

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18199

研究課題名（和文）母体と胎児の分子生物学的コミュニケーションツールとしてのエクソソームの役割の解析

研究課題名（英文）Analysis of the role of exosomes as maternal-fetal molecular communication tools

研究代表者

栃木 秀乃（Tochigi, Hidden）

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、エクソソームが脱着膜化において重要な役割をしている可能性が示唆された。また、これまで明らかになっていなかったmiRNAの子宮内膜細胞での役割を明らかにすることができた。miRNAが、FOXO1の核への局在を制御していることや、FOXO1の下流にあるSCARA5の発現が制御されることで脱着膜化の過程において重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、子宮内膜の脱着膜化過程で発現量が変化するmiRNAのうち、これまでに明らかになっていなかったmiRNAの機能が明らかとなった。このことは、不妊症や妊娠高血圧症等の産婦人科疾患の新規の治療法や診断の確立に役立てることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：miRNA regulate the expression and localization of FOXO1, and their downstream SCARA5 expression is suggested to play an important role in the decidualization process.

研究分野：生殖医学

キーワード：着床 マイクロRNA 脱着膜化 不妊症

1. 研究開始当初の背景

妊娠の成立には子宮内膜と胚との密接な相互作用が重要である。体外受精などの治療を受ける際に、形態的良好胚を繰り返し移植しても、着床・妊娠が成立せず、その原因が子宮内膜側の胚を受容する能力の異常(着床不全)にあると考えられるケースが多数存在する。しかしこの着床不全に対する明確なエビデンスのある治療法がないため、現時点では、良好な胚をいかに選別するかに重点を置いた治療が行なわれているのが現状である。私たちは、着床過程における子宮内膜の機能や子宮内膜と胚の相互作用についての研究が、着床不全や習慣性流産などの治療への臨床応用にとって重要であると考えた。

子宮内膜は、胚が着床するときに脱落膜化という分化過程を経て胚を受け入れる準備を整える。これまでに申請者が所属する研究グループでは、子宮内膜の脱落膜化をヒト初代培養細胞で安定的に誘導する系を確立した。この誘導系で分化させた子宮内膜脱落膜化細胞を用い、脱落膜化を制御する因子として、転写因子である FOXO1 や microRNA542-3p を発見した (Tochigi et al. 2017)。microRNA542-3p 以外にも、子宮内膜が脱落膜化する際に発現量が変動する miRNA はたくさん見つかった。

さらに、母体-胎児間の双方向のコミュニケーションを担うものとしてエクソソームが着目されている。細胞外小胞の一種であるエクソソームは、mRNA、microRNA、タンパク質、脂質などの物質を脂質二重膜に内包し、他の細胞へ運搬する細胞間コミュニケーションツールとして近年注目を浴びている。このような背景から、エクソソームを介した母体と胎児間の相互シグナルについて、microRNA を中心とした解析により、着床にかかわる、エクソソームの役割やこれまでに明らかになっていない microRNA の機能を明らかにしようと考えた。本研究により、不妊症や妊娠高血圧症等の産婦人科疾患の新規の治療法や診断の確立に役立てる。

2. 研究の目的

本研究では、母体-胎児間の双方向のコミュニケーションとしてエクソソームを想定し、子宮内膜から分泌されるエクソソームと miRNA について解析し、産婦人科疾患の新規治療や診断に役立つ基礎データを得ることを目的とする。当研究室で過去に報告した脱落膜化に伴い変化する miRNA にも着目し、脱落膜化のメカニズムの一端を解明する。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜の初代培養

ホルモン治療が行われておらず、良性疾患に対して子宮全摘術を行う患者から同意を得て、子宮内膜細胞 (HESCs) を常法にて分離、培養した。

(2) 脱落膜化刺激

採取した子宮内膜細胞を 10%FBS 及び 1%Antibiotic-Antimycotic を含む D-MEM/F-12 培地にて培養した。脱落膜化刺激は 2%FBS 含有 D-MEM/F-12 培地に 0.5mM 8-br-cAMP と 10^{-6} M MPA を混和し行った。

(3) エクソソームの抽出と精製

エクソソームは MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS を用いて抽出・精製をおこなった。また、ナノサイトによる粒子解析と電子顕微鏡にて精製された小胞の確認をおこなった。

(4) miRNA mimic 及び siRNA トランスフェクション

トランスフェクションは脱落膜化刺激前に行った。Xfect™ RNA Transfection Reagent、Lipofectamine 2000 または Lipofectamine 3000 を用い、製品プロトコールに沿った形で行った。

(5) RNA 抽出と cDNA 合成及び qPCR

miRNeasy Mini kit を用いて製造元のプロトコールに基づき RNA の回収及び精製を行った。回収した RNA は NanoDrop 分光計を用いて 230nm、260nm、280nm の吸光度の測定により品質を検証した。cDNA 合成は PrimeScript™ RT Master Mix を用いて逆転写を行った。作製された cDNA を鋳型とし、試薬は PowerUP SYBR Green PCR Master Mix を用い、PikoReal 96 にて解析を行った。

(6) 蛍光免疫染色

4%パラホルムアルデヒドにて固定した。一次抗体は FOXO1 抗体を使用し、二次抗体は anti-rabbit immunoglobulin G conjugated with Alexa Fluor 488 を使用した。DAPI 含有封入剤にて核を染色した。蛍光顕微鏡の AxioCam を用いて観察を行った。

(7) Luciferase Assay

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector に FOXO1 のプロモーター上 miRNA のターゲット領域と考えられている遺伝子配列をベクターに導入しクローニングを行った。Dual Luciferase Reporter Assay System を用いて発光測定を行い、miRNA が直接的に FOXO1 の発現制御を行なっているか確かめた。

(8) Migration assay

mir-424 と mir-503 の有無脱落膜化刺激の有無により、細胞の移動度が異なるかスクラッチアッセイにて解析した。細胞を直線的に削ったのち、36 時間での移動量を計測した。計測には Image J を用いた。

4 . 研究成果

子宮内膜初代培養細胞から確かにエクソソームが分泌されることを確かめた。また、脱落膜化刺激に伴い、エクソソームの分泌量が増加する傾向が見られた。さらに、エクソソーム中で発現量が増減する miRNA についての解析では、エクソソーム中で発現変動する miRNA と細胞内で発現量が増減する miRNA の種類が異なっていた。以上のことから、子宮内膜から分泌されるエクソソームは、脱落膜化に伴い目的を持ってエクソソーム中に内包する miRNA の種類を変えていることが示唆された。

次に、脱落膜化に伴い、細胞内で発現量が変化すると予測された miRNA のいくつかに着目すると、細胞内で発現量が有意に低下する miRNA が見つかった。しかし、エクソソームでは脱落膜化に伴う変化は確認されなかった。また、これらの miRNA の mimic を HESCs に導入し、さらに脱落膜化刺激を行うと既知の脱落化マーカーである FOXO1、PRL、WNT4、IGFBP1 に加え、SCARA5 の発現量の低下が認められた。si-FOXO1 をトランスフェクションした HESCs に対して脱落膜化刺激を加えると SCARA5 の発現量低下が認められたが、si-SCARA5 をトランスフェクションした HESCs に対して脱落膜化刺激を加えても FOXO1 の発現量に変化は認められなかったため、FOXO1 は SCARA5 を制御している可能性が示唆された。

さらに、FOXO1 の局在についても興味深いデータが得られた。FOXO1 は、脱落膜化により細胞核への局在が促進されるが、ある miRNA を mimic した脱落膜化 HESCs では、FOXO1 の局在が細胞核から移動し、細胞質に局在することが明らかになった。このことは、miRNA が FOXO1 の脱落膜化に伴って行う遺伝子の発現制御を抑制している可能性が考えられた。また、Luciferase assay により、直接的な関与を明らかにすることができた。

最後に、Migration Assay にて、miRNA の細胞の移動度に対する影響も明らかにできた。

以上の結果から、エクソソームとそこに含まれる miRNA や、細胞で働く miRNA を介して、胚を受け入れるために必要な因子を制御している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3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、栃木 秀乃、田丸 俊輔、高村将司、梶原 健、石原 理、亀井良政
2. 発表標題 miR-424&503 は FOXO1-SCARA5 を介して子宮内膜の脱落膜化を制御する
3. 学会等名 第 74 回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

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回日本産科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

〔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
研究協力者	山口 哲 (Yamaguchi Tetsu)	埼玉医科大学・医学研究科・大学院生 (32409)	
研究協力者	山縣 洸 (Yamagata Ko)	埼玉医科大学・医学研究科・大学院生 (32409)	

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