

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659737

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群と胎盤特異的miRNA：発症予知と母子間のクロストーク

研究課題名(英文) Preeclampsia and placenta-specific microRNA

研究代表者

斉藤 裕 (SAITO, HIROSHI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：30119193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠初期絨毛の発達に関連するmicroRNA(miRNA)を抽出した。正常妊娠経過を示す妊娠6週と11週の妊婦から絨毛組織を採取し、マイクロアレイを用いてその発現パターンの変化を比較した。抽出したmiRNAについてのRT-PCR法での定量した結果でも、miR-520b、miR-520c、miR-520eの発現は6週に比べ妊娠11週で低下しており、また、miR-30a-5p、miR-100-5p、miR-362-5pは発現が上昇していた。このことから、妊娠6週から妊娠11週間のmiRNA発現に生理的な変化があることを確認するとともに、これらが妊娠合併症の発症に関連する可能性を確認した。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether there is a distinctive signature of microRNAs in the early stages of placentation by profiling the microRNA expression in chorionic villous samples at 6 and 11 weeks of gestation. Villous samples were collected from women at 6 and 11 weeks of gestation. Microarray approach was carried out to demonstrate differential miRNA expression between villous samples at 11 vs. 6 weeks of gestation. RT-PCR analysis was used to confirm the miRNA differential expression. Microarray identified 10 up-regulated miRNAs and 9 down-regulated miRNAs at 11 weeks compared with 6 weeks. Interestingly, 55% of those down-regulated miRNAs belong to the miRNA cluster coded in the 19q13.42. RT-PCR validated the lower expression of miR-520b, -520c and -520e and the higher expression of miR-30a-5p, -100-5p and -362-5p at 11 weeks. In conclusion, alterations on the expression of these miRNAs during placental development might have a role in later complications of pregnancy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 産婦人科学

キーワード：miRNA 絨毛細胞 胎盤形成期

1. 研究開始当初の背景

1) 母体血中の胎盤特異的 miRNA

miRNAはタンパク質をコードしない20数塩基単位の短いRNAで、転写後の遺伝子発現の調節因子としてエピジェネティックな遺伝子発現調節を行っている。また、miRNAは臓器に特徴的な発現プロファイルを示すことから個体発生や細胞の分化に重要な役割を果たすと考えられている。また、miRNAには胎盤特異的なものがあり、それらが胎盤の絨毛細胞よりエクソサイトーシスという膜動輸送によってエクソゾームとして分泌され、母体血中を循環することが確認されている。胎盤特異的なmiRNAは胎盤の分化と妊娠の維持、あるいは免疫応答に深く関与していると考えられる。また、PIHなど特定の妊娠合併症に関連するmiRNAが存在する。このように胎盤が産生し、母体血中を循環するmiRNAが、どのように母体の細胞に取り込まれ、何をtargetとして、どのように遺伝子発現を調整しているのかについてはいまだに明らかではない。

2) PIHの病態と発症予防

胎盤は、PIHの発症に大きく関与している。PIHは全妊娠の3-5%に発症する妊娠に特異的な症候群であり、妊産婦死亡の主要な原因の1つである。我々は、これまでにPIHについて検討を重ねてきており、妊娠後期にPIHを発症する胎盤で観察されるのと同じ遺伝子変化が既に、妊娠11週の絨毛細胞に起っていると報告している(Prenat Diagn, 2008; Prenat Diagn, 2011)。

さらに、母体血漿中 cell-free RNA や細胞成分由来 RNA を用いて妊娠 11 - 14 週、妊娠 15 - 20 週にその後の PIH の発症を高精度に予知できることを報告してきた(Obstet Gynecol 2006; AJOG 2008; AJOG 2009; AJOG 2011)。しかし、その検査の最大の障壁は、母体血中の胎児由来成分の濃度の低さである。しかし、miRNA はその小さなサイ

ズにもかかわらず、母体血中で極めて安定であり、量的にも相当量あることがわかっており、妊娠合併症の予知などに、cell-free mRNA と同様かそれ以上の強力な分子マーカーとなると期待される。

2. 研究の目的

胎盤に特異的で、PIH で発現変化する miRNA の種類を妊娠初期、妊娠後期絨毛のアレイ解析で同定した上で、母体血漿中に浮遊する当該 miRNA の定量を行い、miRNA を用いた PIH の発症予知マーカーを同定し、その臨床応用の可能性を検討する。

また、母体循環中に移行した胎盤特異的な miRNA がどのような細胞に作用しているかを検討するため、母体血中の各細胞分画を FACS 法で分離し、その細胞中での miRNA 量を定量し、母体細胞中への移行を確認する。さらに、移行が確認された miRNA は培養細胞内で遺伝子導入により過剰発現させ、その細胞の機能への影響を検討することで、母児間での miRNA を介した分子レベルの crosstalk の一端を解明する。

3. 研究の方法

(研究 1)

miR-17 と miR19b は miRNA 17-92 クラスターの代表的な miRNA である。最初のステップとして、胎盤形成期の妊娠初期絨毛での miRNA の変化についての検討を行うとともに、流産絨毛との違いについても検討した。

(研究 2)

妊娠初期の miR-17 と miR19b 発現量の変化を検討するとともに、miR-17 と miR19b の主要な標的遺伝子の発現との相関を検討する。

絨毛は 20 週以前に妊娠中断した 38 人の女性から採取した。また、妊娠高血圧症候群を発症し帝王切開を行った妊婦 13 人、妊娠週

数をマッチさせた正常な妊娠経過で選択的帝王切開を行った妊婦 13 例から帝王切開時に絨毛を採取して real time RT-PCR 法でその発現を定量した。

(研究 3)

妊娠 6 週から 11 週の胎盤形成期に絨毛細胞の miRNA 発現がどのように変化するかを解明する目的で、正常妊娠経過を示す妊娠 6 週と 11 週の妊婦から絨毛組織を採取し、マイクロアレイを用いてその発現パターンの変化を比較した

4. 研究成果

(研究 1)

流産例では microRNA-17 および -19b は、ともに、低下していることを確認した。この miRNA のターゲット遺伝子 (PTEN, CREB-1, TGFβ-1, TGFβ-RII) を検討したところ、PTEN は、流産群で有意に高発現であったが、その他の遺伝子には有意な変化は見られなかった (論文 1)。この結果は、MicroRNA 17-92 クラスターが妊娠初期に発現しており、これらが絨毛細胞の浸潤に関与している可能性を推測させるとともに、その機能不全は胎盤形成異常をおこしてその後の妊娠予後に影響する可能性を示唆した。

(研究 2)

胎盤での miR-19b 発現は妊娠後期に向けて低下したが、miR-17 には有意な変化は認めなかった。miR-17 と miR-19b 発現は妊娠高血圧腎症胎盤でともに有意に高発現であった。(relative expression 2.0, 95%CI: 0.4-12.6 and 2.2, 95%CI: 0.3-30.3 respectively, $P < 0.05$). これらの miRNA が発現に影響すると考えられる遺伝子の内、HIF-1α (relative expression 1.7, 95%CI: 0.4-8.9, $P < 0.05$) と TIMP-2 (relative expression 1.9, 95%CI: 0.4-14.7, $P < 0.05$) はともに妊娠高血圧腎症胎盤で有意に高発現であった。

今回の検討では miRNA-19b は妊娠経過に

伴い減少すること、および miRNA-19b が妊娠高血圧腎症の胎盤で発現亢進していることを明らかにした。このことは、胎盤の成熟に伴い miR-19b 発現が減少していくが、妊娠高血圧腎症の胎盤では、miR-19b は高値で、胎盤の機能的には未熟である可能性が示唆され、miRNA-19b が胎盤形成において主要な因子であることを示すデータである。この成果は以下の論文として投稿している。

Walter Ventura, Keiko Koide, Junko Yotsumoto, Kyoko Hori, Ryu Matsuoka, Kiyotake Ichizuka, Akihiko Sekizawa, Hiroshi Saito. Placental expression of microRNA-17 and 19b is up-regulated in preeclampsia, submitted

(研究 3)

正常妊娠経過を示す妊娠 6 週と 11 週の妊婦から絨毛組織を採取し、マイクロアレイを用いてその発現パターンの変化を比較した結果、発現レベルが 2 倍以上増加した miRNA は 10 種、また、減少した miRNA は 9 種であった。興味深いことに発現が減少した miRNA の 55% は 19q13.42 の miRNA のクラスターが存在するという領域にコードされたものであった。RT-PCR 法で定量的に再評価した結果でも、miR-520b、miR-520c、miR-520e の発現は 6 週に比べ妊娠 11 週で低下しており、また、miR-30a-5p、miR-100-5p、miR-362-5p は発現が上昇していた。このことから、妊娠 6 週から妊娠 11 週の間 miRNA 発現に生理的な変化があることを確認するとともに、胎盤形成期のこの発現変化が、妊娠後期に発症する胎盤に由来するとされる妊娠合併症の発症に何らかの関連を持っていることを確認した。この成果についても、論文投稿準備中である。

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)

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Placental expression of microRNA-17 and -19b is down-regulated in early pregnancy loss. Ventura W, Koide K, Hori K, Yotsumoto J, Sekizawa A, Saito H, Okai T. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013 Jul;169(1):28-32. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.01.025.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 齋藤 裕
(Hiroshi Saito)
昭和大学医学部(教授)

研究者番号：30119193

(2)研究分担者 関沢 明彦
(Akihiko Sekizawa)
昭和大学医学部(教授)

研究者番号：10245839

(3)連携研究者 四元 淳子
(Junko Yotsumoto)
昭和大学医学部(特別研究生)

研究者番号：30553648