

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 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791553

研究課題名（和文） 胎盤におけるマイクロ RNA 発現メカニズムと機能解析：IUGR の新しい分子基盤研究

研究課題名（英文） Expression and functional analysis of miRNAs in human placenta: molecular and cellular research of IUGR

研究代表者

菊池 邦生 (KIKUCHI KUNIO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70374676

研究成果の概要（和文）：ヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA 遺伝子はその上流域にある DNA メチル化サイトのメチレーションと相関しており、胎盤栄養膜の部位特異的なヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA 発現のエピジェネティック制御が示唆された。そのうちの一つの miRNA がカルシニューリンを標的とすることを見出した。この結果は、ヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA による新たな転写後翻訳調節機構の解明につながる可以看到。

研究成果の概要（英文）：The microRNAs (miRNAs) derived from the chromosome 19 miRNA cluster (C19MC) are exclusively expressed in the human placenta. The C19MC miRNAs examined in this study were predominantly expressed in villous trophoblast. Furthermore, we revealed that protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha (PPP3R1), was a one of C19MC target using an in vitro experimental validation system. These data suggest that C19MC miRNAs is involved in the fine tuning of the Ca²⁺/calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) pathway in the villous trophoblast of the human placenta.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：産科学

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノムプロジェクトおよび転写産物解析からゲノムの多くの領域は転写されており、驚くべきことに、その多くは特定のタンパク質をコードしないノンコーディング RNA であり、進化の程度が高い生物ほどゲノムに占めるノンコーディング領域が大きいことが明らかになり、大変注目を集めている。その一つである microRNA (miRNA, miR)

は 1 本鎖の 22 塩基程度の低分子 RNA で、その機能は相補的な mRNA の 3' 翻訳領域と結合し翻訳抑制に働くことが報告されている。miRNA は、発生・分化、癌の発生・増殖への関与の他、組織(臓器)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おり、疾患において miRNA の役割の解明は重要な課題であり、しのぎを削り世界で研究が行われ

ている。

研究代表者は、RNA の構造機能相関や細胞内での発現メカニズムや機能解析などの RNA 機能の分子基盤についてこれまでに研究を行ってきた。所属する教室では、胎盤に発現している miRNA 遺伝子を大規模にクローニング解析し、胎盤栄養膜に特異的な miRNA を明らかにした (*Biol Reprod* 2009:81, 717-729)。特に、染色体 19 番 q13.41 の領域にある miRNA 遺伝子クラスターから発現する多数の miRNA (C19MC miRNA) を同定している。さらにこの領域の miRNA (miR-517 等) が exosome と呼ばれる微粒子に包まれて血液中に放出され、分娩後に速やかに代謝されることも明らかにしている。その機能は現時点では明らかではないが、妊娠期における胎盤および母体・胎児に重要な役割を担っていると考えられている。

そこで、これまでの RNA の分子生物学的経験を生かし、胎盤特異的 miRNA の機能解析を開始し、その予備実験として、上記で見出されたうちの一つの miRNA をヒト胎盤絨毛癌由来の細胞株 BeWo などの培養細胞に過剰発現させたところ、配列特異的にアポトーシスを誘起するという新知見をつかんだ。このことは胎盤での C19MC miRNA が胎盤栄養膜の成熟、妊娠の生理的終結、胎盤不全による異常妊娠などに重要な役割を担っていることを示唆する結果なのではないかと考えた。子宮内胎児発育遅延 (Intrauterine growth restriction: IUGR) では、子宮内での胎児の発育の遅れあるいは停止により、体格が本来よりも小さくなる。その原因の一つとして胎盤不全が考えられています。申請者は、IUGR が C19MC miRNA の分子機能と関連があるのではないかと考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

研究の最終的な目的は、正常妊娠における胎盤特異的 miRNA の役割の解明と、miRNA と IUGR との関連を明らかにすることだった。本研究で注目している C19MC miRNA 遺伝子は種間保存性が低く、ヒト胎盤に特異的な機能を果たしていると予想された。またクラスター miRNA 間の一次配列の相同性は極めて高いものの、翻訳抑制に重要な配列は異なっており、mRNA 転写後の miRNA による厳密な翻訳制御を明らかにできることも本研究の大きな特徴だった。

研究代表者は、これまでに、間葉系幹細胞が分化する際に発現変動する RNA 遺伝子について DNA アレイを用いた網羅的解析を行い、新規ノンコーディング遺伝子の 6 遺伝子を発見し、そのシグナル伝達経路を明らかにした (*Nucleic Acids Res* 2009: 37, 4987-5000)。また、RNA 分子の構造機能相関についての実

績を積んできた (*Biochem Biophys Res Commun* 2009: 386, 118-123, *Nucleic Acids Res* 2005: 33, 683-692)。以上より、細胞内での RNA の機能解析に関する知識と技術を本研究に十分駆使できると考えた。

IUGR の原因の一つとして胎盤の成熟不全が考えられている。本研究によって、胎盤栄養膜由来 miRNA の過剰な発現が胎盤自身の成熟を抑制することが原因となるのではないかと考えた。また、この miRNA は exosome を介して血液中に放出されているため、IUGR の新規マーカーとなる可能性を秘めている。さらに、miRNA 遺伝子の発現制御やシグナル伝達経路を明らかにすることにより、その機能の抑制による新しい周産期治療のための基礎研究として期待された。

3. 研究の方法

ヒト胎盤栄養膜において特異的に発現している microRNA (miRNA) 遺伝子の分子機能および発現制御の解析を主に分子細胞生物学の手法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) ヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA の発現制御解析: ヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA 遺伝子の上流域には DNA のメチル化サイトが存在する。そこで、この miRNA 遺伝子を発現していない細胞 (HeLa など) に DNA 脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine を添加し、RNA を回収してリアルタイム PCR を行ったところ、C19MC miRNA クラスター遺伝子の発現の上昇が確認され、胎盤栄養膜特異的 miRNA の発現が DNA のメチル化によって制御を受けていることが分かった。さらに、ヒト胎盤絨毛癌由来の細胞株 BeWo、JEG3、ヒト胎盤由来の絨毛外栄養膜細胞の細胞株 HTR8/SVneo および HChEpC1b 細胞、子宮頸がん由来 HeLa 細胞から DNA を単離し、Bisulfite sequencing 法によって、メチル化状態を解析した。ヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA 遺伝子が発現していた胎盤組織、BeWo 細胞、JEG3 細胞では、脱メチル化状態にあったが、発現していない HTR8/SVneo 細胞、HChEpC1b 細胞、HeLa 細胞ではメチル化状態だった。したがって、胎盤栄養膜の部位特異的なヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA 発現のエピジェネティック制御が示唆された。

(3) ヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA によるアポトーシス誘導に関連する標的 mRNA の同定とシグナル伝達解析: これまでにヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA を絨毛栄養膜細胞株 BeWo 細胞に過剰発現させると、ミトコンドリアを介したアポトーシスの誘起を見出したが、実験が安定せず、実験条件の再検討を行った。

BeWo 細胞の過剰発現実験から見出された他の標的 mRNA 候補の解析を進め、ルシフェラーゼを用いた 3'-UTR レポーター解析から、ヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA がカルシニューリンを標的とすることを見出した。このことは、ヒト胎盤栄養膜特異的 miRNA による新たな転写後翻訳調節機構の解明につながる結果を得た。

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 3 件)

1. Eriko Shinozuka, Masao Miyashita, Yoshiaki Mizuguchi, Ichiro Akagi, Kunio Kikuchi, Hiroshi Makino, Takeshi Matsutani, Nobutoshi Hagiwara, Tsutomu Nomura, Eiji Uchida, Toshihiro Takizawa. SnoN/SKIL modulates proliferation through control of hsa-miR-720 transcription in esophageal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 430(1), p101-106. 査読有
Doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.005.
2. Tomoya Ito, So Tsuruta, Koki Tomita, Kunio Kikuchi, Takehide Yokoi, Yasunori Aizawa. Genes that integrate multiple adipogenic signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 409(4), p786-791. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.089.
3. Ichiro Akagi, Masao Miyashita, Osamu Ishibashi, Takuya Mishima, Kunio Kikuchi, Hiroshi Makino, Tsutomu Nomura, Nobutoshi Hagiwara, Eiji Uchida, Toshihiro Takizawa. Relationship between altered expression levels of MIR21, MIR143, MIR145, and MIR205 and clinicopathologic features of esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus*, 2011, 24(7), p523-530. 査読有
DOI: 10.1111/j.1442-2050.2011.01177.x

[学会発表] (計 15 件)

1. 菊池邦生, アリモハメド, 岩城隼, 吉武洋, 瀧澤敬美, 石川源, 松原茂樹, 竹下俊行, 瀧澤俊広
microRNA の網羅的解析手法と生殖免疫学

分野での応用.

- 第 27 回日本生殖免疫学会総会・学術集会
2012 年 12 月 9 日 大阪府大阪市
2. 高橋宏典, 菊池邦生, 大口昭英, 薄井里英, 桑田知之, 松本久宣, 佐藤幸保, 藤原浩, 松原茂樹, 鈴木光明, 瀧澤俊広
絨毛外栄養膜における接着分子 CD44: 浸潤能の検討
第 27 回日本生殖免疫学会総会・学術集会、
2012 年 12 月 9 日 大阪府大阪市
3. Kunio Kikuchi, Guangjin Qu, Hironori Takahashi, Tomoyuki Kuwata, Rie Usui, Akihide Ohkuchi, Shan-shun Luo, Shigeki Matsubara, Mitsuaki Suzuki, Toshihiro Takizawa
Methylation profile of C19MC-miRNA CpG island in trophoblast cell lines.
IFPA 2012 Hiroshima Meeting, 2012 年 9 月 20 日 広島県広島市
4. Md. Moksed Ali, Takami Takizawa, Kunio Kikuchi, Shigeru Saito, Toshihiro Takizawa
BeWo-cell-derived miR-517a modulates the expression of PRKG1 in Jurkat cells via Exosomes.
IFPA 2012 Hiroshima Meeting, 2012 年 9 月 18 日 広島県広島市
5. Saori Kambe, Yoichi Ishida, Kunio Kikuchi, Hiroshi Yoshitake, Akihide Okuchi, Shigeki Matsubara, Mitsuaki Suzuki, Shigeru Saito, Toshiyuki Takeshita, Toshihiro Takizawa
Circulating placenta-specific miRNAs are delivered to maternal immune cells during pregnancy.
IFPA 2012 Hiroshima Meeting, 2012 年 9 月 18 日 広島県広島市
6. Hironori Takahashi, Kunio Kikuchi, Tomoyuki Kuwata, Rie Usui, Akihide Ohkuchi, Hisanori Matsumoto, Yukiyasu Sato, Hiroshi Fujiwara, Kumiko Ui-Tei, Shigeki Matsubara, Mitsuaki Suzuki, Toshihiro Takizawa
CD44 accelerates trophoblastic invasion: in vitro invasion analysis using HTR8/SVneo cells.
IFPA 2012 Hiroshima Meeting, 2012 年 9 月 20 日 広島県広島市
7. 軸藺智雄, 川本 雅司, 赤須東樹, 廣川満良, 菊池邦生, 宮内昭, 土屋眞一, 瀧澤俊広, 清水一雄
甲状腺微小浸潤型濾胞癌の術後遠隔転移を予測するためのバイオマーカーの開発: miR-221/222 は有用な予測因子である
第 24 回日本内分泌外科学会総会、2012 年 6 月 9 日 愛知県名古屋市

8. 篠塚恵理子, 宮下正夫, 水口義昭, 赤城一郎, 菊池邦生, 萩原 信敏, 松谷毅, 牧野浩司, 野村務, 瀧澤俊広, 内田英二
食道扁平上皮癌における miRNA 発現と臨床病理学的意義の検討
第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 13 日千葉県幕張市
9. 高橋宏典, 菊池邦生, 竹下俊行, 松原茂樹, 鈴木光明, 瀧澤俊広
胎盤栄養膜における接着因子 CD44 の浸潤能と発現制御機構の解析
第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会、2012 年 4 月 15 日兵庫県神戸市
10. 神戸沙織, 石田洋一, 菊池邦生, 大口昭英, 松原茂樹, 鈴木光明, 竹下俊行, 瀧澤俊広
胎盤由来のマイクロ RNA は妊娠期間中エクソソームを介して母体血球細胞に取り込まれている
第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会、2012 年 4 月 13 日 兵庫県神戸市
11. 高橋宏典, 菊池邦生, 松原茂樹, 鈴木光明, 瀧澤俊広
絨毛外栄養膜細胞に発現している CD44 の機能解析: HTR8/SVneo を用いた浸潤能の検討
第 26 回日本生殖免疫学会総会・学術集会、2011 年 12 月 2 日愛知県名古屋市
12. アリモハメド, 菊池邦生, 石橋幸, 石川朋子, 瀧澤敬美, 竹下俊行, 瀧澤俊広
エクソソーム microRNA を介した胎盤-リンパ球間コミュニケーション: 培養細胞を用いたモデル解析
第 26 回日本生殖免疫学会総会・学術集会、2011 年 12 月 2 日愛知県名古屋市
13. 高橋宏典, 菊池邦生, 松原茂樹, 鈴木光明, 瀧澤俊広
栄養膜浸潤における接着分子 CD44 の役割: 浸潤能解析
第 19 回 日本胎盤学会学術集会、2011 年 9 月 30 日、東京都
14. 菊池邦生, アリモハメド, 羅善順, 石橋幸, 石川朋子, 瀧澤敬美, 倉品隆平, 石川源, 右田真, 大口昭英, 松原茂樹, 竹下俊行, 瀧澤俊広
胎盤由来エクソソームを介した胎盤-母体間コミュニケーション
第 19 回 日本胎盤学会学術集会、2011 年 9 月 30 日、東京都
15. Toshihiro Takizawa, Md. Moksed Ali, Osamu Ishibashi, Kunio Kikuchi, Takuji Kosuge, Shigeki Matsubara, Toshiyuki Takeshita.
Placenta specific-microRNAs in normal pregnancy and preeclampsia.
8th European Congress on Reproductive Immunology, 2011 年 11 月 13 日、ミュン

ヘン (ドイツ)

[図書] (計 1 件)

1. 菊池邦生、石橋幸、竹下俊行、瀧澤俊広、臨床婦人科産科、査読無、65 巻、2011 年、254-259
6. 研究組織
(1) 研究代表者
菊池 邦生 (KIKUCHI KUNIO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70374676