozeki A, Takahashi H, et al. J Hypertens. 2022)。
- d. ケトン体の一つ β -hydroxybutyrate (BHB) は、NLRP3 インフラマソームの活性化を抑制し、様々な炎症性疾患を改善するため、BHB が胎盤においても炎症を抑えた結果、妊娠高血圧症候群や早産を食い止める作用があると仮説をたてた。ヒト胎盤絨毛培養において、BHB を添加すると IL-1、IL-6、IL-8 の炎症性サイトカインが抑制され、また、BHB 投与により炎症惹起物質リポポリサッカライド刺激によって増加した IL-1 分泌と成熟型 IL-1 蛋白発現が共に低下した。ヒト絨毛細胞株では、BHB が活性化カスパーゼ-1 発現を低下させ、続いて IL-1 分泌が抑制されることが分かった (Hirata Y, Takahashi H, et al. J Reprod Immunol. 2021)。
- e. 妊娠糖尿病の予知因子研究において血清中サイトカインをターゲットにし、IL-1 が含まれるサイトカインアレイキットを購入した。後に妊娠糖尿病を発症した 5 症例と正常妊娠経過 (コントロール) 5 症例の患者血清を用い、サイトカインアレイ (60 種類) を施行した。結果、両群間に発現差 (2 倍以上) のあるサイトカインは CXCL5、IGFBP-2、Leptin であった。一方、後に妊娠糖尿病を発症した 5 症例と正常妊娠経過 (コントロール) 5 症例の患者血清を用い、グロースファクターアレイ (41 種類) を施行した。

結果、両群間に発現差(2倍以上)のあるグロースファクターは1つも認められなかった。有意差がみられたCXCL5、IGFBP-2、Leptinのうち、最も知見が少なく、未知の分子であった妊娠初期血清中のELISAを用い、380例のCXCL5濃度を測定した。380例中、妊娠糖尿病100例、非妊娠糖尿病280例で構成された。妊娠糖尿病440(四分位範囲371-584) vs. 非妊娠糖尿病405(四分位範囲371-584)で $P=0.515$ と有意差は認められなかった。一方、非妊娠時のBMIが25以上であった103例と25未満の277例の2群間でBMI25以上群447(四分位範囲333-579) vs. BMI25未満群395(四分位範囲302-509)で $P=0.163$ と有意差は認められなかった。続いて妊娠糖尿病の合併症の1つであるHeavy for Date(HFD: 出生体重をもとに90パーセントイル以上児)に着目し、Heavy for Dateの有無でCXCL5に差がないかどうかを検討した。HFD児群(N=49)450(四分位範囲333-578) vs. 非HFD児群(N=330)395(四分位範囲302-530)で $P=0.163$ と妊娠糖尿病で高値の傾向は認められたものの有意差は認められなかった。早産、妊娠高血圧症候群、やせ(BMI<20)の有無においてもCXCL5に有意差を認めなかった。

- f. 分画超遠心法によって精製された回収物(エクソソーム)をウェスタンブロットで確認するとBeWo細胞の由来のエクソソームにおいて、CD63、Flotillin-1、CD9いずれも発現を認めた。一方、ヒト血漿由来のエクソソームはいかなる検体(n=7)においても、従来エクソソームマーカーとして最も知られていたCD63の発現は認めなかった。一方で、Flotillin-1およびCD9の発現は認め、中でもCD9はいずれの検体(n=10)においても強く発現した。このエクソソームのナノトラッキング法で100 nm前後であり、電子顕微鏡の形態を見ても、エクソソームと断定してもよい分子であった。以上のことから、妊婦血漿由来のエクソソームマーカーはCD9が最も信頼できると考えられた。
- g. 正常妊婦(妊娠末期前半[妊娠26~30週]:14例)とEoPE発症妊婦([妊娠25~33週]:14例)、正常妊婦(妊娠末期後半[妊娠35~37週]:26例)とLoPE発症妊婦([妊娠34週~40週]:12例)のヒト血漿中エクソソーム粒子数(中央値 particles/mL [四分位])をELISAによるCD9で比較すると、正常妊婦に比べEoPE発症妊婦(4.3×10^{11} [2.4×10^{11} - 5.2×10^{11}])とLoPE発症妊婦(2.3×10^{11} [1.6×10^{11} - 3.4×10^{11}])では有意に高値(それぞれ $p=0.0005$, 0.049)であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aya Ozeki, Yuka Ogaki, Yuka Henmi, Tadayoshi Karasawa, Masafumi Takahashi, Hironori Takahashi, Akihide Ohkuchi, Komei Shinasuna	4. 巻 40
2. 論文標題 Elevated S100A9 in preeclampsia induces soluble endoglin and IL-1 secretion and hypertension via the NLRP3 inflammasome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 84-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/HJH.0000000000002981	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 Yoshiki Hirata, Sayaka Shimazaki, Sae Suzuki, Yuka Henmi, Hiromu Komiyama, Takehito Kuwayama, Hisataka Iwata, Tadayoshi Kurasawa, Masafumi Takahashi, Hironori Takahashi, Komei Shirasuna	4. 巻 148
2. 論文標題 -hydroxybutyrate suppresses NLRP3 inflammasome-mediated placental inflammation and lipopolysaccharide-induced fetal absorption	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2021.103433	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 Ogoyama Manabu, Ohkuchi Akihide, Takahashi Hironori, Zhao Dongwei, Matsubara Shigeki, Takizawa Toshihiro	4. 巻 22
2. 論文標題 LncRNA H19-Derived miR-675-5p Accelerates the Invasion of Extravillous Trophoblast Cells by Inhibiting GATA2 and Subsequently Activating Matrix Metalloproteinases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1237-1237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22031237	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 -
1. 著者名 Takahashi H, Ogoyama M, Nagayama S, Suzuki H, Ohkuchi A, Matsubara S, Takizawa T	4. 巻 34
2. 論文標題 Extravillous trophoblast invasion accelerated by WNT3A, 5A, and 10B via CD44	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine	6. 最初と最後の頁 3377-3385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14767058.2019.1684891.	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hironori Takahashi
2. 発表標題 The regulatory mechanism of extravillous trophoblast invasion through microRNAs
3. 学会等名 アジア生殖免疫学会 (Asian congress for reproductive immunology) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小古山学、大口昭英、高橋宏典、松原茂樹、瀧澤俊広
2. 発表標題 miR-675-5pは複数のmatrix metalloproteinaseの発現を上昇させ絨毛外栄養膜細胞の浸潤を促進する
3. 学会等名 第35回日本生殖免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成見莉紗、鈴木寛正、小古山学、堀江健司、高橋佳代、大口昭英、高橋宏典、藤原寛行
2. 発表標題 血中のエクソソーム濃度：正常妊婦の週数別推移と妊娠高血圧腎症妊婦との比較
3. 学会等名 第31回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

コロナ禍に入り研究に時間を要した。結果が上手くでなかったことから、一部研究内容を変更した。

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
連携研究者	白砂 孔明 (Shirasuna Komei) (20552780)	東京農業大学・農学部・教授 (32658)	

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2件

国際研究集会 アジア生殖免疫学会(Asian congress for reproductive immunology)	開催年 2023年～2023年
国際研究集会 14th Philadelphia Prenatal Diagnosis Conference (online)	開催年 2022年～2022年

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