

## 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 5 月 29 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：22791554

研究課題名（和文）胎盤特異的マイクロRNAによる新たなT細胞制御の仕組み解明への挑戦

研究課題名（英文）Study of regulation of maternal T cell function[s] by placenta specific microRNAs

研究代表者

アリ モハメド (ARI MOHAMEDO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：50573226

研究成果の概要（和文）：栄養膜由来の胎盤特異的 microRNA（マイクロ RNA：miRNA）が、エクソゾームを介した栄養膜-免疫細胞クロストークにより、T 細胞など母体免疫細胞で母児免疫寛容などの妊娠維持にどのように関与するのか検討を行った。培養細胞及び末梢血を用いた解析から、胎盤特異的 miRNA が免疫細胞に取り込まれ遺伝子を制御していることを示唆する新知見を得た。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that circulating placenta-specific miRNAs could be delivered to maternal lymphocytes via exosomes and could be functional in the recipient cells. We tested this hypothesis using an *in vitro* model system; the human trophoblast cell line BeWo and T cell lymphoblast-like cell line Jurkat. We demonstrated the miRNAs present in BeWo-exosomes to be capable of modulating gene expression in Jurkat cells using in the *in vitro* model system. We provide a new insight into cell-cell communication via exosomes between placenta and lymphocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
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、妊娠、マイクロ RNA、免疫細胞

### 1. 研究開始当初の背景

私は、miRNA を含んだエクソゾームに興味を持ち、胎盤特異的 miRNA が母体にどのような影響を与えるのか予備実験を開始しました。まず、胎盤特異的 miRNA を培養血管内皮細胞に添加し、マイクロアレイ解析（約 4 万の mRNA）を試みました。驚くことに、千個以上の mRNA の抑制が示され、その中には免疫

系制御に関わる遺伝子も含まれていました。このことは、胎盤特異的 miRNA が、他の細胞（母体内の細胞）でも機能することを示唆しており、今までにない、興味深い所見をつかみました。

今回、「栄養膜（直接母体血液に接している胎盤絨毛組織表面の栄養膜合体と、子宮内膜に浸潤していく先端部分の絨毛外栄養

膜細胞)からエクソゾームを介して放出される胎盤特異的のmiRNAは、妊娠維持の鍵となる免疫寛容の細胞間クロストークに關与しているのではないかと、また、胎盤特異的のmiRNAは、寛容機構破綻をきたす周産期疾患(流産等)におけるクロストーク細胞に影響を与えているのではないかと仮説を立て、今回本研究を申請しました。

## 2. 研究の目的

(1) エクソゾームを介した胎盤特異的のmiRNAがT細胞などの免疫細胞で機能(転写後遺伝子発現調節)するのか(miRNAを介した栄養膜-T細胞クロストーク)、分子生物学的手法を用いて明らかにする。

(2) さらに、妊娠において、このクロストークにより取り込まれた制御性T細胞中の胎盤特異的のmiRNAの定量解析を行い、Th & NKバランスにおける胎盤特異的のmiRNAの關与を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 基礎解析: 栄養膜由来の胎盤特異的のmiRNAを含んだエクソゾームがT細胞などの免疫細胞に取り込まれ、機能するのか、また、免疫寛容のシグナルカスケードと關連するのか解析を行いました。

- ① *miR-1*および胎盤特異的のmiRNA(*miR-517a*等)のPre-miRNA Precursor (Applied Biosystem社)を栄養膜細胞株(BeWo細胞)に添加して培養し、エクソゾームに目的のmiRNAを濃縮させました。
- ② 培養上清を回収、エクソゾームを超遠心機にて分離し、単離エクソゾームの検証を行いました。
- ③ *miR-1*含有エクソゾームをT細胞系細胞株(Jurkat等)に添加し、取り込まれたmiRNAが機能すること証明しました。*miR-1*は *protein tyrosine kinase 9 (PTK9)*の発現をmRNAレベルで減少させ、効果的に抑制することが知られており、機能解析のポジティブコントロールとして検証を行いました。
- ④ 胎盤特異的のmiRNA含有エクソゾームをT細胞系細胞株に添加し、0~72時間後に蛋白質、RNAを抽出し、高分解能マイクロアレイスキャナ(Agilent社 G2565CA)を用いて解析を行いました。
- ⑤ GeneSpring (Agilent社)、Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems社)により、バイオインフォマティクス解析を行い、エクソゾームを取り込んだ細胞において、胎盤特異的のmiRNAがどのようなシグナル経路に關与しているのか(活性化、抑制化)解析しました。また、抑制mRNAリストから標的mRNA候補を抽出しました。

- ⑥ ルシフェラーゼによる標的mRNAの同定を行いました。

(2) 臨床解析: 正常妊婦(初期、中期、満期)の末梢血制御性T細胞などにおける胎盤特異的のmiRNAおよびmRNA量を網羅的定量発現解析を行い、Th & NKバランスにおける胎盤特異的のmiRNAの役割を検討しました。

## 4. 研究成果

1) 基礎解析(エクソゾーム含有胎盤特異的のmiRNAを介した栄養膜-T細胞クロストークの解析):

栄養膜のモデルである栄養膜細胞株(BeWo細胞)の培養上清を超遠心し、Western blot、免疫電顕にてエクソゾームが回収されていることを明らかにしました。次に、*miR-1*を添加し培養したBeWo細胞からエクソゾームを単離し、real-time PCRにてエクソゾーム中に、外因性の*miR-1*、内因性の胎盤特異的のmiRNA(*miR-517a*など)が含まれていることを確認しました。このBeWo細胞由来のエクソゾームをT細胞系細胞株(Jurkat細胞)に添加し、T細胞に取り込まれたBeWo細胞由来のmiRNAが機能すること証明するために、*miR-1*の既知の標的遺伝子である*PTK9*の発現を解析しました。*PTK9*mRNAが有意に減少し、機能していることを明らかにしました。

次に、胎盤特異的のmiRNA、*miR-517a*を取り込んだJurkat細胞におけるmRNAの発現変動に關して、マイクロアレイによる網羅的解析を行い、発現が低下した遺伝子のうち、コンピュータによる標的遺伝子候補解析から、*cyclic GMP dependent protein kinase 1 (PRKG1)*が標的mRNA候補であることを見出しました。さらに、*PRKG1*mRNAの3'-UTRをクローニングしたルシフェラーゼレポーターベクターによる標的遺伝子の実験的検証を行いました。その結果、*miR-517a*は、有意にルシフェラーゼ活性を低下させ、直接結合し抑制的に作用することが示されました(投稿準備中)。

末梢血(妊婦)よりT細胞およびNatural Killer(NK)細胞を分離し、マイクロアレイを用いてmRNAおよびmiRNAの網羅的解析を行いました。その結果、分娩後に胎盤特異的のmiRNAを含む低下したmiRNAに対して、発現が上昇したmRNAを抽出しました。どのようなシグナル経路に關与しているかバイオインフォマティクス解析を行い、分娩中はTh2優位を示唆するmiRNA-mRNAネットワークの制御がなされていることを示唆する新知見を見出しました。

2) 臨床解析(臨床サンプルを用いた解析):

末梢血から磁気ビーズシステムを用いて単核球細胞(リンパ球と単球)、Natural

Killer細胞、細胞制御性T細胞の分離を行い、胎盤特異的miRNAの含有量をreal-time PCRにて定量解析したところ、分娩前の細胞において胎盤特異的miRNAが検出され、分娩4日後には細胞からクリアランスされていることを見出しました。この結果は、妊娠期間中、胎盤由来miRNAが母体血液細胞に移行していることを示している新知見です（投稿準備中）。

磁気ビーズシステムを用いて、妊娠初期、中期、後期の定期検診時、および分娩前後の採血時に血液を採取し、単核球細胞、NK細胞、細胞制御性T細胞の分離を行い、アレイなどを用いてmRNAおよびmiRNAの網羅的解析を開始しましたが、詳細な解析は今後の課題として残されました。今後、Th & NKバランスに関連するカスケードを中心にバイオインフォマティクス解析を進め、妊娠維における胎盤特異的miRNAの役割を明らかにしていきたい。

#### 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) 瀧澤俊広, 石橋幸, アリモハメド, 二本鎖RNAセンサーによるリガンド認識とシグナル伝達機構の複雑性. 実験医学 30 : 1303-1306, 2012 査読無  
(<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/current2012.html>)
- (2) Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, Takizawa T, Hirashima C, Takahashi K, Migita M, Ishikawa G, Yoneyama K, Asakura H, Izumi A, Matsubara S, Takeshita T, Takizawa T. Hydroxysteroid (17- $\beta$ ) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. Hypertension 59 : 265-273, 2012 (DOI : 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180232) 査読有
- (3) Ishibashi O, Ali MM, Luo SS, Ohba T, Katabuchi H, Takeshita T, Takizawa T. Short RNA duplexes elicit RIG-I-mediated apoptosis in a cell type- and length-dependent manner. Sci Signal 4 : ra74, 2011 (DOI : 10.1126/scisignal.2001614) 査読有

〔学会発表〕（計11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. シンポジウム3 生殖医学研究に役立つニュー・コンセプト、ニュー・テクノロジー. 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
- (2) Takizawa T, Ohkuchi A, Ali MM, Luo SS, Takizawa T, Migita M, Ishikawa G, Matsubara S, Takeshita T. Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 1 (HSD17B1) is dysregulated by miR-210 and miR-518c in the human placenta complicated with preeclampsia: plasma levels of HSD17B1 as a novel marker for predicting late-onset preeclampsia. IFPA 2012 Hiroshima Meeting (第18回国際胎盤学会). 2012年9月19日, 広島
- (3) Ali MM, Takizawa T, Kikuchi K, Saito S, Takizawa T. BeWo-cell-derived miR-517a modulates the expression of PRKG1 in Jurkat cells via Exosomes. IFPA 2012 Hiroshima Meeting (第18回国際胎盤学会). 2012年9月18日, 広島
- (4) 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. 第56回日本人類遺伝学会. 2011年11月10日, 千葉
- (5) Ali MM, Song X, Ishibashi O, Kikuchi K, Ishikawa T, Takizawa T, Takizawa T. Placenta specific miR-517a modulates gene expression in Jurkat cells. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2012年3月26日, 山梨
- (6) 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. 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3日, 愛知
- (7) 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

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/第29回日本絨毛性疾患研究会. 2011年10月1日, 東京

- (8) 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
- (9) Ali MM, Ishibashi O, Ishikawa T, Kikuchi K, Takizawa T, Goto T, Takizawa T. BeWo exosome-associated microRNAs (miRNAs) are transferable and capable of modulating gene expression in Jurkat cells: miRNA-communication between placenta and T cells via exosomes. 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会. (誌上発表)
- (10) Takizawa T, Ali MM, Ishibashi O, Kikuchi K, Kosuge T, Matsubara S, Takeshita T: Placenta specific microRNAs in normal pregnancy and preeclampsia. 8th European Congress on Reproductive Immunology. 第8回欧州生殖免疫学会. 2010年11月13日, Munich, Germany
- (11) 石橋 幸, アリモハメド, 石川 源, 大口昭英, 泉 章夫, 松原茂樹, 米山剛一, 朝倉啓文, 竹下俊行, 瀧澤俊広. 妊娠高血圧症候群に関連するマイクロ RNA の同定とその標的遺伝子. 第18回日本胎盤学会学術集会 2010年9月30日, 熊本

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

アリ モハメド (ARI MOHAMEDO)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50573226