

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592483

研究課題名(和文) 絨毛外絨毛細胞によるらせん動脈リモデリングにおけるmiR-210の機能の検討

研究課題名(英文) The role of miR-210 on arterial remodeling by extravillous trophoblast

研究代表者

板倉 敦夫 (Itakura, Atsuo)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70262897

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)：本研究は、酸素濃度変化に伴い絨毛細胞の表現型を調節するmicroRNAと標的遺伝子を明らかにすることを目的とした。HTR-8/SVneoを低酸素培養すると浸潤能は低下し、miRNA-135bの発現が増加したが、CXCL12の発現は低下した。miRNA-135b過剰発現株では浸潤能が低下し、CXCL12の発現は低下した。CXCL12中和抗体添加では浸潤能が低下した。ルシフェラーゼアッセイでは、CXCL12のプロモータ領域がmiRNA-135bの標的配列であることを示した。低酸素環境では、絨毛細胞中のmiRNA-135bがCXCL12の発現を抑制し、その細胞浸潤能を調節していると考えた。

研究成果の概要(英文)：The expression of numerous miRNAs in the trophoblasts changes under low oxygen conditions. The aim of this study was to identify those miRNAs and their target genes associated with the trophoblast invasion under low oxygen conditions. Culturing the extravillous trophoblast (EVT) cell line, HTR-8/SVneo, at 2% oxygen as compared to 20% oxygen suppressed trophoblast invasion that correlated with increased expression of microRNA-135b (miR-135b) and decreased expression of its predicted target gene CXCL12. Overexpression of miR-135b suppressed CXCL12 mRNA expression and invasion of HTR-8/SVneo cells. Adding a neutralizing antibody against CXCL12 to the culture medium suppressed HTR-8/SVneo cell invasion. Reporter assays showed that the 3'UTR sequence of CXCL12 was directly targeted by miR-135b. Our results suggest that miR-135b and CXCL12 play important roles in modulating the EVT invasion under low oxygen conditions.

研究分野：医学 産科学

キーワード：絨毛細胞 マイクロRNA らせん動脈 ルシフェラーゼアッセイ マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

局所の酸素濃度によって、絨毛外絨毛細胞は表現型を変える。妊娠初期は低酸素環境で増殖型となり、妊娠 10-12 週ごろに酸素濃度が上昇し浸潤型となることが知られている<sup>1, 2)</sup>。絨毛外絨毛細胞は脱落膜内に浸潤し、母体のらせん動脈の平滑筋、血管内皮細胞を置換する。この現象はらせん動脈のリモデリングであり、妊娠中の子宮-胎盤血流の増加に重要な働きを示す。また妊娠高血圧腎症ではこのリモデリングが不十分で、高血圧、胎児発育不全の原因となっていることが近年明らかとなっており、この表現型の移行は妊娠生理および妊娠高血圧腎症の発症機序解明に重要である<sup>3)</sup>。しかし、絨毛外絨毛細胞の表現型の変化に関する分子レベルでのメカニズムは十分に明らかとされていない。このメカニズムにマイクロ RNA が関与していると考えて検討を行うこととした。今回の研究を開始前に行った予備実験では、その網羅的検索から miR-210 が有力候補であったため、この研究タイトルをこのようにした。

2. 研究の目的

当初の背景より、本研究の目的を酸素濃度の変化による絨毛外絨毛細胞の表現型変化におけるマイクロ RNA の関与とその標的遺伝子を同定し、その働きを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) ヒト絨毛外栄養膜細胞株である HTR-8/Svneo を 2%, 20% の酸素下で培養し、MTS 試験によって増殖能を、Boyden chamber を用いた invasion assay によって浸潤能の変化を検討した。

(2) 次にそれぞれの酸素濃度下での HTR-8/Svneo miRNA マイクロアレイ法 (G4872A Human Rel. 16.0, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), mRNA マイクロアレイ法の発現変化を GeneChip® 30IVT Expression Kit (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) で検討し、細胞浸潤能に関与する miRNA と標的分子候補を IPA software (Ingenuity® Systems; www.ingenuity.com) を用いて抽出した。

(3) HTR-8/Svneo に発現ベクター mirVana™ miRNA mimics (Applied Biosystems) を用いて miRNA-135b を過剰発現、siRNA を用いて発現抑制を行い、invasion assay によって細胞浸潤能の変化を検討した。またこれらの発現調節を行った細胞株での CXCL12 の発現を調べた。

(4) CXCL12 の中和抗体 CXCL12/SDF-1 monoclonal antibody (MAB310; R&D Systems, Abingdon, UK) を添加培養して invasion assay を行い、浸潤能の変化を検討した。対照には mouse immunoglobulin (Ig) G1 Isotype Control (MAB002; R&D

Systems) を添加した。

(5) ルシフェラーゼアッセイで miR-135b が CXCL12 の 3'UTR にある特定領域が miR-135b の標的配列であるかを確認した。

4. 研究成果

(1) 2% 酸素下で HTR-8/Svneo は 20% 酸素下と比較して、MTS 試験は有意差を認めず、invasion assay では 24 時間、48 時間のいずれの培養でも有意な低下を示した。低酸素によって、浸潤能が低下するこの細胞株は、酸素濃度による浸潤能に関して、この細胞培養でも表現型の変化を示すことが確認された (図 1)。

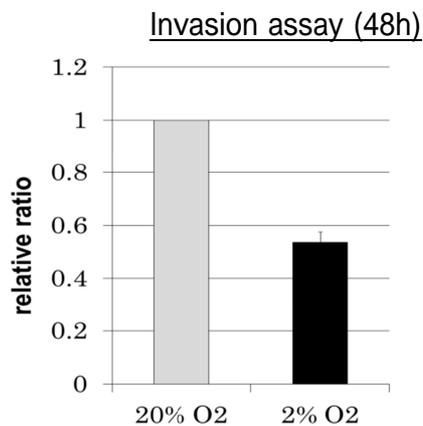


図 1 異なる酸素濃度下での HTR-8/Svneo の浸潤能

(2) 低酸素によって発現が亢進するマイクロ RNA を 5 種類、低下するマイクロ RNA を 5 種類が表現型変化に関与するマイクロ RNA と考え、解析を行った。準備段階では miR-210 が関連 miRNA であると考えていたが、低酸素で発現増加した miRNA を詳細に検討したところ、この miRNA は浸潤能に影響する標的分子との関連は薄かった。一方低酸素で発現増強する miR-135b は、細胞浸潤に感作する CXCL12 との関連がその配列より示唆されたため、標的分子と考えて解析を進めた (図 2)。

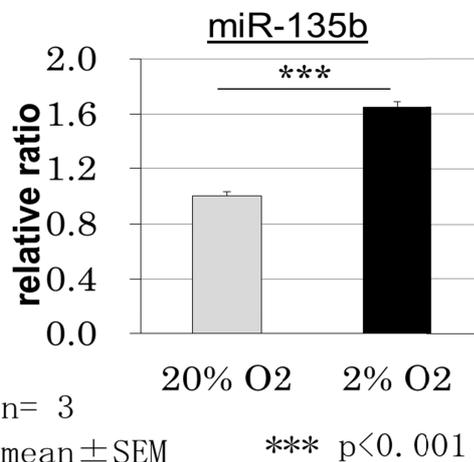


図 2 miR-135b 過剰発現株の CXCL12 mRNA 発現

(3)HTR-8/Svneo の miRNA-135b 過剰発現株で浸潤能の低下、siRNA で発現抑制株では、浸潤能の変化は見られなかった。一方、CXCL12 の発現はそれぞれの株で減少、増加がみられた (図 3、4)

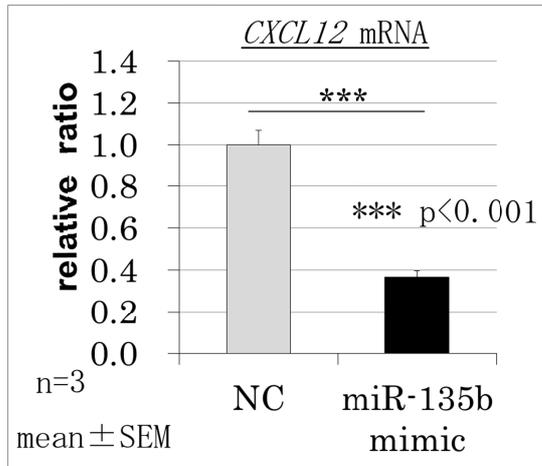


図 3 miR-135b 過剰発現株の CXCL12 mRNA 発現

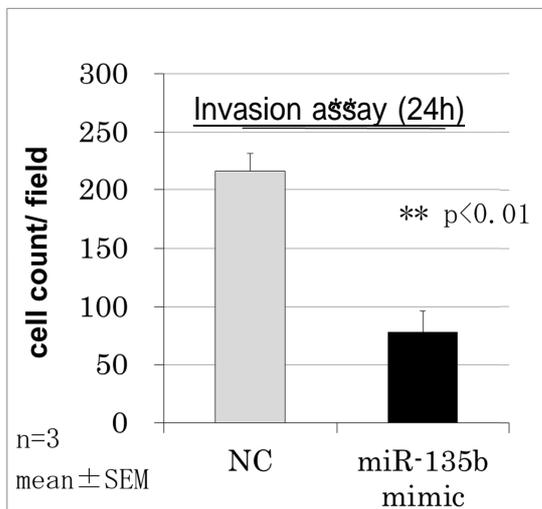


図 4 miR-135b 過剰発現株の細胞浸潤能

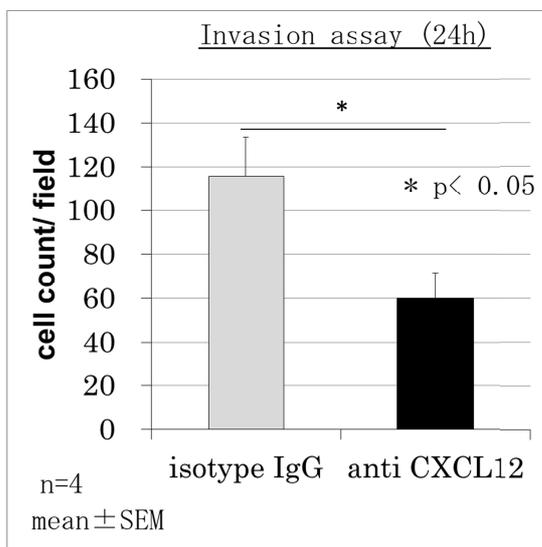


図 5 CXCL12 中和抗体添加下の細胞浸潤能

(4)CXCL12 の中和抗体を添加すると、HTR-8/Svneo の浸潤能は抑制された (図 5)

(5)miR-135b mimic は、CXCL12 3' UTR-Luciferase の蛍光発色を減弱させ、その mutation では変化をさせなかったことから、miR-135b は CXCL12 のプロモーター領域で発現調節を行っていることが明らかとなった。(図 6,7)

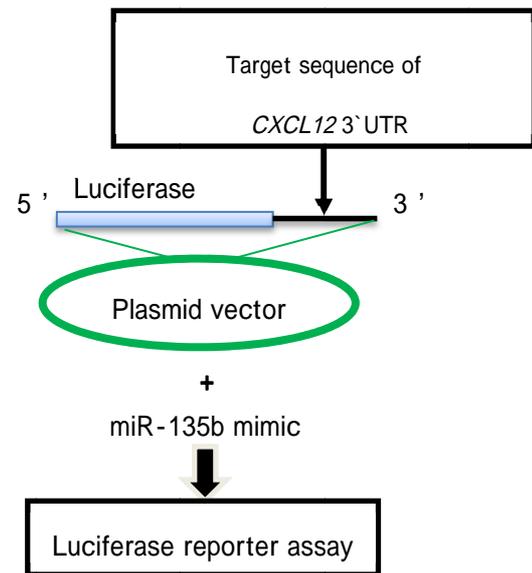


図 6 本研究におけるルシフェラーゼアッセイの概要

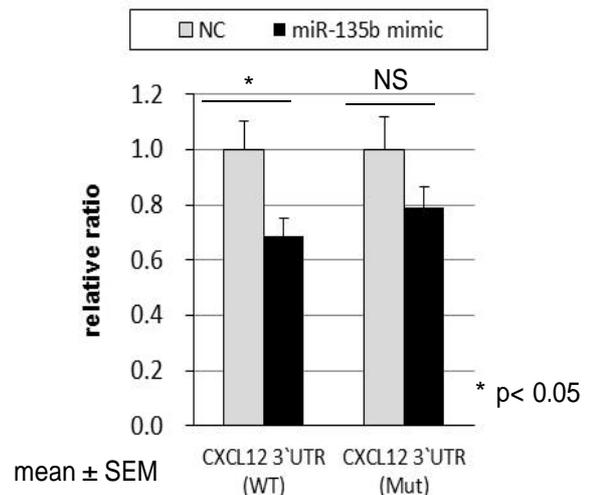


図 7 ルシフェラーゼアッセイでみた miR-135b による CXCL12 発現変化

今回の検討で絨毛外栄養膜細胞株である HTR8/Svneo は低酸素培養下でマイクロ RNA miR-135b の発現を亢進させ、ケモカインの 1 種である CXCL12 のプロモーター領域に miR-135b が結合し、CXCL12 遺伝子の転写を阻害することにより、その発現を抑制した。さらに CXCL12 は中和抗体添加実験

により、HTR8/Svneo の浸潤能を低下させた。  
以上の結果より、浸潤能に関する酸素濃度による絨毛細胞の表現型の変化は、miR-135b を介した、CXCL12 の発現抑制による経路があることが示された。これまでも、絨毛細胞の表現型変化に関する分子メカニズムは報告されているが、miR-135b を介した調節については今回の報告が初めてである。絨毛細胞初代培養による低酸素による浸潤能の低下に関しては、すでにコンセンサスが得られているが、HTR8/Svneo に関しては、異なる結果を示している報告もみられる。しかし miR-135b はこれまでも、直腸がん、肺がん、甲状腺がんの浸潤能に関与していることが報告されている。さらに今回の検討で初めて明らかとなった miR-135b の標的遺伝子産物の CXCL12 は、線維芽細胞、血管内皮細胞低酸素において HIF-1 を介して、低酸素での発現低下を認めている。さらに今回の検討で CXCL12 の中和抗体を添加した検討でも、HTR8/Svneo の浸潤能を低下させた。これらの結果から、この実験系における HTR8/Svneo は、低酸素で miR-135b の発現調節を介して CXCL12 を低下させ、細胞浸潤能を抑制したと考えて矛盾がない。

絨毛細胞浸潤不全によるらせん動脈のリモデリング異常が、妊娠高血圧腎症の原因とされている。今回の検討で明らかとなった miR-135b は in vivo においても、絨毛細胞での発現を認めている。さらにその標的分子である CXCL12 は、妊娠中に血中濃度が上昇することが報告されており、これらの分子がヒトの胎盤形成においても、重要な役割を果たしていることが推定できる。今後これらの分子の発現変化を絨毛細胞初代培養で確認することにより、さらにこれらのエビデンスは明確になると考える。

らせん動脈リモデリングに関係する絨毛細胞の浸潤メカニズムに大きく影響することから、今後妊娠高血圧腎症での miR-135b と CXCL12 の発現を確認することにより、妊娠高血圧腎症発症の予知につながり、発現調節が可能となれば発症予防にもつながる可能性がある。

#### <引用文献>

Genbacev O, et al. Regulation of human placental development by oxygen tension. Science.1997; 277: 1669-72.

Caniggia I, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). J Clin Invest. 2000;105:577-87.

Tuuli MG, et al. Oxygen and trophoblast biology--a source of controversy. Placenta. 2011; 32 Suppl 2:S109-18.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tamaru S, Mizuno Y, Tochigi H, Kajihara T, Okazaki Y, Okagaki Y, Kamei Y, Ishihara O, Itakura A. MicroRNA-135b suppresses extravillous trophoblast-derived HTR-8/SVneo cell invasion by directly down regulating CXCL12 under low oxygen conditions. Biochem Biophys Res Commun 2015; 461: 421-426 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.055.

〔学会発表〕(計4件)

Tamaru S, Mizuno Y, Tochigi H, Kondo H, Kajihara T, Okazaki Y, Kamei Y, Ishihara O, Itakura A. microRNA-135b dependent CXCL12 expression controls invasion of extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells under hypoxia. 46th ICP 2014. 9. 18-20 (Keio Plaza Hotel Tokyo)

Tamaru S, Mizuno Y, Tochigi H, Kondo H, Kajihara T, Okazaki Y, Kamei Y, Ishihara O, Itakura A. microRNA dependent CXCL12 expression under hypoxia controls invasion of extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells. IFPA. 2014 (lesCordeliers, Paris, France)

田丸 俊輔 板倉 敦夫 梶原 健  
亀井 良政 石原 理  
妊娠初期絨毛外栄養膜細胞において酸素濃度により発現変動するマイクロ RNA とその標的遺伝子の網羅的解析と細胞浸潤能への関与  
第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会  
2014 年 4 月 (東京国際フォーラム 東京)

田丸 俊輔 水野 洋介 梶原 健  
岡崎 康司 亀井 良政 石原 理  
板倉 敦夫  
妊娠初期 EVT 細胞の脱落膜浸潤に関わるマイクロ RNA と標的遺伝子の網羅的解析  
第 21 回日本胎盤学会学術集会 2013 年 10 月 (ウインクあいち 名古屋 愛知)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

板倉 敦夫 (ITAKURA, Atsuo)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 7 0 2 6 2 8 9 7

(2)研究分担者

梶原 健 (KAJIHARA, Takeshi)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 8 0 2 8 6 1 0 3