

令和元年6月18日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11103

研究課題名(和文) MicroRNAの網羅的解析による妊娠高血圧腎症と早産の病態解明・発症予知

研究課題名(英文) The comprehensive microRNA analysis and an etiologic study for early-onset preeclampsia

研究代表者

高橋 宏典 (Takahashi, Hironori)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80544303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：早発型妊娠高血圧腎症(preeclampsia: PE)は児の予後不良かつ発症原因が不明であるため、周産期学の最重要課題である。発症原因と推察されるのは、extravillous trophoblast(EVT)の浸潤障害である。そこで今回、(1)EVT浸潤障害に関わるmicroRNA(miRNA)同定と機序解明、(2)早発型PEで変動するmicroRNA(miRNA)同定、を目的とした。胎盤特異的miR-520cがEVT浸潤を抑制していること、WNT10BがEVT浸潤分子であること、早発型PE罹患妊婦血液において60種類のmiRNA発現が有意に変化すること、の3つが初めて分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)早発型PEで変化するmiRNAが判明したことで、これを発症予知として応用できる可能性を示した。発症予知ができると、当該miRNA変化(+)患者に早発型PEを80%予防する低用量アスピリンを処方できる。(2)EVT浸潤に関わる分子が新たに判明したことで、この分子の調節をターゲットにした新薬開発やドラッグリポジショニングにつなげられる。

研究成果の概要(英文)：Early-onset preeclampsia (PE) induces very preterm delivery and, thus, the outcome of infants with early-onset PE is generally poor. Although the reasons of the etiology remain unknown, extravillous trophoblast (EVT) invasion disorder is speculated as the etiology. Here, the purpose of this study was to clarify (1) microRNA(miRNA)s associated with EVT invasion disorder and its mechanism, and (2) changes of miRNAs in maternal blood in early-onset PE. Three novelties were made: (1) placenta-associated miR-520c suppressed EVT invasion via exosome; (2) WNT10B is an accelerator of EVT invasion; (3) sixty miRNAs significantly change in maternal blood in patients with early-onset PE.

研究分野：周産期学、胎盤分子生物学

キーワード：絨毛外栄養膜 マイクロRNA エクソソーム 妊娠高血圧腎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は17-25塩基の小分子RNAで、標的とするメッセンジャーRNA(mRNA)に結合し、翻訳を抑制し、蛋白質の産生が抑制される。miRNAは2588種類存在し、その中に胎盤特異的に発現するmiRNA(46種類存在)が存在することが知られている。胎盤から血中にmiRNAが放出される機序として、細胞内に存在する小型小胞体(50-150nm)のエクソソームにmiRNAが入り、それが血中に放出される。エクソソームの中に含有されたmiRNAは血中で運搬され、目的とする細胞にエクソソームごと入り、含有miRNAが機能する。これらmiRNAの機能とバイオマーカーとしての役割が注目されるようになった。興味深いことに母体血中に放出されたmiRNAは妊娠初期から母体末梢血中に検出される。つまり、母体血中miRNA解析により「胎児・胎盤の状態」が妊娠初期から把握できる可能性を有する。実際に胎盤機能低下を示す妊娠高血圧腎症(preeclampsia: PE)発症妊婦の血中miRNAは変化し、PE発症前でもmiRNA(miR-210)は先行変化する。しかし、miRNAは2500種類以上存在するが、一部のmiRNAしか解析されていない。

妊娠高血圧腎症(preeclampsia: PE)は全妊娠の3-5%に発症する。発症原因は不明で、妊娠終了以外の有効な治療法がない。PEは発症時期によって早発型と遅発型に分類されるが特に早発型(妊娠34週未満発症)の場合、児の未熟性から死亡や神経学的後遺症を残す。早発型PEの発症原因と想定されるのは、胎盤絨毛の主要細胞である絨毛栄養膜細胞のextravillous trophoblast(EVT)への分化障害およびEVT浸潤障害である。正常例ではEVTは脱落膜内らせん動脈を再構築し、拡張させるが、PEではEVT浸潤障害のため、らせん動脈拡張障害が発生する。その結果、胎盤への血流量が減少し、胎盤は慢性的な低酸素状態に陥る。代表者らはらせん動脈周囲にヒアルロン酸が局在することを初めて明らかにし、CD44-ヒアルロン酸相互作用がらせん動脈拡張障害に関与することを示した。早発型PEにおける病態形成機構解明のためには妊娠初期におけるEVT浸潤障害機構を明らかにする必要があるが、これに関与するmiRNAの役割が不明である。また、現時点で妊娠初期におけるPE発症予知因子(バイオマーカー)は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

① EVT浸潤障害に関わるmiRNA同定とそれらの機序解明、②PE発症予知となるmiRNA同定

3. 研究の方法

本学の倫理委員会の承諾を得て、施行した。

材料:絨毛栄養膜モデル細胞株はBeWoおよびJEG-3を用いた。EVTモデル細胞はHTR8/SVneoおよびHChEpC1bを用いた。ヒト検体(血液、胎盤)は当院で管理した妊婦から書面同意を取得後、採取した。

EVT分離:人工流産検体から絨毛を顕微鏡下で単離後、0.5mm程度にミンチ化し、FBS入りのメディアウムに浸した後、コラーゲンIでコートされたディッシュに均一に敷いた。インキュベーターで静置後、同一のメディアウムを入れ、48時間培養した。ディッシュに新たに生着した細胞を回収し、トランスフェクションした。miR-520cの過剰発現はpre-miR-520cを用い、陰性コントロールはpre-miR Negative Control#1を用いた。いずれのトランスフェクションも最終濃度は30nMとした。

浸潤能解析:コラーゲンIでコートされたディッシュに上下2層からなるチャンバーを使用した。上層のトランズウェル上面をGrowth factor reduced Matrigelでコートした。当該細胞を 5×10^4 個ずつトランズウェルに添加した。チャンバー上層は無FBS、チャンバー下層はFBSを添加し、FBS添加濃度は当該細胞培養で使用した濃度とした。トランズウェルに細胞添加

(5×10^4 個) 後、 37°C $5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内で 20 時間培養した。浸潤細胞はマトリゲルでコートした膜を通過し、上層底面に張り付く。浸潤せず上層に入ったままの細胞を綿棒でぬぐった後、2.5%のグルタルアルデヒドをチャンバーに入れ、固定した。0.5%クリスタルバイオレットで染色した後、位相差顕微鏡 200 倍で観察した。中央、右上、左上、右下、左下、それぞれ無作為に各々1 視野の浸潤細胞を目視計測し、この平均値を浸潤能とした。実験は各々3 回以上繰り返した。

レポーター解析：HTR8/SVneo 細胞に、pMIR-REPORT-3' UTRCD44 または pMIR-REPORT-empty、50nM の濃度で pre-miR-520c または pre-miR Negative Control#1 をトランスフェクションした。内部標準として、pCMV SPORT- β -galactosidase (β -gal) を同時にトランスフェクションした。24 時間後に Luciferase assay reagent を用いて、Luminescencer-0cta でルシフェラーゼ発光量を測定した。また、Gal-XE chemiluminescent reporter gene assay system を用い、Luminescencer-0cta で β -gal 活性を測定し、ルシフェラーゼ発現量を標準化した。

エクソソーム抽出：BeWo 細胞を無エクソソーム培養液中で 48-72 時間培養した。BeWo 細胞の培養上清を 300G で 10 分、2,000G で 10 分、10,000G で 30 分遠心し、遠心毎に沈殿物を除去した。最後に 4 度、100,000G、70 分超遠心し、沈殿物を含んだチューブ下層液体を回収した。0.22 μm のフィルターを通して、再度超遠心し、上清吸引後、PBS200 μL に懸濁したものをエクソソームとした。

症例-対照研究：早発型 PE を示した患者と満期分娩に至った患者の血液(血漿、血清)および胎盤をそれぞれ回収する。ヒト miRNA 2565 種類の発現を 3D-Gene® chip(東レ)を使用し、発現解析した。発現差($p < 0.05$)のみられた miRNA を抽出した。miRNA 標準化は global normalization(シグナル強度の中央値が 25 になるように補正し、各数値を比較し算出)で行った。胎盤についても同様に採取し、同様の miRNA パネルを用い、比較解析を行った。この際の標準化も global normalization で施行した。

前向きコホート研究：妊娠初期の妊婦健診時に書面による同意が得られた妊婦から血液採取を行った。その後の分娩転帰を調査した。

統計解析：Student-*t* 検定または AVOVA-Tukey 検定を使用した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) miR-520c による EVT 浸潤を制御

胎盤特異的 miR-520c が直接 CD44 (EVT 浸潤に強く関わる因子として既知) を抑制し、乳癌細胞株 MCF-7 の浸潤、遊走能に影響を与えると報告されていることから、46 種類存在する胎盤特異的 miRNA の中から miR-520c に焦点をあてた。miR-520c が EVT に与える影響について、EVT 細胞株と抽出 EVT を用い、解析した。

まず、絨毛(chorionic villi: CV)と CV から分化する EVT における miR-520c 発現を比較した。CV に比べ、EVT において miR-520c は低発現であった(図 1A)。他の胎盤特異的 miRNA も miR-520c と同様の発現傾向(CV>EVT)であった。次に、EVT 細胞株に miR-520c を強制発現したところ、EVT 浸潤促進因子の一つ CD44 発現は抑制され、浸潤自体も減少した。さら

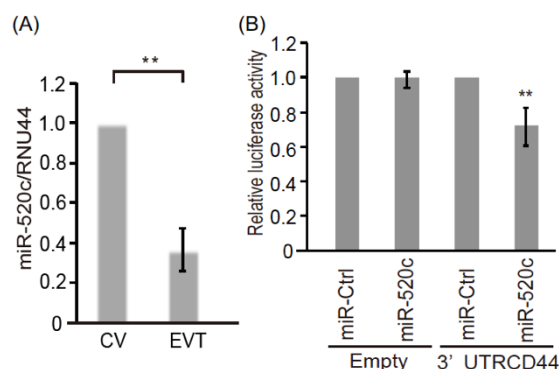


図1. (A)絨毛(CV)とEVTにおけるリアルタイムPCRによるmiR-520cの発現。(B)ルシフェラーゼ解析。miR-520cはCD44に直接結合し、ターゲットにしていることが示唆される。HTR8/SVneoを使用。

に、miR-520c が CD44 を直接標的遺伝子にしているかどうか、レポーター解析したところ、miR-520c が CD44 を標的遺伝子にしていた(図 1B)。上記の結果から、miR-520c は CD44 を直接標的とし、その発現を減少させ、結果、EVT 浸潤も減少した。

(2) エクソソームを介する EVT における胎盤特異的 miRNA の受け渡し

エクソソーム中の miR-520c が CV から EVT に移行し、EVT 上の蛋白(CD44)発現を変化させるかどうかを調べるために、モデル細胞 BeWo 上清からエクソソームを抽出した。つづいて、miR-520c を過剰発現させた BeWo の上清からエクソソームを抽出した。miR-520c 過剰発現エクソソームを EVT 細胞株に添加し、一定時間培養後、EVT 細胞株の蛋白を回収し、発現解析したところ、蛋白発現が変化(CD44 減少)した。さらに、同様に精製したエクソソームを添加し、浸潤実験を行ったところ、miR-520c 含有エクソソームの方が EVT 細胞株の浸潤が減少した。上記の結果から、CV 由来のエクソソームを介して、EVT における胎盤特異的 miRNA の受け渡しが行われて、機能変化が生じることが示唆された(図 2)。

(3) PE 発症 vs 非発症における網羅的 miRNA 発現比較

早発型 PE 妊婦 5 人とコントロール妊婦(満期分娩、PE 発症(-)) 5 人の血漿(27-29 週に採取)から RNA をそれぞれ抽出し、ヒト miRNA 2565 種類の発現を 3D-Gene® chip を使用し、発現解析した。発現差(p<0.05)の miRNA を抽出した。全ての症例で検出可能 miRNA は 418 種類だった。コントロールに比し、PE 妊婦の血漿中 miRNA 発現は、52 種類(miR-6895-5p, 3918, 4792, 30c-1-3p, 4435, 4459 など)で上昇し、8 種類(miR-451a, 8059, 4258, 4634, 4638-3p, 342-5p, 6787-5p, 4708-3p)で下降した。発現差(+)の 60 種類の miRNA 中 30 種類は PubMed 等で先行文献のない miRNA だった(表 1)。

つづいて、同様のレイパネルを用い、発現比較(PE5 人 vs. コントロール5人)を施行したところ、PE で有意に減少する miRNA は

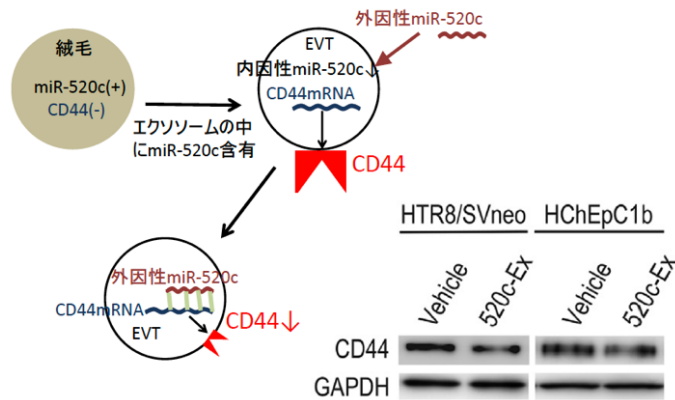


図2. エクソソームを介するCD44の抑制。コントロールエクソソーム(Vehicle)に比べ、絨毛由来miR-520c強制発現エクソソーム(520c-Ex)を添加した方がCD44発現が減少している。EVT細胞株(HTR8/SVneo, HChEpC1b)でエクソソームが取り込まれ、機能していることが示唆される。(WB画像はTakahashi H, et al. Placenta 2017にも採用したもの)

	average in PE	average in control	fold change	p-value	Articles in PubMed		average in PE	average in control	fold change	p-value	Articles in PubMed
hsa-miR-1229-5p	107.1	37.5	2.86	0.03	0	hsa-miR-4739	1484.4	734.2	2.02	0.03	4
hsa-miR-1254	36.3	11.3	3.22	0.01	7	hsa-miR-4792	53.5	11.4	4.72	0.03	3
hsa-miR-1275	100.1	24.4	4.10	0.03	27	hsa-miR-5196-5p	31.9	14.6	2.18	0.02	0
hsa-miR-128-2-5p	852.3	423.3	2.01	0.02	0	hsa-miR-557	50.4	25.1	2.01	0.04	9
hsa-miR-139-3p	24.4	9.1	2.67	0.01	20	hsa-miR-564	16.4	8.0	2.04	0.02	12
hsa-miR-204-3p	1250.2	576.1	2.17	<0.01	3	hsa-miR-575	58.5	19.5	2.99	0.04	12
hsa-miR-208a-5p	32.5	13.6	2.39	0.01	1	hsa-miR-6076	52.7	17.3	3.04	0.04	0
hsa-miR-30c-1-3p	80.9	17.7	4.58	0.04	1	hsa-miR-6124	85.7	26.4	3.25	0.02	0
hsa-miR-3141	73.6	32.3	2.28	0.02	1	hsa-miR-6510-5p	73.4	18.5	3.96	0.04	0
hsa-miR-3188	25.9	11.1	2.33	0.04	2	hsa-miR-652-5p	73.5	29.2	2.52	0.03	1
hsa-miR-328-5p	1430.1	651.4	2.20	0.03	1	hsa-miR-658	39.6	14.0	2.84	0.04	2
hsa-miR-345-3p	35.8	17.4	2.06	<0.01	3	hsa-miR-675-5p	88.7	27.5	3.23	0.01	12
hsa-miR-3616-3p	41.0	11.9	3.46	0.04	0	hsa-miR-6774-5p	64.3	30.0	2.14	0.03	0
hsa-miR-365a-5p	96.8	35.8	2.70	0.02	0	hsa-miR-6777-3p	19.4	9.6	2.02	0.03	0
hsa-miR-3918	50.0	9.9	5.07	0.02	0	hsa-miR-6798-3p	26.4	9.4	2.82	0.05	0
hsa-miR-4271	154.0	49.2	3.13	0.03	2	hsa-miR-6799-3p	330.8	139.8	2.37	0.04	1
hsa-miR-4274	17.8	6.8	2.64	0.03	1	hsa-miR-6825-5p	52.3	25.8	2.02	0.03	1
hsa-miR-4294	1389.9	638.4	2.18	0.01	1	hsa-miR-6870-5p	104.9	29.8	3.52	0.02	0
hsa-miR-4435	37.7	8.3	4.56	<0.01	0	hsa-miR-6891-5p	84.0	29.5	2.85	0.03	0
hsa-miR-4442	438.4	140.6	3.12	0.05	0	hsa-miR-6895-5p	67.6	11.9	5.68	0.05	0
hsa-miR-4449	80.1	25.5	3.14	0.01	3	hsa-miR-7106-5p	38.0	9.9	3.85	<0.01	0
hsa-miR-4459	269.8	63.5	4.25	0.01	2	hsa-miR-7109-5p	103.2	45.7	2.26	0.05	0
hsa-miR-4687-3p	454.9	148.5	3.06	0.04	1	hsa-miR-7150	144.2	43.9	3.29	0.03	0
hsa-miR-4723-5p	600.1	248.2	2.42	0.04	0	hsa-miR-7641	66.6	18.4	3.62	0.03	2
hsa-miR-4731-5p	82.3	28.6	2.88	<0.01	2	hsa-miR-7846-3p	27.4	12.6	2.17	0.03	0
hsa-miR-92a-2-5p	394.7	135.3	2.92	0.03	1	hsa-miR-8071	59.7	28.8	2.08	0.03	1

miR-1-3p, miR-5004-5p, miR-148b-3p. miR-215-5p, miR-660-5p, miR-224-5p, miR-135b-5p, miR-186-5p, miR-98-5p, miR-7855-5p, miR-542-3p, miR379-3p であった。逆に PE で有意に増

加するのはmiR-548z, miR-5087, miR-548as-5pであった。妊婦血液と胎盤で差のみられるmiRNAは異なった。早発型PEは胎盤形成異常が基(first hit)になって、さらに2次的な誘因が発生(second hit)し、発症することが推察されているが、胎盤内と妊婦血清中で変化するmiRNAは大きく異なった。

(4) WNT10BによるEVT浸潤促進

EVTの浸潤機構を明らかにすることを目的に新規EVT浸潤候補分子として、WNT10Bに注目した。WNT10BをEVT(細胞株を含む)に添加すると、CD44(新規EVT浸潤促進分子として代表者らが先行研究で報告済)を介し、EVT浸潤が有意に促進された。細胞外 metalloproteinase の一つ MMP9 が並行して変動しており、WNT10B 添加によって、CD44 を活性化すると同時に MMP9 が活性化され、浸潤促進に寄与していることが示唆された。また、WNT10B 経路解明のために2種類の古典的 WNT 経路阻害剤(FH535, XAV939)を添加すると CD44 発現はそれぞれ減少した。一方、WNT 経路の活性化剤(lithium chloride)を添加すると CD44 発現は増加し、WNT10B 存在下では CD44 発現はさらに増加した。

(5) 妊娠初期バイオマーカー研究

妊娠初期における妊婦血液を採取した。現在約700人の検体が収集完了し、分娩が完結し、診療録から情報が収集できたのは400人であり、以下の情報を収集した。早発型PE発症患者10人、遅発型PEは18人、早産は56人、28週未満の超早産は2人であった。サンプルサイズを考慮すると、疾患患者は最低15人必要で、さらに延長して、検体採取中である。PE(+ vs. (-)、超早産(+ vs. (-)でmiRNA、CD44、プロレニン等で発現比較を施行する計画を立てられた。当該研究は現在も続けている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

① [Takahashi H](#), [Ohkuchi A](#), Kuwata T, Usui R, Baba Y, Chaw Kyi TT, Matsubara S, Saito S, [Takizawa T](#). Endogenous and exogenous miR-520c-3p modulates CD44-mediated extravillous trophoblast invasion. *Placenta* 2017;50:25-31. (査読有)

[学会発表] (計4件)

① [Takahashi H](#), Ogoyama M, Nagayama S, [Ishida Y](#), Suzuki H, Baba Y, Kuwata T, Usui R, [Takizawa T](#), [Ohkuchi A](#), Matsubara S. Change in microRNA expression in preeclamptic maternal blood: Sixty microRNA detected by microarray analysis (3D-Gene chip) with global normalization. 第69回日本産科婦人科学会学術講演会、2017年4月13-16日、広島

② [高橋宏典](#)、[小古山学](#)、[大口昭英](#)、[瀧澤俊広](#)、[松原茂樹](#)：WNT10BによるCD44を介した絨毛外栄養膜の浸潤促進、第70回日本産科婦人科学会学術講演会、2018年5月10-13日、仙台

③ [Takahashi H](#). Potential role of exosomal placenta-associated microRNA for extravillous trophoblast. International Federation of Placenta Associations (IFPA)2018, September 21-24, 2018, Tokyo

④ [高橋宏典](#)、[小古山学](#)、[永山志穂](#)、[大口昭英](#)、[瀧澤俊広](#)、[松原茂樹](#)：WNT10Bによる絨毛外栄養膜の浸潤促進、第33回日本生殖免疫学会学術集会、2018年11月24-25日、東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：瀧澤 俊広

ローマ字氏名：(TAKIZAWA, toshihiro)

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：分子解剖学

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90271220

研究分担者氏名：大口 昭英

ローマ字氏名：(OHKUCHI, akihide)

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：産科婦人科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：10306136

研究分担者氏名：石田 洋一

ローマ字氏名：(ISHIDA, yoichi)

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：産科婦人科

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：70772143

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：白砂 孔明

ローマ字氏名：(SHIRASUNA, komei)

※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、研究者個人に帰属されます。