

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18239

研究課題名(和文) TGF- β -SMADを介した胎盤m6A修飾解析による妊娠合併症の病態解明研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of pregnancy-related complications by m6A-modification analysis of human placenta via TGF β -SMAD

研究代表者

谷口 公介 (Taniguchi, Kosuke)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・研究員

研究者番号：90808718

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)：生物を構成するタンパク質の設計図の一つであるメッセンジャーRNA(mRNA)は、多くの修飾を受けることでその発現が巧みに微調整されている。本研究では、最も重要な転写後修飾であるm6A修飾を胎盤細胞で網羅的に解析した。様々な細胞で検討を行った結果、トロフォブラスト幹細胞を、extravillous cytotrophoblast(EVT)とsyncytiotrophoblast(ST)に分化させると、m6A量がEVTでは変化がなかったが、STでは有意に変化し、同時にm6A関連遺伝子も変化した。これらから、ヒト胎盤細胞の分化ではm6A修飾が重要であ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

ヒト胎盤細胞の分化ではm6A修飾が重要であり、妊娠合併症では、異常分化状態の胎盤細胞が存在することも考えられることから、本研究による胎盤細胞でのm6A修飾のプロファイリングは、今後の疾患研究のリファレンスデータとなりうる。

研究成果の概要(英文)：The expression of messenger RNA (mRNA), one of the blueprints of proteins that make up living organisms, is skillfully fine-tuned by undergoing many modifications. This study comprehensively analyzed placental cells' most essential post-transcriptional modification, m6A modification. As a result of examining various cells, when trophoblast stem cells were differentiated into extravillous cytotrophoblast (EVT) and syncytiotrophoblast (ST), there was no change in the amount of m6A in EVT. Still, there was a significant change in ST. The m6A-associated gene was also significantly altered. These findings suggest that m6A modification is essential in differentiating human placental cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：m6A preeclampsia placenta

1. 研究開始当初の背景

近年提唱された epitranscriptome とは、RNA の化学修飾により遺伝子発現調節を制御する機構を指す。mRNA の化学修飾は、mRNA の安定性、タンパク質翻訳調節に cis に働く。その代表的な mRNA 修飾であるアデノシンメチル化修飾; N6-メチルアデノシン(m6A)は真核生物の mRNA に豊富で、様々な生体現象に関わる重要な修飾である。我々はヒト胎盤 mRNA 内の m6A 修飾の意義に注目し、ヒト胎盤 m6A 修飾の胎児発育、preeclampsia(PE)との関連を報告した。次に胎盤で重要な機能細胞である trophoblast に注目し m6A 修飾との関連を検討することで、ヒト胎盤の生理的機能の解明及び、PE の病態解明を目指す。

2. 研究の目的

epitranscriptome の観点から、ヒト trophoblast における m6A 修飾の役割の解明と、PE の ST 分化異常と m6A 修飾の関連を明らかにし、病態解明を目指す。

3. 研究の方法

絨毛癌細胞株である JEG3 への刺激実験及び、正常及び疾患由来の満期胎盤から得た初代培養 cytotrophoblast(CT)を syncytiotrophoblast(ST)へ分化させた細胞から total RNA を抽出し、RNA seq により網羅的な遺伝子解析を実施した。また、トロフォブラスト幹細胞を用い ST、EVT 分化させ、total RNA を抽出し、RNA seq を実施した。どちらの分化も、okae et al (cell stem cell, 2018)により報告されている方法を採用した。Total RNA 抽出は RNeasy Plus mini Kit (キアゲン)で実施し、ライブラリは NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina(NEB)のマニュアルに沿って作製した。シーケンスは HiSeqX で、150bp paired end、2000 万リードを目標とし実施した。

さらに、JEG3 の刺激実験に対しては、網羅的 m6A 修飾解析(MeRIP-seq)を実施した。MeRIP-seq は、taniguchi et al(The FASEB Journal, 2020)の方法を採用した。

4. 研究成果

当初の予定である TGF- β 1-SMAD を介した胎盤 m6A 修飾解析を実施するために、絨毛癌細胞株である JEG3 を用い、human TGF- β 1 及び 3 で刺激を実施し、RNA sequencing で網羅的遺伝子発現状態を確認したが、m6A 修飾関連遺伝子に変化がなかった。一方、一部の SMAD 遺伝子の発現量が変化していた。また、MeRIP-seq を実施したが、有意な m6A 修飾の変化を見出すことは困難であった。

次に、実際の胎盤組織から得た細胞を用いた検討を行った。正常胎盤由来の初代培養 CT を ST に分化させる方法として、過去に報告されていた(okae et al, 2018)、接着させて分化させる系 (2DST) と浮遊状態で分化させる系 (3DST) を検討した。接着させて分化させる 2DST の系では、細胞を癒合させるために添加するフォルスコリンの細胞障害性の高さから ST 分化モデルとして採用することが難しかった。一方、フォルスコリンを添加し、接着させずに培養するとアポトーシスを起こす細胞は存在するが、メッシュフィルターを用いた選択で分化した生細胞のみを抽出することができた。また RNA sequencing でマーカー遺伝子の発現上昇を確認し、また既報(okae et al, 2018)のデータと遜色ないことから ST へ効率的に分化したことが確認できた。正常胎盤由来の初代培養 CT を ST に分化させたところ最も重要な m6A writer 遺伝子である *METTL3* の発現量が有意に低下することを見出した。(TPM mean CT vs ST, 106 vs 36, n=3, Figure1) 一方、重篤な妊娠合併症である preeclampsia(PE)の CT を用いた ST 分化実験で *METTL3* を含めた m6A 修飾に関連する 22 遺伝子に有意な変化を認めなかった。並行しトロフォブラスト幹細胞における m6A 修飾の分化における関連性を検討した。トロフォブラスト幹細胞を、extravillous cytotrophoblast(EVT)と ST に分化させ、m6A 量を定量すると、EVT では変化がなかったが、ST では有意に減少する結果を得た (Figure2)。また、ST 分化において、*METTL3* の発現量が有意に上昇した(TPM mean CT vs ST, 63 vs 12, n=4)。以上の結果は、CT 細胞の分化には m6A 修飾が重要であることを示唆していた。今後は MeRIP-seq を実施し、網羅的に m6A 修飾のプ

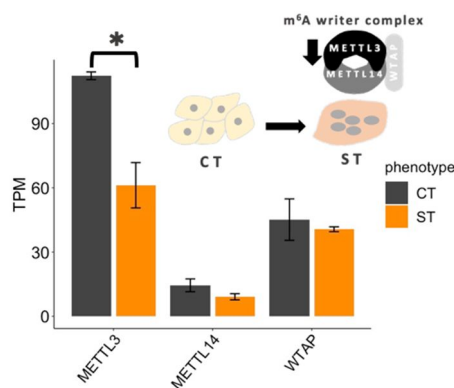


Figure1. m6A writer の中でも *METTL3* の発現量は ST で有意に減少。

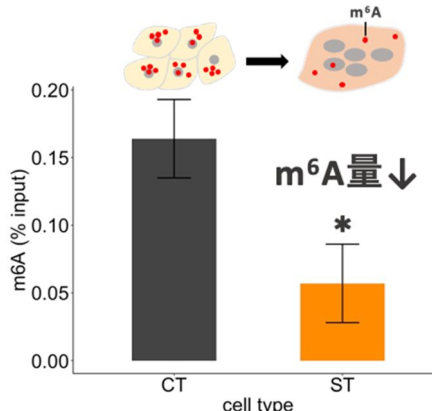


Figure2. m6A量は ST で有意に減少。

ロファイリングを実施し、転写後修飾による分化メカニズム解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Kosuke Taniguchi and Tomoko Kawai	4. 巻 Vol.7
2. 論文標題 m6A methylation in the perinatal field	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Care	6. 最初と最後の頁 No.1: 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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0件

〔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
---------	---------