

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861513

研究課題名(和文) exosomal microRNAをもとにした周産期予後マーカーの新規開発

研究課題名(英文) Development of the novel perinatal prognostic marker based on exosomal microRNA

## 研究代表者

間瀬 有里 (Mase, Yuri)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20641624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：目的：イクソーム中に検出可能なmiRNA を出生直後の臍帯血から得、新生児予後に役立つ基礎実験とすること。

方法：予定帝王切開を対象に、臍帯動脈血、臍帯静脈血を採血し血清からイクソームを分離。さらにイクソームからRNAを抽出した。RNAよりmiRNA をビオチン標識し、アレイ上にハイブリダイズ。アレイキャッチによりシグナルを検出。シグナルを解析用ソフトウェアを用い解析した。

結果：臍帯動脈血、臍帯静脈血ともにイクソーム由来のmiRNAを検出した。とくにC19MC由来のmiRNAの発現が認められたことから、母体・胎盤・胎児間miRNA loop の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Purpose: To utilize basic experiment of neonatal medicine, exosomal microRNA from umbilical cord blood immediately after birth was examined.

Methods: Serum blood was collected from umbilical artery and vein at the cases of uncomplicated cesarean section. Exosomes were purified from serum and exosomal RNA was extracted from exosomes. Thus, microRNAs were biotinylated, hybridized on an array and stained. After that, array signals were detected by the array scanner. Analyzing the expression intensity with analytical software. And the comparison between intensity from the umbilical artery and from vein was examined.

Results: Expression of microRNA from C19MC was observed in both umbilical artery and vein. Thus, the existence of microRNA loop traveling maternal-placental-fetal circumstances was suggested. Quantification of the expression was examined by real-time PCR on specific microRNAs which had significantly expressed with array signals.

研究分野：医歯薬学

キーワード：産科学 周産期 エクソソーム マイクロRNA 臍帯血

## 1. 研究開始当初の背景

Valadi H らが、血中にエクソソームによって放出された miRNA が検出可能であることを報告して以後、エクソソーム中の miRNA を検出し、その機能解明や疾病とのかかわり、臨床への応用など、様々な研究が試みられています。

Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Valadi H, Ekström K, et al. Nat Cell Biol. 9 654-659. 2007

申請者らが所属する日本医科大学産婦人科では、同大学分子解剖学教室との共同研究により、胎盤特異的な miRNA をプロファイリングし、また、これらの miRNA の中に、エクソソームを介して胎盤の栄養膜から母体血中に放出されていることを見出しています。

Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, et al. Biol Reprod. 81 717-729. 2009

申請者の間瀬有里は、日本医科大学大学院医学研究科在籍中に、顆粒膜細胞株における組織特異的 miRNA のプロファイリングと、その機能解析を行い、miRNA についての理解を深めて来ました。

MiR-21 is enriched in the RNA-induced silencing complex and targets COL4A1 in human granulosa cell lines. Mase Y, Ishibashi O, Ishikawa T, et al. Reprod Sci. 19:1030-1040. 2012

産婦人科領域、とりわけ、周産期領域において、妊娠時の特異的な miRNA や、妊娠高血圧症候群などの異常妊娠時の特異的な miRNA を解析することは、妊娠現象や異常妊娠の理解に役立つほか、診断のツールや新たな治療戦略に役立つ可能性を持っています。

長崎大学の Yoshida, Masuzaki らが先駆的な検討を行っています。

Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. Miura K, Miura S, Yamasaki K, et al. Clin Chem. 56 1767-1771. 2010

一方、間瀬が所属する日本医科大学産婦人科でも、同大学分子解剖学教室との共同研究から、異常妊娠特異的な miRNA として、妊娠高血圧症候群特異的な miRNA のプロファイリングと、その機能解析を行っています。

Hydroxysteroid (17 $\beta$ ) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for

predicting preeclampsia. Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, et al. Hypertension. 59: 265-273. 2012

しかし、世界的にも母体血清中 miRNA についての検討は、多く行われているものの、それまでの妊娠状態・胎児の状態を反映していると思われる臍帯血についての検討はあまり多くなされていません。

そこで、今回、臍帯血に見出される exosome 中の miRNA をプロファイリングし、機能解析を行うことで、在胎中の児の状態や、周産期予後を診断するツールになり得るか、詳細な検討を行うことを想起しました。

## 2. 研究の目的

エクソソーム中に検出可能な miRNA を出生直後の臍帯血から得、新生児の状態や予後に役立てる基礎実験とすることを目的としました。

## 3. 研究の方法

合併症の無い予定帝王切開症例において、児を娩出後、臍帯をダブルクランプし、絨毛間腔からの母体血混入を阻止したうえで、血清分離剤入り真空採血管を用いて臍帯動脈血、臍帯静脈血を採血しました。30分静置後、血清を吸引・抽出し、冷凍保存しました。

エクソソーム抽出キット Total Exosome Isolation Kit from Serum (Thermo Fisher Scientific. MA, USA) を用いてエクソソームを血清から分離。さらに、RNA 抽出キット Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific. MA, USA) を用いてエクソソーム中の RNA を抽出しました。

得られたエクソソーム由来の totalRNA より、FlashTag™ HSR Biotin RNA Labeling kit (Affymetrix. CA, USA) により miRNA をビオチン標識し、miRNA array ver.4.0 (Affymetrix)を用いてアレイ上に miRNA をハイブリダイズさせ(48 , 16 時間)、Fluidics Station 450 (Affymetrix)を用いて染色後、GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix)によりシグナルを検出しました。なお、アレイ解析に先立ち、抽出された RNA の確認には、Nanophotometer (Implen. Munich, Germany) を用いて totalRNA を定量しました。

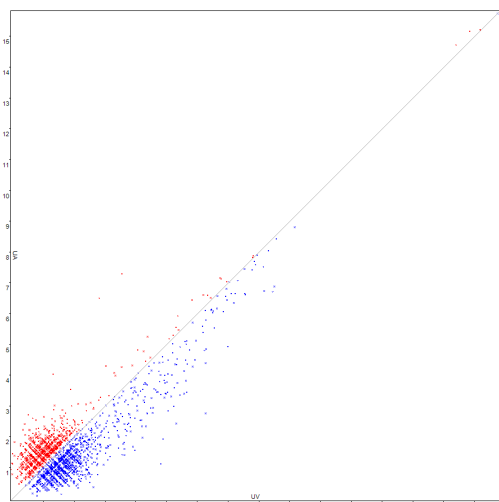
得られた結果を、解析用ソフトウェア Expression Console™ software 1.4 (Affymetrix) Transcriptome Analysis Console 3.0 (Affymetrix) を用いて解析。臍帯動脈血血清中エクソソーム由来と、臍帯静脈血血清中エクソソーム由来とで発現を比較しました。

## 4. 研究成果

アレイスキャナにより検出したシグナルは、Tukey's biweight algorithm により発現強度が示され、臍帯動脈、臍帯静脈ともに、

抽出したエクソソームから miRNA を検出しました。

Gene Avg Signal (log2) により示された発現強度として、とくに強く発現している miRNA が確認されました。また、One-Way Between-Subject ANOVA により、臍帯動脈血由来と臍帯静脈血由来との比較において、特異的に強く発現している miRNA について検討を行いました。



【図】 Transcriptome Analysis Console 3.0 (Affymetrix) による、臍帯動脈血清中エクソソーム由来の miRNA (赤) と、臍帯静脈血清中エクソソーム由来の miRNA (青) の発現 (Gene Avg Signal (log2) による) を示す。

エクソソーム抽出の検証実験として、抗 CD63 抗体を用いた Immuno Biotting を施行していますが、サンプルによっては、エクソソームに一致した泳動バンドが十分に見出せなかったものもあり、また、total RNA の定量においても、収量にはばらつきがありました。臍帯動脈血と臍帯静脈血とでは、臍帯動脈血に上記の問題が多く認められていました。本問題点からは、安定したエクソソーム抽出のためには、採血手技とその後のハンドリングに課題があるものと思われました。

良好にエクソソームが抽出されたサンプルから、臍帯動脈血、臍帯静脈血ともに、C19MC (第 19 番染色体 microRNA クラスタ) 由来の microRNA 49 種類について、いずれの発現も認められました。これにより、母体・胎盤・胎児間の miRNA loop の可能性が示唆されました。

現在、なかでも特異的に強く発現した miRNA (仮称 miR-A, miR-B, miR-C の 3 種類) について、リアルタイム PCR によって定量を行い、投稿準備中です。

## 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〕

帝王切開後に急性心不全を発症した二絨毛膜二羊膜性双胎の一例 角田 陽平, 飯田朝子, 稲垣 知子, 高屋 茜, 黒木 睦実, 佐藤 杏月, 閻瀬 有里, 針谷 幸代, 古市 直子, 深見 武彦, 松島 隆, 米山 剛一 関東連合産科婦人科学会誌 52 巻 3 号 P415 2015

妊娠中期に診断した胎児腋窩リンパ管腫合併妊娠の 1 例 小谷野 麻耶, 深見 武彦, 伊藤 友希, 飯田 朝子, 針金 幸代, 川端 英恵, 柿栖 睦実, 山口 道子, 閻瀬 有里, 奥石 太郎, 川端 伊久乃, 松島 隆, 土居 大祐, 朝倉 啓文 神奈川産科婦人科学会誌 52 巻 1 号 P112 2015

妊娠管理に苦慮した巨大子宮腺筋症合併妊娠の 1 例 伊藤 友希, 山口 道子, 川端 伊久乃, 柿栖 睦実, 佐藤 杏月, 閻瀬 有里, 松村 好克, 深見 武彦, 松島 隆, 米山 剛一, 朝倉 啓文, 竹下 俊行 日本周産期・新生児医学会雑誌 51 巻 2 号 P693 2015

一絨毛膜二羊膜性双胎(MD twin)一児死亡の緊急腹式帝王切開術後に診断された拡張型心筋症の 1 例 伊藤 友希, 閻瀬 有里, 飯田朝子, 針金 幸代, 川端 英恵, 柿栖 睦実, 山口 道子, 奥石 太郎, 川端 伊久乃, 深見 武彦, 松島 隆, 土居 大祐, 朝倉 啓文 日本医科大学医学会雑誌 10 巻 4 号 P225 2014

先天性 QT 延長症候群合併妊娠の 1 例 泰井 幸代, 稲垣 知子, 田村 俊之, 柿栖 睦美, 佐藤 杏月, 山口 道子, 閻瀬 有里, 西田直子, 立山 尚子, 松島 隆, 土居 大祐, 朝倉 啓文 関東連合産科婦人科学会誌 51 巻 2 号 P252 2014

妊娠 25 週で発症した胎児母体間輸血症候群の 1 例 佐藤 杏月, 柿栖 睦実, 稲垣 知子, 山口 道子, 閻瀬 有里, 立山 尚子, 西田直子, 深見 武彦, 朝倉 啓文 日本医科大学医学会雑誌 9 巻 4 号 P268-269 2013

## 〔学会発表〕

19 番染色体上にクラスターを形成する胎盤特異的 miRNA について. 第 23 回日本胎盤学会学術集会 ワークショップ 3 「胎盤研究の新展開」倉品隆平, 神戸沙織, 閻瀬 有里, 石川 源, 瀧澤俊広, 竹下俊行. 2015

癒着胎盤病理検体に見るマイクロ RNA の発現解析. 第 23 回日本胎盤学会学術集会 シンポジウム 「癒着胎盤の基礎と臨床」石川源. 2015

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

間瀬 有里 (Yuri Mase)  
日本医科大学医学部助教  
研究者番号： 20641624

(2)研究協力者

石川 源 (Gen Ishikawa)  
日本医科大学医学部講師  
研究者番号： 20287767