

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592453

研究課題名(和文)エクソゾーム内封小分子RNAを用いた妊娠早期における妊娠高血圧症候群の発症予知

研究課題名(英文) Exosomal small RNA in the plasma of early pregnant women as a significant predictor of pregnancy-induced hypertension

研究代表者

古田 伊都子 (Furuta, Itsuko)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助手

研究者番号：70238682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、妊娠初期婦人血漿中exosomeに内封されているsmall RNA(Exo-RNA)を量的(RNA濃度)・質的(RNA塩基長)に解析し、妊娠高血圧症候群(PIH)の予知マーカーとしての可能性を検討した。Exo-RNAをchip電気泳動すると、サイズの異なる3分画(micro:20-40nt, medium:41-80nt, large:81nt<)が認められた。妊娠6-8wにおけるExo-micro RNAは非PIH発症検体(n=34, median1.55ng/ml)に対してPIH発症検体(n=2, median2.84ng/ml)では有意(p=0.038)に高値を示した。

研究成果の概要(英文)：To determine whether plasma exosomal small RNA levels (exo-RNA) in early pregnancy can predict the onset of pregnancy-induced hypertension(PIH), we investigated exo-RNA in early pregnant women. Plasma samples were collected from singleton pregnant women (6-19 weeks of gestational age). Written informed consent was obtained from all participants of this study. Exosomal RNA extracted from plasma were analysed by Agilent 2100 Bioanalyzer. Three size of nucleotides (nt) area were identified in exo-RNA with Bioanalyzer electropherogram, and each peak areas were categorized as micro (10 to 40 nt), medium (41 to 80 nt) and large (81 nt<) RNA. Exo-micro and medium RNA in women without PIH at 9-11 weeks of gestation were significantly higher than those at 6-8 weeks of gestation. Also longitudinal significant increase was observed in exo-RNA in women at 6-11 weeks of gestation. At 6-8 weeks of gestation, Exo-micro RNA in women with PIH was significantly higher than those without PIH (p=0.038).

研究分野：産科・周産期医学

キーワード：exosome 妊娠高血圧症候群 small RNA

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (pregnancy induced hypertension:PIH)は全妊娠の約 5~10%に発症する疾患で妊産婦死亡の主要な原因である。その病因はいまだ不明の部分が多いが、妊娠初期に絨毛細胞 (extravillous trophoblast:EVT)が脱落膜へ侵入する過程が阻害され、ラセン動脈の血管内皮細胞から EVT への置換が不十分となること、即ち絨毛間腔 (maternal-fetal interface)における血管新生の抑制が一つの引き金であると考えられている。もし、絨毛間腔で起きているこの現象を、妊娠初期の母体末梢血からの情報で知ることができれば妊娠早期にPIHの発症を予知することが可能となる。

母体血漿中には、胎盤由来の cell-free RNA が比較的安定な状態で循環していることが知られている (1)。RNase が豊富に存在する血液内で RNA が分解を免れているのは、血中において RNA 分子は何かにかまわれて保護された状態にいるためと考えられている。Valadi ら(2)は、細胞内の多胞体から放出される直径 50~100nm の小胞であるエクソゾームの中に mRNA や miRNA(microRNA)が含まれていることを報告し、Luo ら(3)は絨毛癌細胞株である BeWo 細胞に miRNA を導入し、その miRNA を内部に封入したエクソゾームが細胞外に放出されることを報告している。これらのことから母体血漿中に循環している cell-free RNA はエクソゾームに包まれた状態で存在していることが示唆される。エクソゾームに内封された mRNA は血中で安定であるばかりでなく、他の細胞に移行して機能を発現させ、細胞間の局所的コミュニケーションを媒介することが報告されている(2)。近年、血管内皮増殖遺伝子である VEGF(vascular endothelial growth factor)をサイレンシングする核酸医薬の開発途中で興味深い報告がなされた。その報告によれば、21 塩基以上の長さを有する siRNA(small interfering RNA)であれば、どのような塩基配列の siRNA でも(たとえ RNA 干渉作用を有さない siRNA であっても)、VEGF を標的とした siRNA と同程度にマウスモデルの血管新生を抑制する、とされている(4)。この血管新生抑制作用は toll 様受容体 3 (TLR3) と 2 本鎖 RNA が複合体を形成することによって引き起こされると考えられており、複合体を形成するのに必要な RNA の最小の長さは 21 塩基であった。妊娠初期の絨毛は TLR3 を豊富に発現していること(5)、絨毛間腔には絨毛から放出されたエクソゾームが高密度に存在していることから、絨毛間腔において TLR3 を介した small RNA による新生血管の抑制は十分に起こりうる現象である。また、2 本鎖 RNA は TLR3 を介して絨毛細胞における抗血管増殖因子である soluble fms-like tyrosine kinase-1(sFLT1)の産生を誘導することも報告されている(6)。

これらの事象から我々は、妊娠初期に何らかの原因によって絨毛細胞から small RNA 内封エクソゾームが絨毛間腔へ過剰放出され、エクソゾーム内の small RNA が他の絨毛細胞や血管内皮細胞に移行、そこで非特異的な血管

新生促進関連遺伝子のサイレンシング、抗血管増殖因子の産生誘導が起こり、その結果血管新生が抑制されて PIH が引き起こされる、という仮説を立てた。この仮説が正しければ、PIH を発症する妊婦では妊娠初期の血中エクソゾーム内封 small RNA、特に siRNA や miRNA のサイズである短塩基長の RNA 分画が増加していることになる。

2. 研究の目的

エクソゾーム内封 small RNA の増加によって PIH が引き起こされる、という仮説を検証するために、妊娠早期母体血中エクソゾーム内封 small RNA の絶対量 (total 量および短塩基長、長塩基長に分けた分画の量) を定量・解析し、PIH 発症例と非発症例との差異を明らかにし、エクソゾーム内封 small RNA によって PIH 発症の予知が可能か否か検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

遺伝子を解析することに同意を得られた単胎妊娠婦人 (妊娠 6~19 週) から採取された血漿を材料とした。PIH 非発症例は 80 症例 (138 検体)、PIH 発症例は 6 症例 (9 検体) であった。

(2) エクソゾーム分離と RNA の抽出

total exosome isolation (Life technology Inc) を用いて血漿からエクソゾームを分離し、miRNeasy micro kit(Qiagen)でエクソゾーム内封 small RNA を抽出した。

(3) Chip 電気泳動による small RNA の解析

Agilent small RNA kit を用いて、抽出された RNA 1ul を Agilent 2100 バイオアナライザで電気泳動して RNA のサイズと濃度を解析した。

(4) 統計解析

Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test (Bonferroni correction), Wilcoxon signed rank test を用いた。

4. 研究成果

(1) Chip 電気泳動によるエクソゾーム内封 small RNA の分画

エクソゾーム内封 small RNA を Chip 電気泳動で分画すると、micro RNA 相当にピークを示す分画、65 nt にピークを示す分画、165 nt にピークを示す分画の 3 分画が認められた。(図 1)

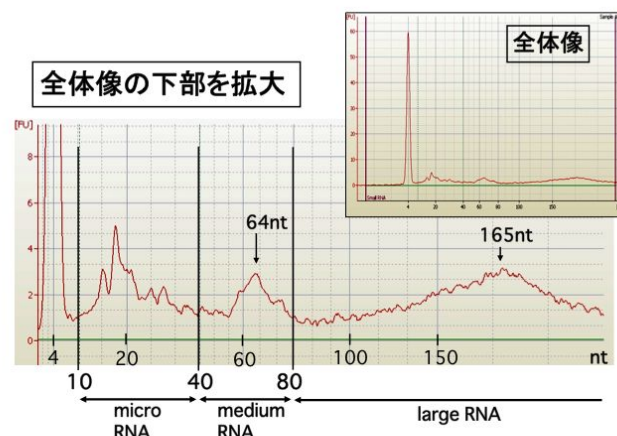


図 1. Chip 電気泳動像の例。妊婦血漿中 exosomal RNA にはサイズの異なる 3 分画 (micro: 10-40 nt, medium: 41-80 nt, large: 81 nt<) が認められた。

10-40 nt までを micro RNA 分画, 41-80 nt を medium RNA 分画, 81 nt 以上を large RNA 分画として解析を行った。

(2)PIH 非発症妊婦血漿中 exosomal RNA

PIH 非発症妊婦について, 妊娠週数と exosomal RNA との相関を検討した結果同じ妊娠週数でも血漿中 exosomal RNA 濃度は個体差が大きく弱い正の相関 ($r=0.247$) しか認められなかった。(図2)

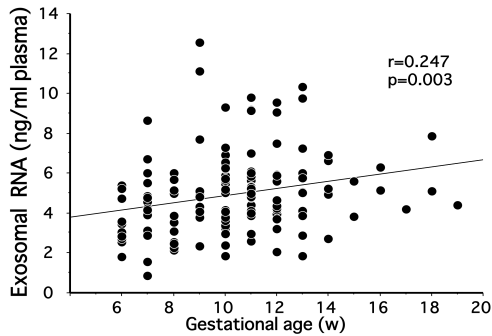


図2. 妊娠週数とPIH非発症妊婦exosomal RNA濃度との相関。妊婦血漿中exosomal RNA濃度は個体差が大きく、弱い正の相関 ($r=0.247$, $p=0.003$) しか認められなかった。

そこで, 妊娠週数を 6~8w, 9~11w, 12~14w, 15~19w の4群に分けて血漿中 exosomal RNA 濃度の変化を検討したところ, 妊娠9~11w, 12~14w では6~8w に比べて有意な exosomal RNA 濃度の増加が認められた(図3)。

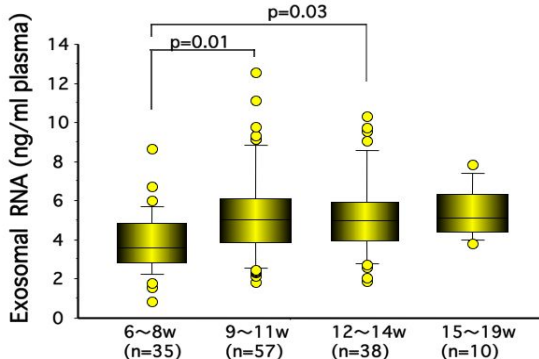


図3. 各妊娠期間におけるPIH非発症妊婦exosomal RNA濃度の変化。妊娠週数により血漿を4群に分けて比較検討すると6~8週より9~14週では exosomal RNA濃度の上昇が認められた。

次に, 各妊娠期間における micro, medium, large RNA 分画の濃度の変化を検討した結果, micro RNA 分画は6~8w に比べて9~11w で増加傾向, medium RNA 分画は6~8w に比べて9~14w で有意な増加を示した(図4)。large RNA 分画は, 各妊娠期間において有意な濃度変化が認められなかった。次に, 同一妊婦における血漿中 exosomal RNA 濃度の経時変化を検討した。妊娠6~8w と9~11w に血漿を採取できた妊婦22例について exosomal RNA 濃度の変化を調べると, micro, medium, large すべての分画で6~8w から9~11w にかけて exosomal RNA 濃度の上昇が認められた(図5)。妊娠9~11w と12~14w に血漿を採取できた妊婦16例, 妊娠6~8w と12~14w に血漿を採取できた妊婦7例では exosomal RNA 濃度の有意な変化は認められなかった。

以上の結果より, PIH 非発症妊婦において血漿中

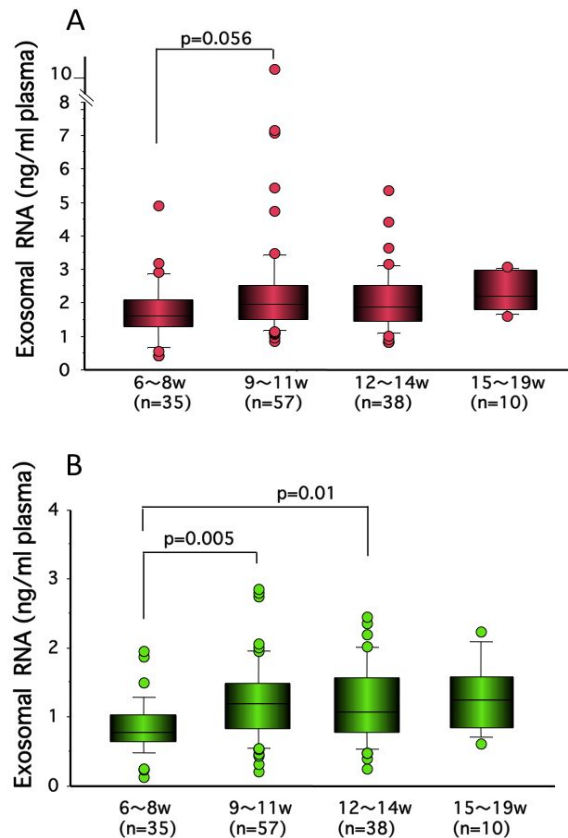


図4. 各妊娠期間におけるPIH非発症妊婦exosomal RNA濃度の変化。A: micro RNA (20-40 nt), B: medium RNA (41-80 nt)。Micro, medium とともに6~8週より9~11週では RNA濃度の上昇が認められた。

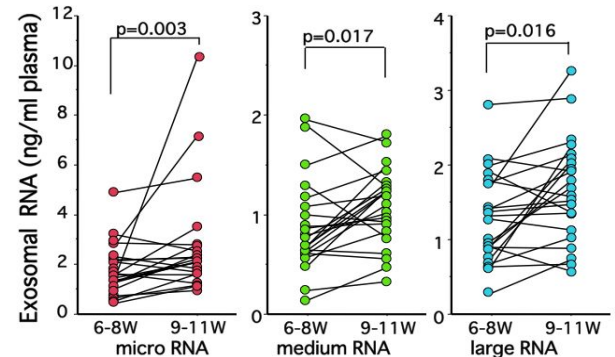


図5. PIH非発症同一妊婦におけるexosomal RNA濃度の経時変化。同一妊婦では6~8週に比べ9~11週では micro, medium, large 分画の全てにおいてRNA濃度の上昇が認められた。

exosomal RNA は妊娠初期, 6~8w から9~11w にかけて増加し, なかでも micro RNA 分画の増加が dominant であることが示された。

(3)PIH 発症妊婦血漿中 exosomal RNA

妊娠初期の血漿を採取できた妊婦の内, 6例が妊娠後期に PIH を発症した。採取された血漿9検体の内訳は, 妊娠6~8w が2検体, 9~11w が3検体, 12~14w が4検体で, 妊娠15w 以降の検体は得られなかった。妊娠週数をマッチングさせて, PIH 非発症妊婦から得られた妊娠6~14w 採取の128検体と PIH 発症妊婦から得られた9検体の exosomal RNA 濃度を比較した。PIH 非発症妊婦の exosomal RNA 濃度の中央値は 4.87ng/ml plasma (range: 0.856~12.56) であったのに対し PIH 発症妊婦では 4.46ng/ml plasma (range: 1.92~5.5) であり, 両群の間に差を認めなかった。また, micro, medium, large RNA 分画の濃度についても比較を行ったが両群の間に差は認められなかった。次に, 各妊娠

期間に分けて exosomal RNA 濃度の比較を行った結果、妊娠 6~8w 群において、例数は少ないものの PIH 発症妊婦(n=2)の exosomal micro RNA 分画の濃度は PIH 非発症妊婦(n=34)に比べて有意に高値を示した(中央値 2.84 ng/ml plasma vs. 1.55ng/ml plasma, p=0.038). medium, large RNA 分画の濃度では両群に差を認めなかった。

(4) 血漿中 exosomal micro RNA 濃度の一過性上昇

同一妊婦から異なる妊娠期間に採取された血漿中の exosomal RNA 濃度を測定して経時的变化を検討する実験において、ペア血漿のうち片方の血漿で micro

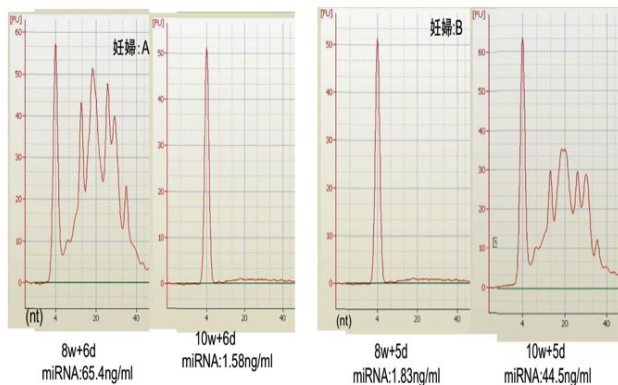


図6. 同一妊婦で見られた exosomal micro RNA 濃度の一過性上昇。

RNA 濃度が高値を示す検体が認められた。(図6)。

本研究において、PIH 非発症妊婦における exosomal micro RNA 濃度の中央値は 2.04ng/ml plasma であったが、これらの micro RNA 濃度高値を示す血漿の micro RNA 濃度は 20~70 ng/ml plasma と PIH 非発症妊婦における 90 パーセンタイル値を遥かに超えていた。また、ペア血漿のもう片方の血漿の micro RNA 濃度は PIH 非発症妊婦における 50 パーセンタイル値の範囲内であるため、この micro RNA 濃度高値は一過性の現象と思われた。micro RNA 濃度の一過性上昇を示すペア血漿は全体の約 17%で認められた。

まとめ

PIH 非発症妊娠婦人において、血漿中 exosomal RNA は妊娠 6~8w から 9~11w にかけて増加した。exosomal RNA 分画の内、特に micro RNA 分画の増加が優勢であることから、妊娠初期において exosomal micro RNA が局所への情報伝達因子として働いている可能性が示唆された。

妊娠 6~8w において、PIH 発症妊婦血漿の exosomal micro RNA 濃度は PIH 非発症妊婦より有意に高値を示した。このことは「絨毛細胞から exosomal micro RNA が過剰産生・放出され、血管新生が抑制されて PIH が引き起こされる」という本研究の仮説を支持する結果であるが、例数が少ないため exosomal micro RNA を PIH の予知マーカーとして利用するには今後さらに例数を増やして検討する必要がある。また、本研究では exosomal RNA の濃度を主に検討したが、その産生源(絨毛由来か母体細胞由来か)についても検討していくべきであると考えられる。

<引用文献>

1. Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al: Presence of fetal RNA in maternal plasma, Clin Chem. 46(11):1832-1834. 2000
2. Valadi H, Eskrom K, Bossio A, et al: Exosomal-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 9:654-659, 2007
3. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, et al: Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. Biol Reprod 81: 717-729, 2009
4. Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, et al: Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. Nature, 452(7187), 591-7, 2008
5. Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB et al: A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. J Immunol 53;8096-8104, 2005
6. Nakada E, Walley KR, Nakada T et al: Toll-like receptor-3 stimulation upregulates sFLT-1 production by trophoblast cells. Placenta 30(9), 774-779, 2009

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)

[学会発表] (計2件)

- (1) 古田伊都子, 山田崇弘, 金内優典, 櫻木範明, 水上尚典. 妊娠婦人の血漿中 exosome に内包される small RNA 濃度の変動. 第 67 回 日本産科婦人科学会 2015 年 4 月 9 日-12 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- (2) 古田伊都子, 山田崇弘, 金内優典, 櫻木範明, 水上尚典. 妊娠婦人血漿におけるエクソソーム内封 RNA の変動. 第 66 回 日本産科婦人科学会, 2014 年 4 月 18 日-20 日, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 伊都子(FURUTA ITSUKO)
北海道大学・大学院医学研究科・助手
研究者番号: 70238682

(2) 研究分担者

山田 崇弘(YAMADA TAKAHIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号: 20419948

(3) 金内 優典(KANEUCHI MASANORI)

長崎大学・大学病院・講師
研究者番号: 60333613