

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K20204

研究課題名（和文）子宮内膜機能とマイクロRNAに関する基礎的研究

研究課題名（英文）Functional analysis of endometrial decidualization and microRNA

研究代表者

栃木 秀乃 (Tochigi, Hidenō)

埼玉医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90623695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の成果として、miR-542-3pはIGFBP1の発現を直接制御することにより形態学的、機能的に子宮内膜脱落膜化過程に関与していることが明らかとなった。さらに今回同定した6種類のmiRNAのうち、miR-424とmiR-503を共に強制発現する事により、FOXO1等の脱落膜化に関連する遺伝子発現を制御していた。この2つのmiRNAのクラスターも脱落膜化過程において重要な役割を担っている事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜の分化過程である脱落膜化は妊娠の成立・維持に必須であり、その機能異常は着床不全、反復流産、妊娠高血圧症、子宮内胎児発育遅延などの病態の発症に深く関わっている事が広く知られている。しかし、その分化過程の分子学的なメカニズムは未解明な部分が多い。本研究の成果は、婦人科疾患の病態解明や治療標的の開発に役立てることができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, six miRNAs were identified for the important miRNAs in decidualization. It is clarified that miR-542-3p is morphologically and functionally involved in the process of endometrial decidualization by directly controlling the expression of IGFBP1. Furthermore, both of the miRNAs that miR-424 and miR-503 were collaboratively expressed that related the controlled genes by FOXO1. It was suggested that miR-424 and miR-503 clusters play an important role in the decidualization process.

研究分野：生殖医学

キーワード：着床不全 子宮内膜脱落膜化 習慣性流産 マイクロRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜の分化過程である脱落膜化は妊娠の成立・維持に必須であり、その機能異常は着床不全、反復流産、妊娠高血圧症、子宮内胎児発育遅延などの病態の発症に深く関わっている事が広く知られている。しかし、その分化過程の分子学的なメカニズムは未解明な部分が多い。一方、遺伝子発現の転写後調節を司る機能性低分子 RNA である microRNA(miRNA)は、子宮内膜を含めた女性生殖器にも発現が認められ、様々な生理的・病理学的機能を担っていると考えられている。

近年、タンパク質をコードしない RNA (ノンコーディング RNA : ncRNA) が様々な生理学的機能を有している事が見出されている。ncRNA の一つであるマイクロ RNA(miRNA)は、遺伝子発現の転写後調節を司る機能性低分子 RNA である。miRNA は子宮内膜を含めた女性生殖組織にも発現が認められ、様々な生理的・病理学的機能を担っていると考えられている。これまでに、網羅的マイクロアレイ解析により脱落膜化過程に関連する事が知られている IGFBP1、PRL や WNT4 などの種々の遺伝子を制御する可能性がある miRNA を 6 個同定した。miRNA542-3p に関してさらに解析を進め、miRNA542-3p が脱落膜マーカーである IGFBP1 の発現を制御する事により、形態学的、機能的にも脱落膜化過程を制御している事を明らかとした。(Tochigi, et al. Sci Rep. 2017)

本研究ではこれまでに申請者が所属しているグループが明らかにしてきた子宮内膜の脱落膜化機構に関する知見 (kajihara, et al Med Mol Morpho 2013) と上記先行研究の結果を基盤とし、さらに子宮内膜機能と miRNA の関連に着目し基礎的研究を行い、最終的には着床不全や子宮内膜症に対する診断マーカー及び治療標的の探索を研究目的とした。

### 2. 研究の目的

子宮内膜の分化過程である脱落膜化は妊娠の成立・維持に必須であり、その機能異常は着床不全、反復流産、妊娠高血圧症、子宮内胎児発育遅延などの病態の発症に深く関わっている事が広く知られている。しかし、その分化過程の分子学的なメカニズムは未解明な部分が多い。一方、遺伝子発現の転写後調節を司る機能性低分子 RNA である microRNA(miRNA)は、子宮内膜を含めた女性生殖器にも発現が認められ、様々な生理的・病理学的機能を担っていると考えられている。また miRNA は多くの病態診断のバイオマーカーとして有望であるのみならず、その標的遺伝子が同定され、その発現を制御する miRNA の機能が明らかとなれば、その miRNA は新規治療薬のターゲットとなり得る。そこで本研究では子宮内膜脱落膜化過程を制御する転写因子の発現を制御している miRNA を Micro array 解析により同定し、その機能を解析する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

埼玉医科大学病院 IRB 委員会の承認の下、良性疾患の患者からインフォームド・コンセントを得て子宮を摘出し、ヒト子宮内膜間質細胞 (HESCs) を分離・培養した。脱落膜化刺激は、8-bromo-cAMP (8-bro-cAMP) と medroxyprogesterone acetate(MPA)を用いて行い、脱落膜化群と control 群から miRNA を含む全 RNA を抽出した。全 RNA を用いて miRNA 発現アレイと mRNA 発現アレイを行い、脱落膜化前後で発現変動する miRNA とその標的遺伝子を IPA 解析により予測した。予測した miRNA と標的遺伝子の制御関係の評価は、形態学的観察、定量 PCR 法による遺伝子発現量の測定、ELISA 法によるタンパク質の発現量測定によって行った。

### 4. 研究成果

miRNA 発現アレイ解析により、有意な発現変動を認める miRNA を 6 種類同定した(miR-503, miR-542-3p, miR-155, miR-145\*, miR-424, miR-483-3p)。このうち、miRNA-542-3p は脱落膜化マーカーである IGFBP1 を標的遺伝子とすることが予測されたため、miRNA-542-3p に着目してその後の解析を行った。qPCR により、脱落膜化した HESCs では miR-542-3p の発現量は有意に低下し、同時に IGFBP1 の発現量は有意に上昇することが確認された。次に、miRNA-542-3p の脱落膜化に対する機能を明らかにするために、HESCs に miR-542-3p を強制発現させ、同時に脱落膜化刺激を加えた場合の形態学的観察と脱落膜化マーカーの発現量の測定を行った。脱落膜化刺激により大型で敷石状に形態変化をする HESCs が、miR-542-3p を強制発現させ脱落膜刺激を行った HESCs では線維芽細胞様の細長い紡錘形のままに留まり脱落膜化変化を示さなかった。また、mRNA レベルでは IGFBP1、PRL、WNT4 の発現量が有意に抑制され、miRNA-542-3p の過剰発現は脱落膜化を形態学的にも機能的にも抑制する方向に働くことが明らかとなった。更には、miR-542-3p は IGFBP1 の発現を直接的に制御することを Luciferase assay にて証明した。また、今回同定した未解析の miRNA の中には、申請者が所属しているグループが以前、脱落膜

化過程で重要な役割を果たしている事を明らかとした FOXO1 (Kajihara, et al Mol Endocrinol 2006) の発現を制御する可能性のある miRNA424 が含まれていた。またさらには脱落膜化との関連が多数報告されている WNT4 を制御する可能ある miRNA424 と miRNA503 が含まれ、この2つの miRNA は1つのクラスターを形成しているため、2つの miRNA が協調して WNT4 を制御する事により脱落膜化過程を制御している可能性が考えられる。以上の事をふまえ、脱落膜化過程における FOXO1 の発現制御を介した miRNA424 の機能について、miRNA424 と miRNA503 が協調して WNT4 の発現を制御する事により脱落膜化過程を制御しているか否か明らかとすることを目的とし更なる実験を追加した。

結果、脱落膜化群では control 群と比較し、miR-424 と miR-503 共にその発現は低下していた。ヒト子宮間質細胞に miR-424 と miR-503 を同時に強制発現させた後に脱落膜化刺激を行なっても、形態学的に脱落膜化変化は認められなかった。また脱落膜化マーカーである IGFBP1 と PRL の発現も有意に抑制されていた。

本研究の成果として、miR-542-3p は IGFBP1 の発現を直接制御することにより形態学的、機能的に子宮内膜脱落膜化過程に関与していることが明らかとなった。さらに今回同定した6種類の miRNA のうち、miR-424 と miR-503 を共に強制発現する事により、FOXO1 等の脱落膜化に関連する遺伝子発現を制御していた。この2つの miRNA のクラスターも脱落膜化過程において重要な役割を担っている事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamaru Shunsuke, Kajihara Takeshi, Mizuno Yosuke, Mizuno Yumi, Tochigi Hideno, Ishihara Osumu	4. 巻 53
2. 論文標題 Endometrial microRNAs and their aberrant expression patterns	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 131 ~ 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00252-8	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 Tamaru Shunsuke, Kajihara Takeshi, Mizuno Yumi, Takano Natsuko, Tochigi Hideno, Sato Tomomi, Ishihara Osamu	4. 巻 in press
2. 論文標題 Heparin prevents oxidative stress-induced apoptosis in human decidualized endometrial stromal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-019-00220-x	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 Tochigi Hideno, Kajihara Takeshi, Mizuno Yosuke, Mizuno Yumi, Tamaru Shunsuke, Kamei Yoshimasa, Okazaki Yasushi, Brosens Jan J, Ishihara Osamu	4. 巻 7
2. 論文標題 Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 40001 ~ 40001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep40001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 哲、梶原 健、栃木 秀乃、田丸 俊輔、高村将司、亀井良政、石原 理
2. 発表標題 miR-424 & 503は形態学的、生物学的にも子宮内膜脱落膜過程を制御する
3. 学会等名 第73回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栃木秀乃、山口哲、水野由美、田丸俊輔、水野洋介、梶原 健、石原 理
2. 発表標題 子宮内膜脱落膜化過程を制御するmicroRNA の網羅的な探索とその機能解析,
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山縣 洸、水野由美、梶原 健、栃木秀乃、田丸俊輔、石原 理
2. 発表標題 子宮内膜脱落膜化細胞から分泌されるエクソソームの精製とその役割
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栃木 秀乃、齋藤良平、水野由美、梶原 健（産科婦人科）、佐藤 毅（口腔外科）
2. 発表標題 子宮筋蠕動運動と子宮内膜機能に関する研究
3. 学会等名 平成29年度若手研究者育成研究費成果報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栃木秀乃、齋藤良平、梶原 健、石原 理
2. 発表標題 子宮内膜脱落膜細胞で産生される中鎖脂肪酸の網羅的解析
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栃木 秀乃
2. 発表標題 子宮内膜細胞の脱落膜化過程で発現するmicroRNAとその標的遺伝子の探索
3. 学会等名 第15回RCGMフロンティアシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideno Tochigi
2. 発表標題 miRNA5423pはIGFBP1の発現制御を介して形態学的にも機能的にも脱落膜化過程を制御する
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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0件

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
---------	---------