

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592115

研究課題名（和文） 莢膜細胞特異的マイクロ RNA の機能解析：卵胞の転写後調節と PCOS での役割解明

研究課題名（英文） Profiling and functional analyses of microRNAs in ovarian theca cells

研究代表者

瀧澤 敬美（TAKIZAWA TAKAMI）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40386157

研究成果の概要（和文）：卵胞莢膜細胞の microRNA (miRNA) の発現と機能を解析する目的で、マウス莢膜幹細胞および分化誘導した莢膜細胞について、miRNA の発現量を比較解析しました。分化後に発現が上昇した 30 個の miRNA と、減少した 9 個の miRNA を見出しました。パスウェイ解析から、これらの miRNA は、遺伝子疾患、生殖系疾患、発生、増殖、細胞周期等に関与する可能性が示唆されました。また、miRNA を用いた診断ツール開発のための基盤解析として、多嚢胞性卵巣症候群症例の miRNA 解析を行いました。

研究成果の概要（英文）：We performed miRNA profiling of isolated mouse thecal stem cells from neonatal mouse ovary and in vitro differentiating theca cells. We investigated differential miRNA signatures between thecal stem cells and differentiating cells by real-time PCR-based miRNA array analysis. During theca cell differentiation, 30 miRNAs were upregulated, and 9 miRNAs were downregulated. Ingenuity pathway analysis indicates that these miRNAs participate in reproductive system disease, genetic disorder, cellular development, cellular growth and proliferation, and cell cycles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科学、卵巣、卵胞、莢膜細胞、多嚢胞性卵巣症候群、microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

卵胞は卵細胞が分化・成熟する際の機能単位であり、卵胞が成長するのにともない最外層には莢膜が形成され、機能単位の構造維持と、エストロゲンの原料となるテストステロンを合成して内層の顆粒膜細胞に供給するという“卵胞成熟”に重要な役割を果たしています。しかし、莢膜細胞の分化・成長、ホルモン合成の調節の詳細な仕組みについては不明のままです。

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は、生殖年齢の女性でしばしば診られる内分泌機能障害であ

り、月経異常や不妊の主要な原因の1つであり、近年、メタボリックシンドロームの一つの表現型としても注目されています。PCOS は複雑かつ多様な病態を呈するため、よりの確な診断・治療、不妊に対する治療も決め手がなく、その分子病態の解明が望まれています。PCOS は性ホルモン合成経路の異常が指摘されており、特に、PCOS の病理所見で認められる莢膜細胞層の肥厚・増殖に伴うアンドロゲンのシグナル異常は、病態に大きく関与していることが示唆されていますが(Lancet 370: 685-697, 2007)、未だにその詳

細は不明のままです。

近年、22塩基ほどの1本鎖RNAより成るmicroRNA(miRNA)は、細胞内でRNA誘導サイレンシング複合体を構成しているAGO2分子に装填され、標的mRNAの3'非翻訳領域(3'-UTR)の相補的な配列と結合し、転写後の遺伝子発現を調節する(抑制する)“機能性RNA分子”として注目されています。現在までに2000種類近いヒトmiRNAが報告され、組織特異的な発現様式を示し、組織の分化・機能と形態の維持に重要な役割を果たしていることが示唆されています(Dev Cell 11: 441-450, 2006)。しかし、卵巣に特異的に発現しているmiRNAと、その機能は、ほとんど解明されていませんでした。平成17-18年度萌芽研究「精巣形成過程における生殖細胞に特異的なマイクロRNAの同定と発現解析」の助成をいただき、miRNA発現に関する研究を進め、マウス精巣と卵巣の詳細なmiRNAの発現プロファイルを明らかにすることに成功しました(Mishima, Takizawa et al. *Reproduction* 136:811-822, 2008)。そこで、miRNAが卵巣莖膜細胞の機能制御を通して、卵巣成熟と排卵の調節の仕組みにどのように関わるのか、分子レベルでの機能解明を目指すとともに、miRNAの切り口からPCOSの分子病態の解析と診断を指向した新規バイオマーカーの検索を行いたいと計画しました。

## 2. 研究の目的

我々が開発したmiRNA解析技術を用いて、卵巣莖膜細胞に特異的なmiRNAの機能解析と、莖膜幹細胞からの培養系を用いた、莖膜細胞におけるアンドロゲン合成経路および細胞分化におけるmiRNAの機能解析を行いました。さらに、PCOSにおけるmiRNAの発現プロファイルを明らかにし、バイオインフォマティクス解析による病態との関連解析とPCOSの新規バイオマーカーとしての検討を行いました。

## 3. 研究の方法

(1) 莖膜幹細胞からの莖膜細胞への分化に伴うmiRNAの発現プロファイル解析を行いました。

- ① マウス新生仔卵巣より細胞を解離して、莖膜幹細胞を分離培養しました。分離培養した莖膜幹細胞をステロイド産生細胞(莖膜細胞)へ分化培養しました。
- ② miRNAのプロファイル解析: 7900HT Fast Real-time PCR システム(Applied Biosystems 社)を用いて real-time PCR アレイ解析(TaqMan Array MicroRNA Cards 等)を行い、網羅的定量的発現プロファイル解析を行いました。
- ③ 得られた結果について、バイオインフォマティクス解析し、莖膜細胞分化に特徴的なmiRNA発現様式を解析しました。
- ④ マイクロアレイ解析(Agilent 社 G2565CA DNA マイクロアレイスキャナ)を併せ計画し、

③のmiRNAプロファイルの結果と比較解析することを進めました。

(2) miRNAを用いた診断ツール開発のための基盤解析としてPCOS症例のmiRNA解析を行いました。

- ① 若年性子宮体癌(PCOSは子宮体癌のリスク因子)の中でPCOSまたはPCO-likeの診断を受けた手術症例、子宮体癌および子宮頸癌の中から正常卵巣の手術症例を選択し、その卵巣パラフィン包埋病理標本(6~10症例)を用いました。
- ② レーザーマイクロダイセクション(ライカ社 LMD6000)にて切片から病変部位(莖膜細胞層)を回収し、RNAを抽出しました。
- ③ 定量的なmiRNA-mRNAの連動した網羅的解析を行うために、7900HT Fast Real-time PCR システム、高分解能マイクロアレイスキャナを用いて、各症例に関して、miRNAおよびmRNAのマイクロアレイ解析の準備を進めました。

## 4. 研究成果

(1) 莖膜細胞のmiRNA発現プロファイル解析  
理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室・小倉淳郎室長の協力を得て、マウス新生仔卵巣より莖膜幹細胞の分離および培養に成功しました(図1)。

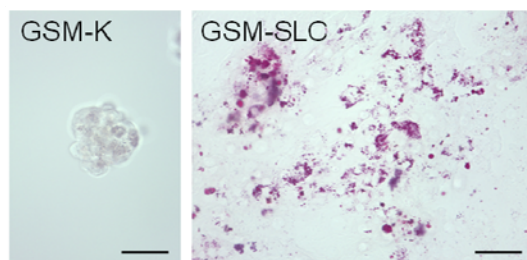
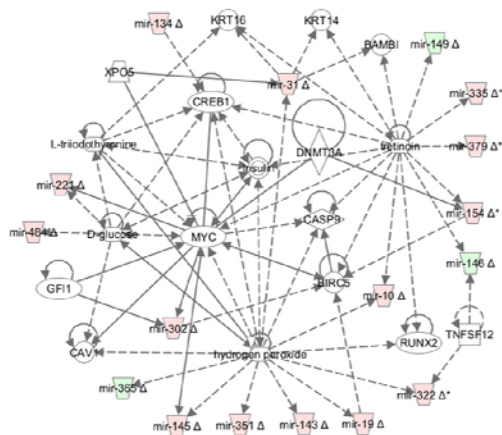


図1 Oil Red O staining. Bars 50µm

莖膜の分化に関与すると考えられる4種類の条件下[1. GSM(Germline Stem cell Medium)-K(無血清培地)、2. GSM-S(血清培地)、3. GSM-SL(血清培地+LH)、4. GSM-SLC(血清培地+LH+顆粒膜細胞のコンディション培地)]で培養し、莖膜幹細胞からの莖膜細胞への分化に伴う634種類のmiRNAに関して、網羅的かつ定量的発現プロファイル解析を進めました。莖膜幹細胞の純度と分化段階は、PCRおよびOil Red 染色による形態観察によって検証しました。miRNAアレイ解析により、莖膜幹細胞と分化後の細胞のmiRNA発現量を比較し、分化後に発現が上昇した30個のmiRNA(miR-302bなど)と、減少した9個のmiRNA(miR-149など)を見出しました。さらに、パスウェイ解析(Ingenuity Pathways Analysis)か、これらのmiRNAは、遺伝子疾患、生殖系疾患、発生、増殖、細胞周期等に関与を示唆する新知見を得ました(図2;投稿準備中)。



**図2 バスウェイ解析**  
**Genetic Disorder**  
**Skeletal and Muscular Disorders**  
**Reproductive System Disease**

今後、遺伝子発現解析を加え、今回行った miRNA プロファイリングと合わせて、莖膜幹細胞の分化や、莖膜細胞が関与する卵胞発達、排卵、初期妊娠維持などの機能における miRNA の役割を明らかにしていきたい。

#### (2) PCOS 症例の miRNA 解析

レーザーマイクロダイセクション法により回収したサンプルから、微量の RNA 抽出およびその濃度測定を正確に行うことは miRNA の定量発現解析には不可欠であり、技術開発が必要となりました。パラフィン包埋標本を用いて詳細な条件検討を行いました。この検討により、少量の切片回収量であっても、RNA 抽出前処理として行う proteinase K 処理を、振盪しながら 12 時間行うことにより、安定して miRNA 発現を検出することが可能であること、また、RNA 抽出用試薬の RNA 含有層(水相)へのコンタミを最小に抑えることが重要であることを見出し、サンプル調整のプロトコル開発に成功しました。(投稿準備中)。

さらに、手術症例のパラフィン包埋卵巣ブロック標本から、切片を作製し、H&E 染色した後、デジタル画像化し、莖膜の形態解析を行いました。この形態解析により莖膜細胞層を確認し、十分にレーザーマイクロダイセクションで回収可能であることが明らかとなりました。卵巣莖膜細胞の miRNA 発現プロファイル解析を行うために、レーザーマイクロダイセクション法により卵巣組織標本切片から莖膜細胞層を回収し、開発したプロトコルを用いて RNA を抽出し、プロファイル解析を継続して行っていますが、miRNA が PCOS の分子病態の診断のための新規バイオマーカーとなりうるか、臨床解析は課題として残されました。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

- (1) Mase Y, Ishibashi O, Ishikawa T, Takizawa Ta, Kiguchi K, Ohba T, Katabuchi H, Takeshita T, Takizawa To. *Mir-21* is enriched in the RNA-induced silencing complex and targets *COL4A1* in human granulosa cell lines. *Reprod Sci* (in press) 査読有  
DOI: 10.1177/1933719112442245
- (2) Takizawa Ta, Ishikawa T, Kosuge T, Mizuguchi Y, Sato Y, Koji T, Araki Y, Takizawa To. Gene suppression of mouse testis in vivo using small interfering RNA derived from plasmid vectors. *Acta Histochem Cytochem* 45:77-81, 2011. 査読有  
DOI: 10.1267/ahc.11024
- (3) Takizawa To, Gemma A, Ui-Tei K, Aizawa Y, Sadovsky Y, Robinson JM, Seike M, Miyake K. Basic and Clinical studies on functional RNA molecules for advanced medical technologies. *J Nippon Med Sch.* 76:71-79, 2010. 査読有  
DOI: 10.1272/jnms.77.71
- (4) 石橋 幸, 間瀬 有里, 瀧澤 敬美, 米山 剛一, 朝倉 啓文, 松原 茂樹, 竹下 俊行, 瀧澤 俊広. マイクロRNA 2.女性生殖器(子宮・卵巣)におけるマイクロRNA. 産婦人科の実際 59: 1551-1555, 2010. 査読無

[学会発表](計 10 件)

1. 石川 朋子, 本多 新, 廣瀬 美智子, 瀧澤 敬美, 小倉 淳郎, 竹下 俊行, 瀧澤 俊広. マウス卵巣莖膜幹細胞のマイクロRNA解析(第1報):プロファイル解析. 第26回日本生殖免疫学会総会・学術集会 2011年12月2日 愛知
2. 瀧澤 俊広, 石橋 幸, 菊池 邦生, アリモハメド, 石川 朋子, 瀧澤 敬美, 大口 昭英, 松原 茂樹, 竹下 俊行. 胎盤特異的microRNA. 56回日本人類遺伝学会 2011年11月10日 千葉県
3. 軸 蘭 智 雄, 村 瀬 幸 宏, 渡 会 泰 彦, 石 橋 幸, 川 本 雅 司, 土 屋 眞 一, 清 水 一 雄, 瀧 澤 俊 広. LMDによるパラフィン標本を用いた甲状腺腫瘍microRNA解析のための条件検討. 第50回日本臨床細胞学会秋期大会 2011年10月23日 東京
4. 瀧澤 俊広, アリ ハメド, 羅 善 順, 石 橋 幸, 菊 池 邦 生, 石 川 朋 子, 瀧 澤 敬 美, 倉 品 隆 平, 右 田 真, 大 口 昭 英, 松 原 茂 樹, 竹 下 俊 行. 胎盤由来のエクソソーム:胎盤特異的microRNAはエクソソームを介して母体循環に分泌される. 第84回日本生化学会大会 2011年9月22日 京都
5. 軸 蘭 智 雄, 石 橋 幸, 川 本 雅 司, 天 神 敏 博, 土 屋 眞 一, 清 水 一 雄, 瀧 澤 俊 広. ホルマリン固定パラフィン標本からのmicroRNA抽

- 出条件の検討. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会 2011 年 6 月 25 日 京都
6. 瀧澤俊広, 倉品隆平, 石橋宰, 軸園智雄, 石川源, 竹下俊行. レーザーマイクロダイセクション法によるヒト胎盤絨毛組織におけるmicroRNA発現解析. 第 98 回日本解剖学会関東支部学術集会 2010 年 10 月 16 日 東京
  7. 倉品隆平, 軸園智雄, 石川朋子, 間瀬-吉田有里, 菊池邦生, 石橋宰, 石川源, 後藤忠, 竹下俊行, 瀧澤俊広. Laser Micro Dissection法を用いたヒト胎盤特異的miRNAの定量的局在解析. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会 2010 年 4 月 24 日 東京
  8. 瀧澤俊広, 石橋宰, 羅善順, 石川源, 石川朋子, 三嶋拓也, 瀧澤敬美, 後藤忠, 泉章夫, 大口昭英, 松原茂樹, 竹下俊行. 胎盤特異的microRNAは絨毛栄養膜由来でありエクソゾームを介して母体血液中に放出される. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月 28 日 岩手
  9. 瀧澤敬美, 石川朋子, 石橋宰, 後藤忠, 佐藤陽子, 小路武彦, 荒木慶彦, 瀧澤俊広. Short hairpin RNA発現ベクターを用いた生殖細胞に特異的なGPI蛋白分子、TEX101 のノックダウン解析. 第 24 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 2009 年 11 月 27 日 東京
  10. 瀧澤敬美, 石川朋子, 石橋宰, 後藤忠, 佐藤陽子, 小路武彦, 荒木慶彦, 瀧澤俊広. 生殖細胞に発現しているTex101 に関するin vivoノックダウン解析の試み. 第 50 回日本組織細胞化学会 2009 年 9 月 27 日 滋賀

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

瀧澤 敬美(TAKIZAWA TAKAMI)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号:40386157

### (2)研究分担者

石橋 宰(ISHIBASHI OSAMU)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号:70293214

竹下 俊行(TAKESHITA TOSHIYUKI)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号:60188175

瀧澤 俊広(TAKIZAWA TOSHIHIRO)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号:90271220

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: