

表 題 栄養膜細胞に発現している長鎖ノンコーディング RNA・H19
由来の miR-675-5p の機能解析

論文の区分 博士課程

著 者 名 小古山 学

担当指導教員氏名 大口 昭英 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 生殖・発達医学
専攻科 母子保健学

2021年1月8日申請の学位論文

目次	頁
略語表	2
遺伝子名表記	3
I. 要旨	4
II. 緒言	6
III. 方法	14
IV. 結果	22
V. 考察	34
VI. 結語	40
VII. 補足	41
VIII. 謝辞	45
IX. 参考文献	46

略語表

ATP	adenosine tri-phosphate
CK	cytokeratin
CVT	chorionic villous trophoblast
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EVT	extravillous trophoblast
FBS	fetal bovine serum
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
IL	interleukin
JAK	janus kinase
lncRNA	long non-coding RNA
miRNA	microRNA
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP	matrix metalloproteinase
NC	negative control
NK	natural killer
ncRNA	non-coding RNA
PBS	phosphate buffered salts
PCR	polymerase chain reaction
PGF	placental growth factor
PL	placental lactogen
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
RB	retinoblastoma
siRNA	small interfering RNA
sncRNA	short non-coding RNA
STAT	signal transduction and activator of transcription
TGF	transforming growth factor
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial growth factor

遺伝子名表記

Gene symbol	Gene Name
<i>BHLHE41</i>	basic helix-loop-helix family member e41
<i>CD44</i>	CD44 molecule
<i>CDH1</i>	cadherin 1
<i>CDKN1A</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 1A
<i>CHMP1A</i>	charged multivesicular body protein 1A
<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine ligand 10
<i>CXCL12</i>	C-X-C motif chemokine ligand 12
<i>DDB2</i>	damage specific DNA binding protein 2
<i>DRD2</i>	dopamine receptor D2
<i>EMILIN1</i>	elastin microfibril interfacier 1
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>GATA2</i>	GATA binding protein 2
<i>GPR55</i>	G protein-coupled receptor 55
<i>H19</i>	H19 imprinted maternally expressed transcript
<i>IGF1</i>	insulin-like growth factor 1
<i>IGFR1</i>	insulin-like growth factor 1 receptor
<i>IL4</i>	interleukin 4
<i>IL6</i>	interleukin 6
<i>IL8</i>	interleukin 8
<i>ING5</i>	inhibitor of growth family member 5
<i>LCN2</i>	lipocalin 2
<i>MMP2</i>	matrix metalloproteinase 2
<i>MMP9</i>	matrix metalloproteinase 9
<i>MMP13</i>	matrix metalloproteinase 13
<i>MMP14</i>	matrix metalloproteinase 14
<i>MMP15</i>	matrix metalloproteinase 15
<i>NOG</i>	noggin
<i>NODAL</i>	nodal growth differentiation factor
<i>NOMO1</i>	NODAL modulator 1
<i>TP53</i>	tumor protein p53
<i>PGF</i>	placental growth factor
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog
<i>RB1</i>	RB transcriptional corepressor 1
<i>REPS2</i>	RALBP1 associated Eps domain containing 2
<i>RUNX1</i>	RUNX family transcription factor 1
<i>SMAD5</i>	SMAD family member 5
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A

I. 要旨

胎盤形成において、妊娠初期に絨毛栄養膜細胞(chorionic villous trophoblast: CVT)から分化した絨毛外栄養膜細胞(extravillous trophoblast: EVT)が母体脱落膜や子宮筋層、らせん動脈へ“浸潤”することは極めて重要である。EVTの浸潤不全は胎盤の低酸素状態・虚血を引き起こし、妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの疾患の原因となる。現時点ではEVT浸潤の詳細な調節機構は十分に明らかになっていない。本研究では、胎盤に高発現している long non-coding RNA (lncRNA) *H19*から産生され、様々な腫瘍形成に関与することが報告されている *miR-675-5p*に注目し、*miR-675-5p*がEVT浸潤に関与しているのではないかと仮説を立て、その機序も含めて検証した。

まず、ヒト妊娠初期胎盤からEVTとCVTを分離培養し、lncRNA *H19*と *miR-675-5p*の発現解析を行うと、これらはCVTに比べてEVTで有意に高発現していることが分かった。また、lncRNA *H19*および *miR-675-5p*は妊娠後期胎盤に比べて、初期胎盤で有意に高発現していた。続いて、細胞浸潤アッセイにより、*miR-675-5p*がEVT細胞株の浸潤能を有意に促進させることを確認した。さらに、*in silico*解析により得られた *miR-675-5p*の標的遺伝子の候補の中から、細胞浸潤能に関与する転写調節遺伝子 *GATA2*が *miR-675-5p*によって直接抑制されることをルシフェラーゼレポーターアッセイで確認した。また、EVT細胞株の *GATA2*の発現を抑制してもその浸潤能は有意に促進された。EVT細胞株において、*miR-675-5p*の過剰発現、*GATA2*抑制いずれにおいてもMMP13、MMP14の発現が有意に亢進していた。以上の実験結果から、妊娠初期胎盤に特に高発現している lncRNA *H19*由来の *miR-675-5p*はEVT浸潤を促進しており、胎盤形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。その機序の一つとして、

miR-675-5p を介した転写調節因子 *GATA2* の抑制による細胞浸潤促進因子 MMP13、MMP14 の発現亢進が関与している可能性がある。

II. 緒言

胎盤構造は、母体血液で満たされた絨毛間腔に浮遊して母児間のガス交換や栄養物質の伝達を担う浮遊絨毛と、母体脱落膜や子宮筋層へ浸潤して胎盤を固定する絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast: EVT) に大別される (図1)。

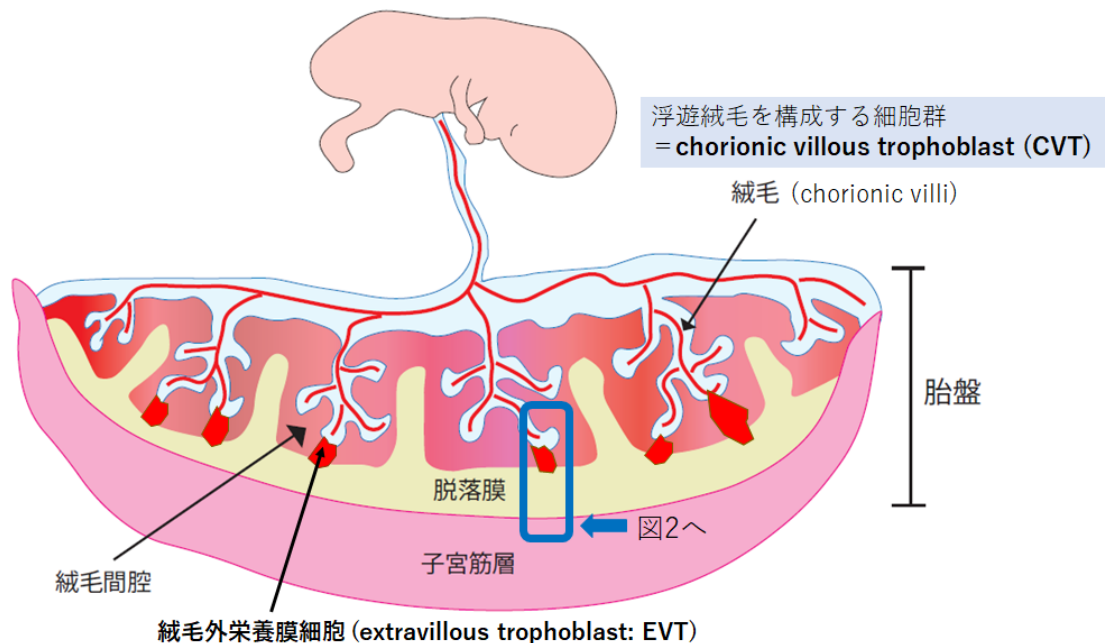


図1. 胎盤構造

浮遊絨毛を主に形成している絨毛栄養膜細胞 (chorionic villous trophoblast: CVT) は外側の合胞体性栄養膜細胞と内側の細胞性栄養膜細胞の2層構造から成っている (図2)。合胞体性栄養膜細胞は、直接母体血と接しており母児間の物質伝達やホルモン産生などの機能を担っている。一方、細胞性栄養膜細胞は強い分化能を有しており融合して合胞体性栄養膜細胞になるが、一部は EVT へと分化していく (図2) (1, 2)。EVT は浮遊絨毛を子宮に固定させるだけでなく、絨毛間腔へ母体血液を運ぶ子宮らせん動脈壁にも浸潤して血管壁を再構築させる役割

も持っている。らせん動脈の血管平滑筋が EVT に置換されることで血管壁は収縮性を失って拡張し、母体血液が絨毛間腔へより多く流入できるようになる(図2)(2-4)。この過程は母児間の効率的なガス交換、栄養物質伝達に寄与している。したがって、EVT の母体脱落膜や子宮筋層、らせん動脈への“浸潤”は胎盤形成において極めて重要な過程である。

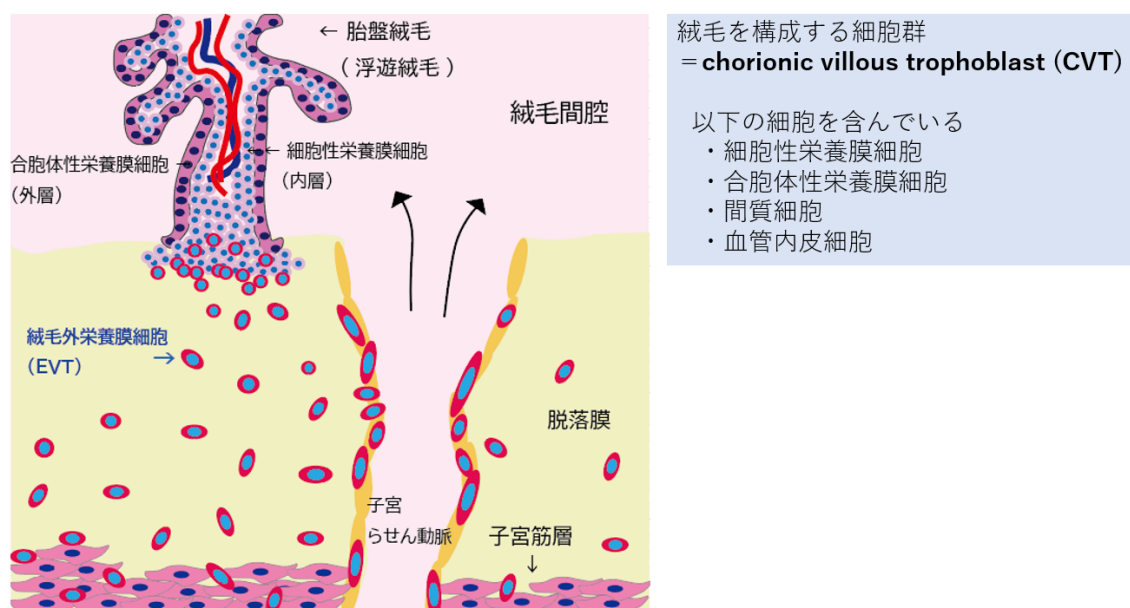


図2. 妊娠初期の栄養膜細胞の分化、EVT の浸潤

EVT の浸潤の特徴は、“妊娠初期にのみみられる現象であること”と、“子宮筋層の1/3ほどのところで停止すること”である(2, 4)。一方で適切な時期や深さの EVT 浸潤がみられない場合、様々な妊娠関連疾患を発症することが分かっている。妊娠高血圧症候群(母体高血圧+蛋白尿、臓器障害)や胎児発育不全は、EVT の浸潤不全によりらせん動脈の拡張不全から絨毛間腔への十分な血液流入が起こらず、胎盤低酸素状態・虚血による胎盤形成不全が原因と考えられている(図3)(2, 5, 6)。一方、過度の EVT 浸潤は、分娩時に胎盤が剥離せず多量出血や子宮摘出を必要とすることもある癒着胎盤をひきおこす(7)。

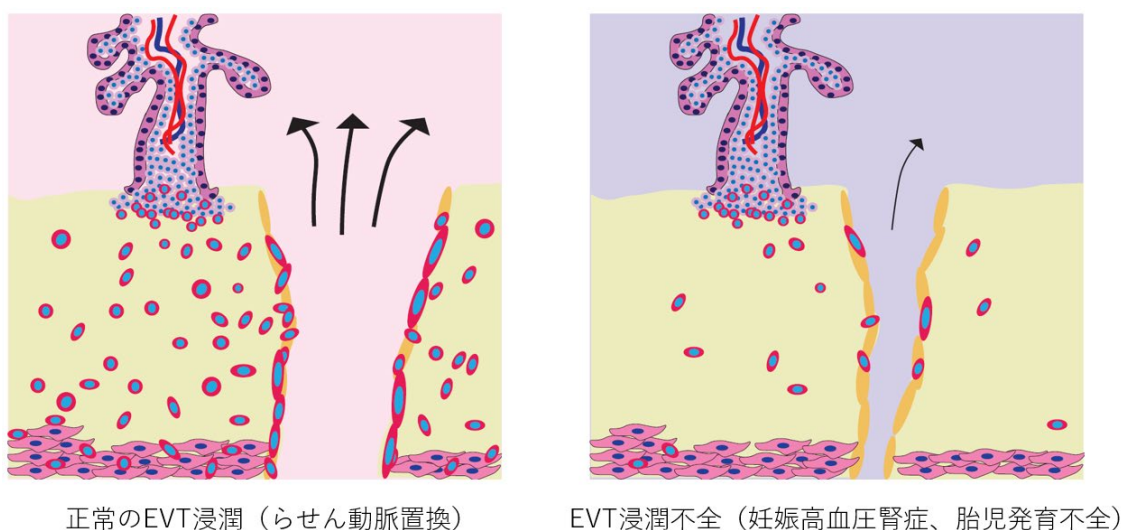


図 3. 妊娠初期正常の EVT 浸潤および EVT 浸潤不全

EVT の浸潤制御機構については以下のことが分かっている。まず、妊娠初期（10 週ごろ）に子宮脱落膜から動員されたマクロファージやナチュラルキラー細胞（子宮ナチュラルキラー細胞：uNK 細胞）により MMP9 などのメタロプロテアーゼが働くことで子宮らせん動脈の血管平滑筋や血管内皮細胞がアポトーシスする(8)。そこに子宮脱落膜から分泌される血管新生因子(VEGF、PGF[placental growth factor]、MMP2、MMP9)やサイトカイン(CXCL12、CXCL10、IL-4、IL-6、IL-8) (8-11)によって細胞外マトリックス(CDH など)が破壊され(11-13)、EVT 細胞の子宮脱落膜や筋層への浸潤が促進する。妊娠初期の胎盤は低酸素状態にあり、子宮脱落膜からの VEGF、PGF などの血管新生因子の発現がより亢進し、EVT の浸潤を促す(14)。浸潤した EVT 細胞により子宮らせん動脈の血管壁は置換され、リモデリング（再構築）が起こる。子宮らせん動脈の血管壁が伸展・拡張することで豊富な血液が絨毛間腔へ供給されるようになる。前述のように、EVT 細胞の浸潤は妊娠初期（18 週ごろまで）で停止する。このように、EVT 細胞の浸潤には

様々な因子が関与しているが、それぞれの因子の発現・作用の詳細な制御機構は十分には分かっていない。

今回、我々は EVT 浸潤と non-coding RNA (ncRNA) の関係に注目した。ncRNA とは、タンパク質をコードしない RNA と定義された遺伝子群である。ncRNA は同定された当初は生理機能を持つとは考えられていなかったが、多くの研究者により様々な ncRNA が多くの機能を持つことが報告されてきた(15)。ncRNA は、その塩基長に基づき約 20-50 塩基長の short non-coding RNA (sncRNA) と 200 塩基長以上の long non-coding RNA (lncRNA) に大別される(16)。sncRNA の中で代表的なものとして約 20-25 塩基長の microRNA (miRNA) が挙げられる。miRNA はヒトでは約 2,000 種が同定されており、標的遺伝子 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' untranslated region: 3' UTR) に結合して翻訳の抑制や分解を介した遺伝子抑制を行っている(17)。細胞の増殖や分化をはじめとした様々な生理学的過程には多くの miRNA の遺伝子調節が関与していると考えられている。lncRNA はヒトでは約 25,000 種が同定されており、近年、それらのいくつかについては局在や機能について少しずつ明らかになってきているものもある(18, 19)。lncRNA 遺伝子種により、①クロマチン修飾因子を遺伝子に運ぶガイド、②転写調節因子などを遺伝子のプロモーターに誘導するシグナル、③タンパク複合体の骨組み (scaffold)、④miRNA と結合しその機能を抑制するおとり (decoy)、などの様々な機能を持つことが報告されている(図 4) (20, 21)。したがって、lncRNA や miRNA をはじめとした ncRNA の中には、胎盤発達においても様々な遺伝子の発現調節を担う node としての役割を担うものがあると考えられる。

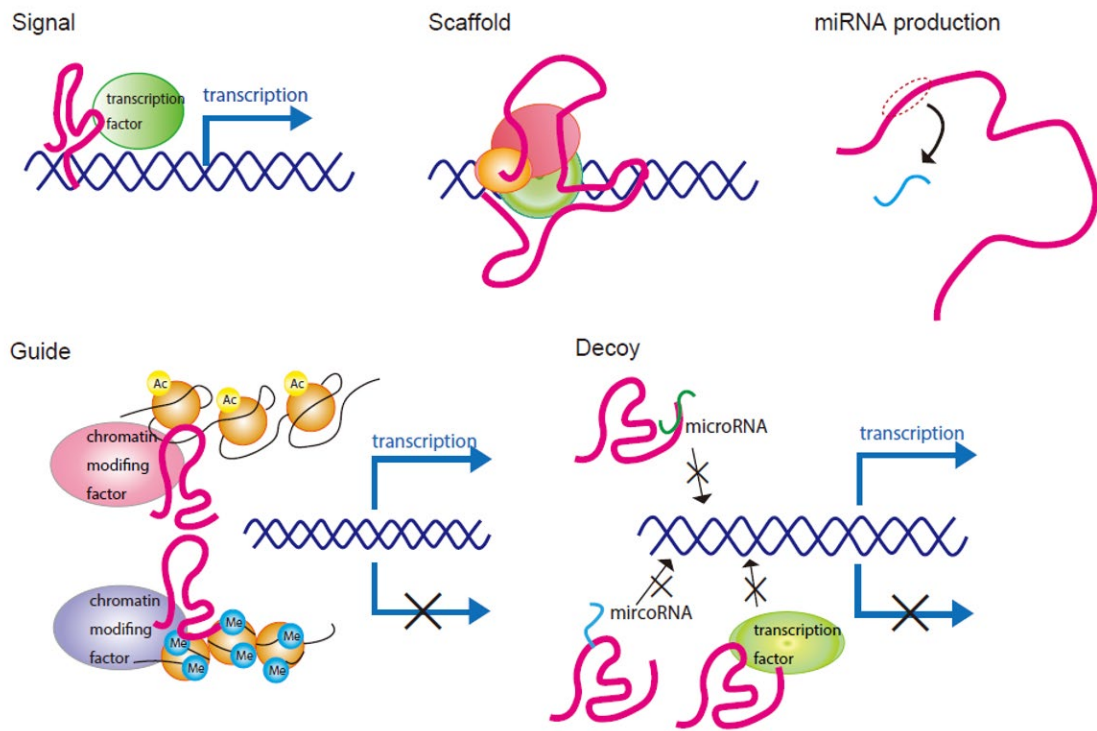
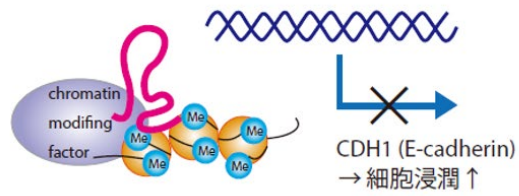


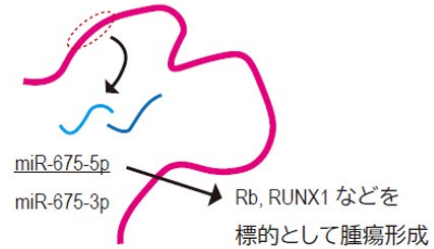
図 4. 様々な lncRNA の機能 (一部)

本研究で私は、lncRNA *H19* に注目した。*H19* は 11 番染色体に座位するインプリンティング遺伝子で、母親由来のアレルから転写される (maternally expressed imprinting gene) (22)。*H19* は多くの腫瘍組織で高発現しており、転写調節、miRNA 抑制、腫瘍抑制遺伝子 *p53* の抑制などを行っている多くの癌領域の研究で報告されている (図 5) (23-25)。また、*H19* はヒトの胎芽および胎盤栄養膜細胞にも高発現しているが、出生後の各種組織や細胞ではその発現が抑制されることが特徴的である (図 6) (26)。*H19* は自身が lncRNA として機能するだけでなく、miRNA (*miR-675-5p* および *miR-675-3p*) を産生することも分かっている (図 5) (27)。ヒト胎盤において、*miR-675-5p* の発現は *H19* と関連していることが示されている (28)。これらより、*H19* および *miR-675-5p* は胎盤形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。

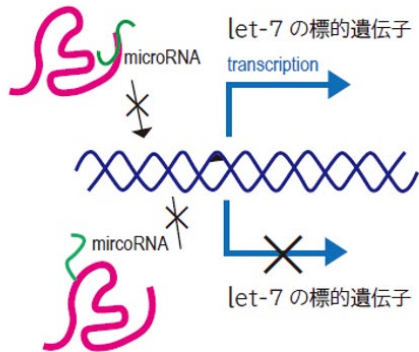
- クロマチン凝集による遺伝子抑制 (E-cadherin)
Luo, et al. Cancer Lett. 2013



- miR-675 産生
Keniry A et, al. Nat. Cell. Biol. 2012



- microRNA との競合 (miR-let7 など)
Kallenn A et, al. Mol. Cell. 2013



- p53 の抑制
Yang S, et al. FEBS.J. 2012

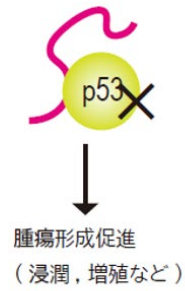


図 5. 腫瘍領域で報告されている lncRNA *H19* の機能 (一部)

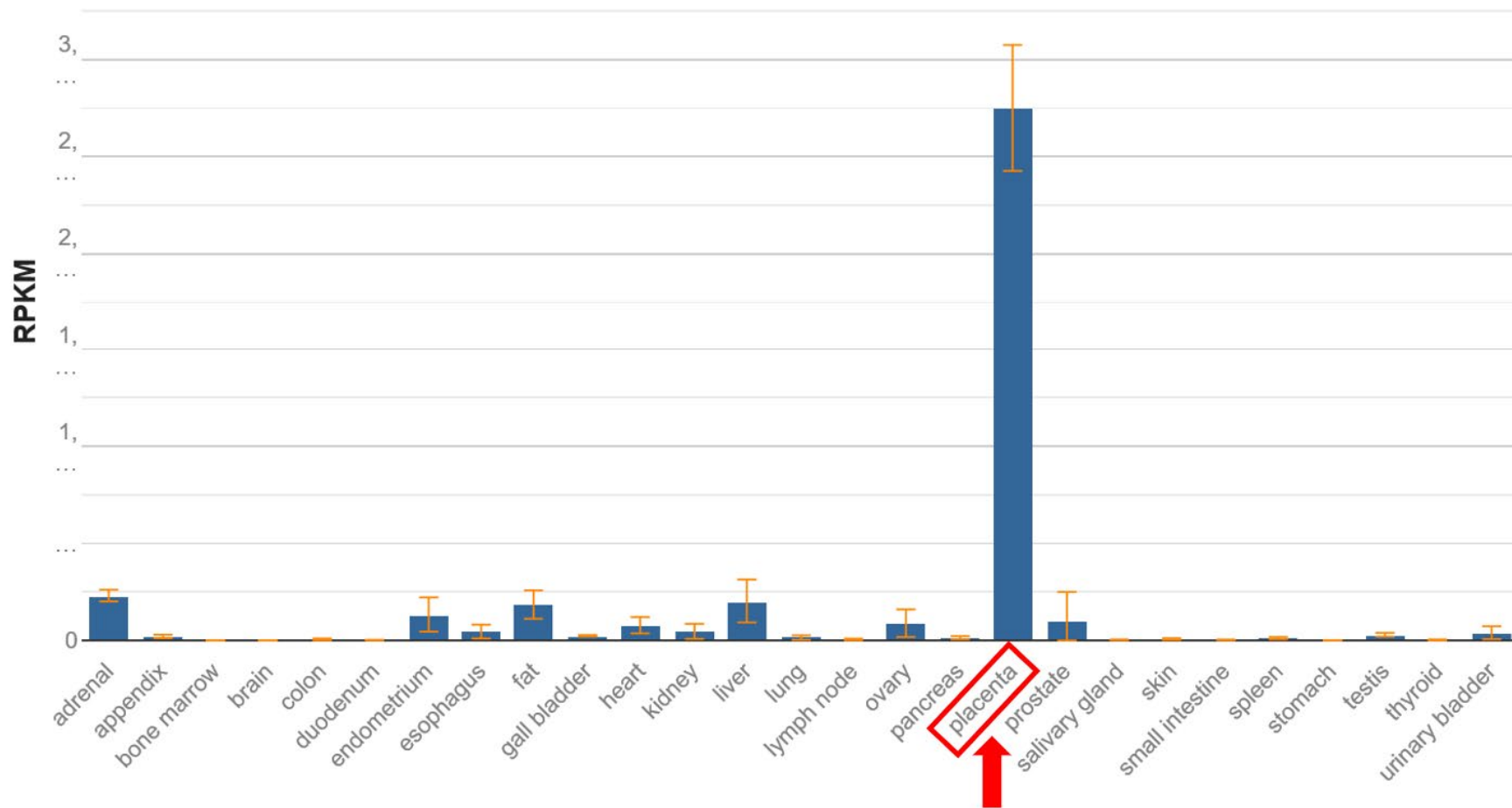


図 6. ヒト各臓器における lncRNA *H19* の発現量 (RNA シークエンス)

NCBI データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から

これまでいくつかの研究により *H19* および *miR-675-5p* が栄養膜細胞の増殖抑制に関与している可能性があることが報告されてきた(28-31)。一方で、*H19* および *miR-675-5p* の EVT 浸潤における役割について検証した研究はない。興味深いことに、*miR-675-5p* は *H19* と同様に様々な腫瘍組織に発現し、癌細胞浸潤制御に関与していることが報告されている(32-36)。

今回、私は胎盤に高発現している lncRNA *H19* 由来の *miR-675-5p* が妊娠初期の EVT 浸潤に重要な役割を担っているのではないかと仮説を立てた。この仮説に対して、以下について検証した。

1. lncRNA *H19* および *miR-675-5p* の EVT における発現状態
2. *miR-675-5p* が EVT の浸潤に影響を与えているか
3. *miR-675-5p* が EVT 浸潤に影響を与えているのであれば、その標的遺伝子や下流パスウェイとして機能しているものは何か

以上を、ヒト胎盤から回収した栄養膜細胞および EVT 細胞株を用いて検証した。

III. 方法

1. サンプル収集

自治医科大学および日本医科大学の倫理委員会で承認を得たプロトコール(遺 17-変 55 号、遺 17-変 56 号)に同意を得た妊婦から胎盤を回収した。以下に示すリアルタイム PCR 解析に用いるサンプルとして、人工妊娠中絶を行った妊婦から妊娠初期胎盤(妊娠 8-11 週、12 例)を、予定帝王切開術で出産した妊婦から妊娠後期胎盤(妊娠 37-38 週、10 例)を回収した。妊娠初期胎盤の RNA シークエンス解析に用いるサンプルとして、人工妊娠中絶を行った初期妊婦の胎盤(妊娠 7 週、3 例)を回収した。妊娠週数は最終月経で決定したが、必要に応じて妊娠初期の胎児頭殿長により修正した。

2. 細胞培養

実験系にはヒト EVT 由来細胞株の、HTR-8/SVneo 細胞と HChEpC1b 細胞を用いた(37, 38)。培地はともに RPMI1640 (Wako, 大阪)で、HTR-8/SVneo 細胞には 5%のウシ胎児血清(FBS)を、HChEpC1b 細胞には 10%の FBS を添加して使用した。また、後述するルシフェラーゼレポーターアッセイのベクター作成には Jurkat 細胞(ヒト T 細胞性白血病細胞株)を用いた。培地には RPMI1640 に 10%の FBS を添加して使用した。いずれの細胞株も 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。

3. 妊娠初期栄養膜細胞の培養および EVT と CVT 細胞の分離

胎盤栄養膜細胞からの EVT 細胞分離は既報(39)を参考にして行った。妊娠初期胎盤(人工妊娠中絶検体)から絨毛を顕微鏡下で単離後、0.5mm 程度にミンチ化し、RPMI1640 (+ペニシリン+ストレプトマイシン+10%FBS) に浸して I 型コラ

ーゲン培地 (Iwaki, 東京) 上で 48 時間培養した。絨毛先端部から外方発育した卵円形の細胞群を TrypLE Express (Gibco, Carlsbad, California, 米国) を添加し浮遊させて回収し、40 μm 系のナイロンセルストレーナーに通した。遠心、上清除去後にペレットを懸濁し、I 型コラーゲン培地に再び播種した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 4 時間培養し、生着した細胞を分離 EVT 細胞として扱った。一方、ミンチ化した細胞群を CVT 細胞として扱った。

4. RNA シークエンス解析

妊娠初期のヒト胎盤から分離培養した EVT 細胞と CVT 細胞の遺伝子発現比較を RNA シークエンスで行った。mRNA/lncRNA シークエンスと small RNA (miRNA) シークエンスに分けて解析した。まず、同一妊婦の初期胎盤から分離した EVT 細胞と CVT 細胞 (妊娠 7 週、3 例) を上記方法で回収した。各サンプルから RNAiso Plus (Takara, 滋賀) を用いて total RNA を抽出した。それぞれ 1 μg の total RNA から、mRNA/lncRNA シークエンスには TruSeq Ribo-Zero gold LT sample Prep Kit-set A (Illumina, San Diego, California, 米国) を、small RNA(miRNA) シークエンスには Truseq Small RNA Sample Prep Kit-set A (Illumina) を用いてライブラリを作成した。Illumina Miseq sequencing system (Illumina) を用いて mRNA/lncRNA は 300 サイクル、small RNA(miRNA) は 50 サイクルでシークエンスした。得られた結果は統合配列解析ソフトウェアである CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, デンマーク) により miRNA は 26 塩基長のシングルリードとして、mRNA/lncRNA は 151 塩基長のペアエンドリードとして fastq ファイルにまとめた。さらに同ソフトウェアにより、これらのリード配列を、Ensembl Genome Browser (<https://asia.ensembl.org/index.html>) または miRBase データベース (<http://www.mirbase.org/>) に登録のある遺伝子配列に

マッピングすることで各遺伝子の発現量（リードカウント）を求めた。得られたリードのうち、Ensembl Genome Browser (<https://asia.ensembl.org/index.html>) に登録のある mRNA は 17,194 種、lncRNA は 4,370 種で、miRBase データベース (<http://www.mirbase.org/>) に登録のある miRNA は 1,559 種あった。各遺伝子の発現量は edgeR パッケージ (version 3.3.8; Bioconductor, <http://www.bioconductor.org/>) の TMM 法により標準化した。さらに、edgeR を用いて EVT 細胞と CVT 細胞（3 例ずつ）での遺伝子発現を比較解析した。mRNA、lncRNA、miRNA いずれにおいても、EVT 細胞と CVT 細胞間の発現量比 (EVT/CVT) : \log_2 fold change ≥ 1.0 かつ q 値 < 0.05 であったものを有意に発現変動した遺伝子とみなした。

5. リアルタイム PCR 解析

解析対象の胎盤サンプルや培養細胞から RNAiso Plus を用いて total RNA を抽出し、PCR 反応に用いた。PCR 反応には ABI 7300 platform (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, 米国) を用いた。mRNA および lncRNA は SYBR 法 (40) で TB Green Premix Ex Taq (Takara) に設計したプライマーを混合して反応させた。miRNA は Taqman 法 (41) で対象 miRNA ごとに Taqman MicroRNA Assay (Applied Biosystems) を用いて反応させた。内部コントロールとして、mRNA と lncRNA では 18S rRNA を、miRNA では *SNORD44* を用いた。各遺伝子の比較解析は $\Delta \Delta Ct$ 法 (42) で行った。各遺伝子の測定は各々 3 回繰り返して行い、平均値を用いた。lncRNA および mRNA のプライマー配列は補足表 1 に示した。

6. 遺伝子 (オリゴヌクレオチド) 導入

miRNA 過剰発現試験では *hsa-miR-675-5p* mimic (5' -

UGGUGCGGAGAGGGCCCACAGUG-3')を導入し、ネガティブコントロールとして *cel-miR-239b-5p* mimic (5' -UUUGUACUACACAAAAGUACUG-3')を用いた。遺伝子抑制試験では siGATA2 (sense 鎖: 5' -UUCUUGGACUUGUUGGACAUCUCC-3' ; antisense 鎖: 5' -GGAAGAUGUCCAACAAGUCCAAGAA-3')、 siMMP13 (sense 鎖: 5' -GGAGAUUAUGAUGAUACUAATT-3' ; antisense 鎖: 5' -UUAGUAUCAUCAUAUCUCCTT-3')、 siMMP14 (sense 鎖: 5' -CCAGAAGCUGAAGGUAGAATT-3' ; antisense 鎖: 5' -UUCUACCUUCAGCUUCUGGTT-3')、 siRNA ネガティブコントロール (sense 鎖: 5' -UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' ; antisense 鎖: 5' -ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3')を導入した。各 miRNA mimic と siRNA は Ajinomoto Bio-Pharma(大阪)に設計依頼した。miRNA mimic は 50 nM、 siRNA は 20 nM の濃度で lipofectamine 2000 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, 米国)と 4 時間反応させることにより実験細胞に導入した (リポフェクション)。

7. ウェスタンブロットティング

解析対象の細胞から MPER mammalian protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, 米国)を用いて細胞溶解液を回収した。各細胞溶解液を 20 µg ずつゲル [Mini-PROTEN TGX gels (Bio-Rad, Hercules, California, 米国)] のレーンに流し、PowerPac Basic (Bio-Rad)により 200 V、30 分間の設定で電気泳動した。泳動後のゲルを Trans-Blot Turbo Transfer pack (0.2 µm 孔の PVDF メンブレンとろ紙が重なったキット) (Bio-Rad) 上に置き、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad)を用いてタンパク質を PVDF メンブレン上に転写した。メンブレンを各種 1 次抗体に室温で 2 時間反応させ、その後 2 次抗体に室温で 1 時間反応させた。1 次抗体には、rabbit anti-GATA2 (cat. no. 11103-1-A; Proteintech, Rosemont, Illinois, 米国)、

rabbit anti-MMP13 (cat. no. 18165-1-AP; Proteintech)、rabbit anti-MMP14 (cat. no. 14552-1-AP; Proteintech)、mouse anti-GAPDH (cat. no. 60004-1-IG; Proteintech)を、2次抗体にはHRP (horseradish peroxidase)標識抗体 mouse 用 (cat. no. SA00001-1; Proteintech) または rabbit 用 (cat. no. HAF017; R&D, Minneapolis, Minnesota, 米国) を用いた。抗体と反応させたタンパク質は Clarify Western ECL Substrate (Bio-Rad) によりシグナルを得て、Amersham Imager 680 (GE Healthcare, Chicago, 米国) を用いて検出、撮影した。

8. 細胞浸潤アッセイ

細胞浸潤能はマトリゲルを塗布したインサートメンブレンを通過した細胞数をカウントすることで評価した(37)。まず、2%マトリゲルを塗布したインサートチャンバー(8.0 μm 孔)を24 ウェルプレート上に置き、インサート内にFBSを含まない培地を250 μl 、ウェル内にFBS添加培地(HTR-8/SVneo 細胞: 5%、HChEpC1b 細胞: 10%)を800 μl 入れた。上記の遺伝子オリゴヌクレオチド(miRNA mimic または siRNA)を導入し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で24時間培養後に回収した細胞を各インサート内に播種した (HTR-8/SVneo 細胞: 35,000 個、HChEpC1b 細胞: 70,000 個)。HTR-8/SVneo 細胞は播種から24時間後に、HChEpC1b 細胞は48時間後に浸潤能を評価した。インサート内の非浸潤細胞を綿棒で愛護的にふき取り、PBS で洗浄した。インサート底部外側に残った浸潤細胞を2.5%グルタルアルデヒドで固定後に0.5%クリスタルバイオレットで染色した。光学顕微鏡(Olympus, 東京)を用いてHTR-8/SVneo 浸潤細胞は200倍率で、HChEpC1b 浸潤細胞は100倍率で観察した。各ウェル内の5視野の平均細胞数を浸潤能とした。実験は3回繰り返して行い、平均値を用いて比較解析した。

9. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖能は細胞内の ATP (adenosine tri-phosphate) 活性を測定することにより評価した。96 ウェルプレートに HTR-8/SVneo 細胞は 7,500 個、HChEpC1b 細胞は 15,000 個播種し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養後に *hsa-miR-675-5p* mimic (50 nM) またはネガティブコントロールとして *cel-miR-239b-5p* mimic (50 nM) をリポフェクションで導入した。導入から 0、24、48、72 時間後に CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega, Madison, Wisconsin, 米国) を用いて細胞溶解液を回収し、Glomax-Multi Detection System (Promega) で ATP 活性を測定した。実験は 5 回繰り返して行い、平均値を用いて比較解析した。

10. *in silico* 解析による miRNA 標的遺伝子予測

TargetscanHuman release 7.2 ([http://www.targetscan.org/vert_72/;](http://www.targetscan.org/vert_72/)) を用いて miRNA の標的遺伝子候補をリストアップした。

11. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

miR-675-5p の標的遺伝子を同定するためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。ホタルルシフェラーゼ発光ベクターのルシフェラーゼ発現領域より下流 (3' 側) に標的遺伝子候補の 3' UTR 配列を挿入し、*miR-675-5p* とともに EVT 細胞株に導入し培養することでホタルルシフェラーゼ発光量が減衰するかを確認した。まず、ホタルルシフェラーゼ野生型ベクター (標的遺伝子候補の 3' UTR 配列を挿入) と変異型ベクター (標的遺伝子候補の 3' UTR 配列のうち、*miR-675-5p* との相補配列領域を変化させたものを挿入) を作成した。培養した Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞性白血病細胞株) から抽出した RNA から PrimeScript

Reverse Transcriptase (Takara)を用いて cDNA を作成し、ベクター挿入配列 (3' UTR 配列の一部)を PCR 反応で増幅させた。反応に用いた各標的候補遺伝子の 3' UTR 配列増幅用のプライマーの配列は補足表 2 に示す。野生型挿入配列をプラスミドベクター[Zero Blunt TOPO vector (Invitrogen)]でクローニングした。続いて、変異型挿入配列を得るために inverse PCR 法を用いた(43)。Inverse PCR 法は野生型配列挿入ベクターを利用し、変異を得たい配列付近にプライマーを置き増幅する方法である。各標的遺伝子候補の inverse PCR プライマーの配列は補足表 3 に示す。得られた野生型挿入配列と変異型挿入配列は制限酵素(Mlu I と Sac I)を用いて切断し回収し、ホタルルシフェラーゼレポーターベクター [pMIR-REPORT miRNA expression reporter vector containing firefly-luciferase (Thermo Fisher Scientific) (図 7)]と結合させ、ホタルルシフェラーゼ野生型ベクターと変異型ベクターを完成させた。ルシフェラーゼレポーターアッセイには HTR-8/SVneo 細胞を用いた。ホタルルシフェラーゼ野生型ベクター (250 ng)または変異型ベクター (250 ng)とコントロールベクターとしてウミシイタケルシフェラーゼ活性を持つ phRL-TK vector (Promega)を *hsa-miR-675-5p* mimic (20 nM)または *cel-miR-239b-5p* mimic (20 nM)とともにリポフェクションで細胞に導入した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養後に Dual-Luciferase Reporter Assay kit (Promega)で細胞溶解液を回収し、Glomax-Multi Detection System でホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性は内部コントロールのウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正した。実験は 3 回繰り返して行い、平均値を用いて比較解析した。

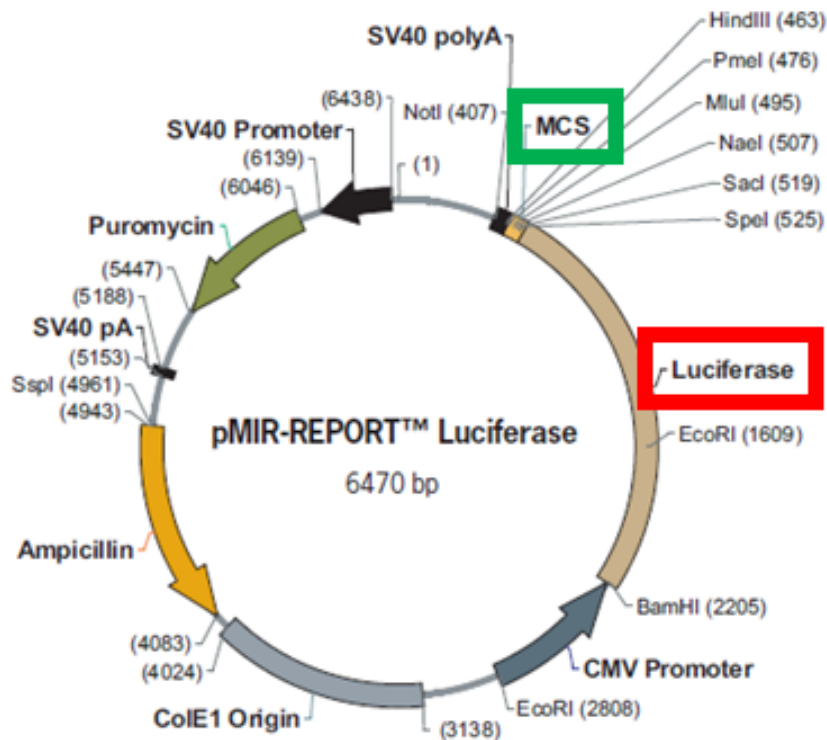


図 7. p-MIR-REPORT ルシフェラーゼベクター (Promega)

プロモーター活性およびホタルルシフェラーゼ発現領域を持つ。ルシフェラーゼ発現領域の 3' UTR 側の MCS (multi cloning site) 内には複数の制限酵素切断領域があり、自由な配列を挿入することができる。

12. 統計解析

本研究の全ての統計解析は IBM SPSS Statistics version 25 (IBM, Armonk, New York, 米国) を用いて行った。連続変数の群間比較は Student's t 検定、Mann-Whitney U 検定、分散分析 (多重検定として Tukey 法) で行った。有意水準 p 値 < 0.05 を有意差ありとした。

IV. 結果

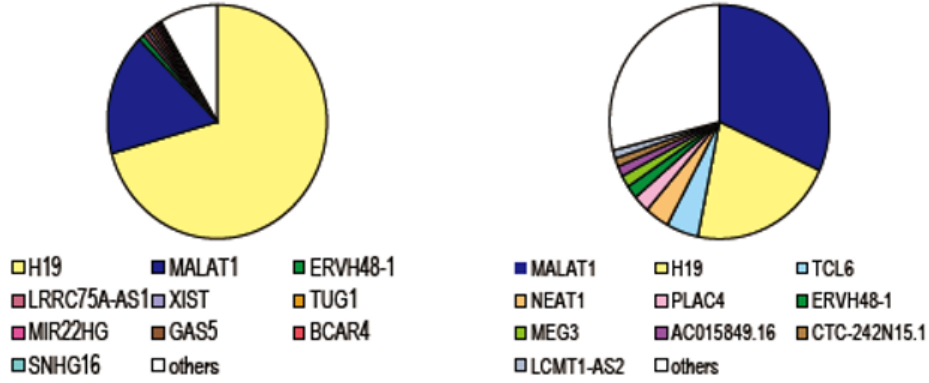
1. lncRNA *H19* と *miR-675-5p* はヒト絨毛外栄養膜細胞に高発現している

妊娠初期胎盤（妊娠 7 週、3 例）から分離した EVT 細胞と CVT 細胞の RNA シークエンス解析の結果、lncRNA *H19* はすべての lncRNA の発現量の合計のうち EVT 細胞では 70.6%、CVT 細胞細胞では 21.3% を占めており、EVT 細胞と CVT 細胞のいずれにおいても発現量の高い lncRNA であることが示された（図 8A）。特に、EVT 細胞では最も高発現している lncRNA であった。EVT 細胞と CVT 細胞の発現比較では、lncRNA *H19* は CVT 細胞に比べ EVT 細胞で有意に高発現していた（図 8B）。lncRNA *H19* 由来の *miR-675* (*miR-675-5p* および *miR-675-3p*) のうち、*miR-675-3p* には EVT 細胞と CVT 細胞間で発現量に有意な差はみられなかったが、今回注目した *miR-675-5p* は EVT 細胞で有意に高発現していた（図 8B）。また、妊娠初期胎盤（8-11 週、12 例）と後期胎盤（37-38 週、10 例）における lncRNA *H19* と *miR-675-5p* の発現比較をリアルタイム PCR で行ったところ、lncRNA *H19* および *miR-675-5p* はいずれも後期胎盤と比較して EVT 浸潤が行われる初期胎盤で有意に高発現していた（図 8C）。これらの解析結果から、我々は lncRNA *H19* 由来で特に妊娠初期の EVT に高発現している *miR-675-5p* の細胞浸潤に関連する機能解析を行うこととした。

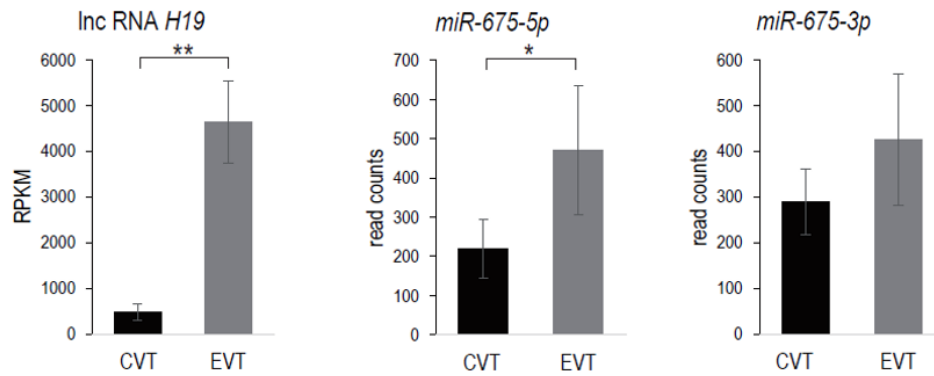
RNA シークエンスにより得られた EVT 細胞および CVT 細胞における mRNA と miRNA の発現割合については補足図 1A、有意に発現変動した遺伝子の染色体座位については補足図 1B に示す。EVT 細胞では有意に発現変動した lncRNA 422 種のうち大部分が (81%) が発現抑制されていた。また、有意に発現変動した miRNA 400 種のうち、14 番染色体上のものは 83 種と多く、その全てが発現抑制されていた（補足図 1B）。

A

絨毛外栄養膜細胞(EVT) 絨毛栄養膜細胞(CVT)



B



C

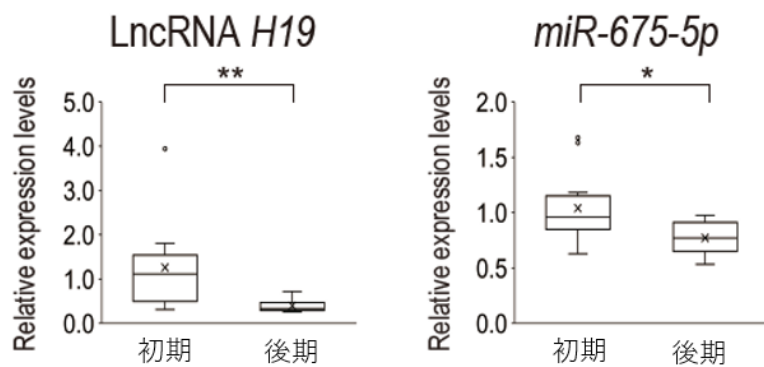


図 8. 栄養膜細胞における lncRNA *H19* および *miR-675* の発現解析

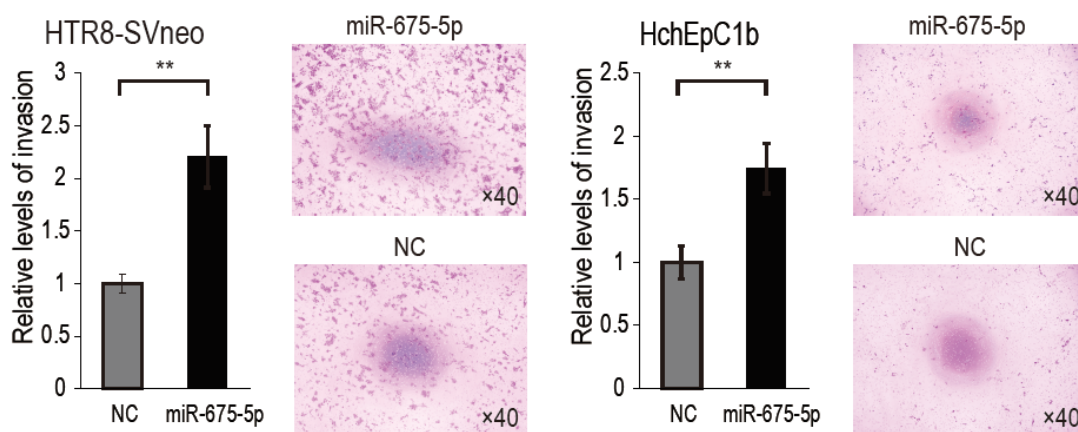
(A) 分離培養した絨毛外栄養膜細胞(EVT、妊娠 7 週、n=3)と絨毛栄養膜細胞(CVT、妊娠

- 7 週、n=3、EVT と同一胎盤から回収)における lncRNA の発現割合 (RNA シークエンス)。各 lncRNA の発現 read 数/全ての lncRNA の発現 read 数の合計で示している。
- (B) EVT(妊娠 7 週、n=3) と CVT(妊娠 7 週、n=3、EVT と同一胎盤から回収)における lncRNA *H19*、*miR-675-5p*、*miR-675-3p* の発現比較(RNA シークエンス)。Mean±SD で表示している。Student' s t 検定、*p<0.05、**p<0.01
- (C) 妊娠初期胎盤(8-11 週、n=12) と後期胎盤(37-38 週、n=10)における lncRNA *H19* および *miR-675-5p* の発現比較(リアルタイム PCR)。Mann-Whitney U 検定、*p<0.05、**p<0.01

2. *miR-675-5p* は絨毛外栄養膜細胞の浸潤を促進する

miR-675-5p の EVT の浸潤能への影響を検証するため、2 種類の EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo 細胞、HChEpC1b 細胞) を用いて細胞浸潤アッセイを行った。*hsa-miR-675-5p* mimic とネガティブコントロールとして *cel-miR-239b-5p* mimic を導入した各細胞株の浸潤能を比較したところ、*miR-675-5p* は HTR-8/SVneo 細胞 および HChEpC1b 細胞の浸潤能を有意に促進した(図 9A)。さらに、我々は *miR-675-5p* の EVT 細胞株の増殖能への影響も検証した。HTR-8/SVneo 細胞、HChEpC1b 細胞ともに *miR-675-5p* はネガティブコントロールと比較して経時的に細胞 ATP 活性に変化を与えず、増殖能への影響はみられなかった(図 9B)。

A



B

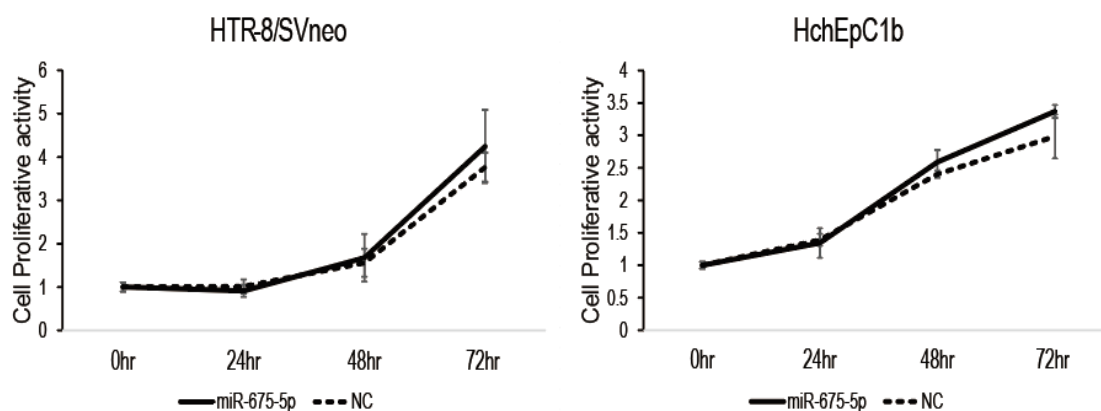


図 9. *miR-675-5p* の EVT 細胞株の浸潤能、増殖能への影響

- (A) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo、HChEpC1b) を用いた細胞浸潤アッセイ。 *hsa-miR-675-5p* mimic (675-5p) または negative control (NC) を導入し、HTR-8/SVneo は 24 時間後に、HChEpC1b は 48 時間後に浸潤細胞数を比較した。NC 導入細胞の浸潤細胞数を 1.0 として示した。実験は 3 回行い、Mean ± SD で示した。Student's t 検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$
- (B) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo、HchEpC1b) を用いた細胞増殖アッセイ。675-5p または NC を導入し、0、24、48、72 時間後に細胞の ATP 活性を測定することで増殖能を比較評価した。0 時間後の ATP 活性を 1.0 とした。実験は 5 回行い、Mean ± SD で示した。Student's t 検定、各評価時点で 675-5p と NC の増殖能に有意差なし。

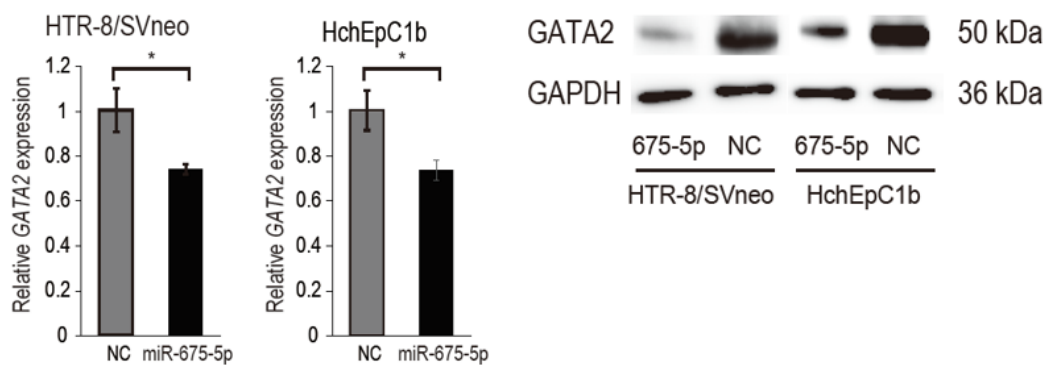
3-1. *miR-675-5p* は転写調節因子 *GATA2* を標的遺伝子として抑制する

続いて、*miR-675-5p* の EVT 細胞浸潤促進能に関与する標的遺伝子について検証した。TargetsScan Human 7.2 データベースにより、*hsa-miR-675-5p* の標的遺伝子候補を 1,352 種抽出した。これらの遺伝子の中から、過去に細胞浸潤抑制効果を報告された 12 種の遺伝子 (*BHLHE41*、*CDKN2A*、*CHMP1A*、*DDB2*、*DRD2*、*EMILIN1*、*GATA2*、*ING5*、*LCN2*、*NOG*、*RUNX1*、*SMAD5*) に注目した (34, 44-54) (補足表 4)。*miR-675-5p* がこれらの遺伝子の発現を抑制しているか検証するため、HTR-8/SVneo 細胞を用いて *miR-675-5p* 過剰発現試験を行ったところ、*BHLHE41*、*CHMP1A*、*GATA2*、*NOG* の発現が有意に抑制された (図 10A、B)。続いて、HTR-8/SVneo 細胞

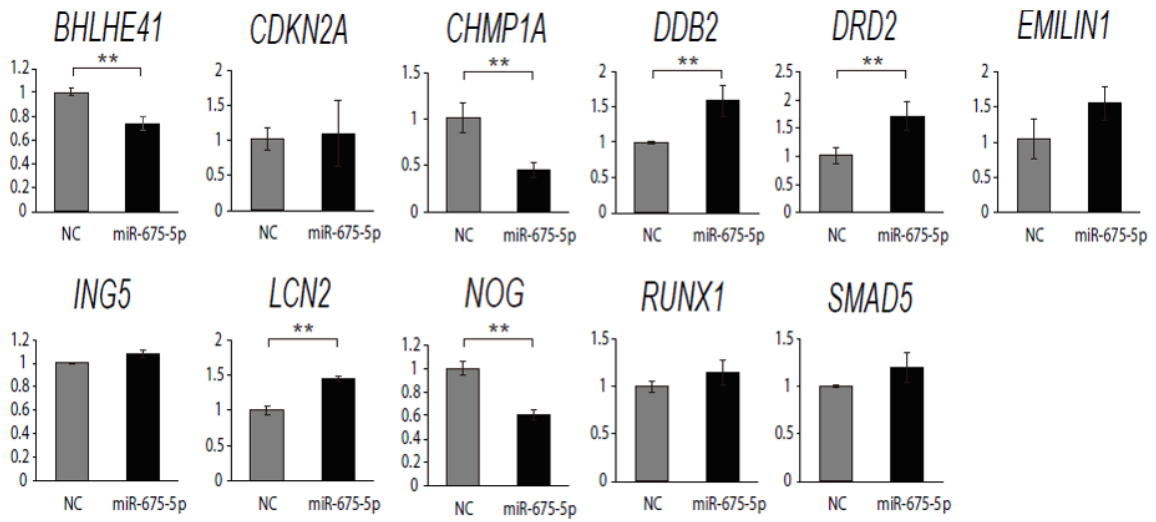
を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによりこれらの遺伝子が *miR-675-5p* の直接抑制を受けているか検証した。*miR-675-5p* は野生型 *GATA2* ルシフェラーゼベクターを導入した細胞のホタルルシフェラーゼ活性を有意に抑制したが、変異型 *GATA2* ルシフェラーゼベクター導入細胞のホタルルシフェラーゼ活性は抑制しなかった (図 10C)。また、ネガティブコントロールとして導入した *cel-miR-239b-5p* はいずれの *GATA2* ベクターを導入した細胞のホタルルシフェラーゼ活性も抑制しなかった (図 10C)。そのほかの標的遺伝子候補 (*BHLHE41*、*CHMP1A*、*NOG*) については、*miR-675-5p* は各遺伝子の野生型ルシフェラーゼベクター導入細胞のホタルルシフェラーゼ活性を有意に抑制しなかった (図 10D)。

これらの結果から、*miR-675-5p* は転写調節因子 *GATA2* を直接抑制していることが示された。さらに、ウェスタンブロッティングにより、*miR-675-5p* がタンパク質レベルでも *GATA2* を強く抑制していることも確認した (図 10A)。

A



B



C



D

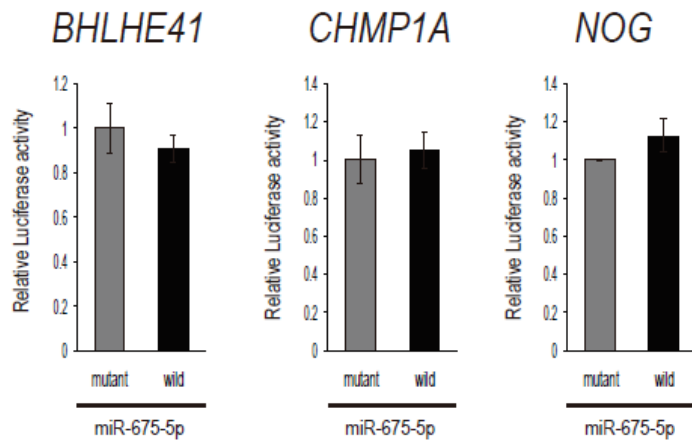


図 10. *miR-675-5p* の標的遺伝子として *GATA2* を抽出

(A) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo, HChEpC1b) における *miR-675-5p* の *GATA2* 抑制効果の検証。

左: リアルタイム PCR、右: ウェスタンブロット。

(B) EVT 細胞株 (HTR-8/Svneo) における *miR-675-5p* の細胞浸潤抑制遺伝子の抑制効果の検証 (リアルタイム PCR)。

(C) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる *miR-675-5p* の *GATA2* 直接抑制効果の検証。右: ルシフェラーゼベクター挿入配列 (*GATA2/wild*, *GATA2/mutant*)。左: HTR-8/SVneo を用いたルシフェラーゼアッセイ。pMIR-*GATA2/wild* または pMIR-*GATA2/mutant* を導入した細胞に 675-5p または NC を導入し、24 時間後にホタルルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性は同時に導入した pRL-TK ベクターのウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正した。pMIR-*GATA2/mutant* および NC を導入した細胞のホタルルシフェラーゼ活性を 1.0 とした。

(D) *BHLHE41*, *CHMP1A*, *NOG* を対象としたルシフェラーゼレポーターアッセイ。 *GATA2* と同様に行った。pMIR-*GATA2/mutant* と 675-5p を導入した細胞のホタルルシフェラーゼ活性を 1.0 とした。

実験は 3 回行い、Mean±SD で示した。(A,B) Student' s t 検定、(C) Tukey 検定: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3-2. *miR-675-5p* は *GATA2* 抑制を介して *MMP13* および *MMP14* の発現を上昇させ、EVT 細胞の浸潤を促進する

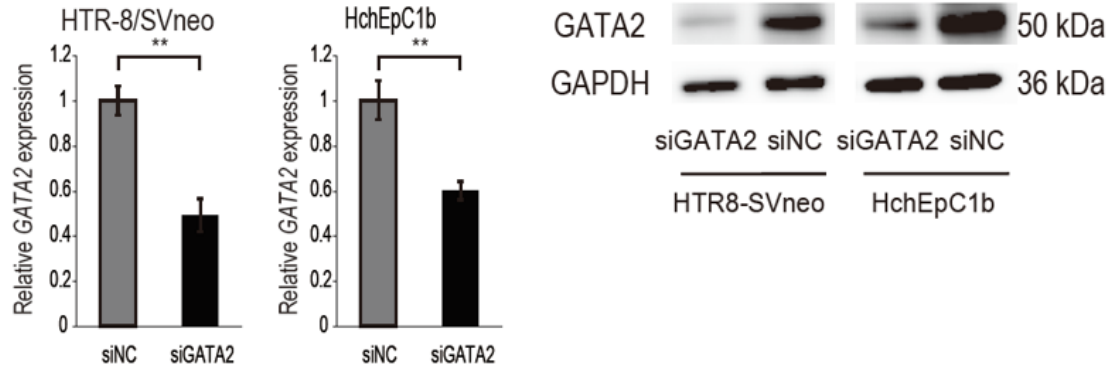
miR-675-5p による *GATA2* 抑制が EVT 細胞の浸潤促進に関与しているのかを検証するため、siRNA により *GATA2* 発現を抑制した EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo 細胞、HChEpC1b 細胞) を用いて細胞浸潤アッセイを行った。まず、si*GATA2* が EVT 細胞株の *GATA2* mRNA と *GATA2* タンパク質をともに抑制していることをリアルタイム PCR とウェスタンブロッティングで確認した (図 11A)。続いて、si*GATA2* により *GATA2* を抑制した細胞がコントロールと比べて有意に浸潤能が促進していることを確認した (図 11B)。このことから、*GATA2* は EVT 細胞の浸潤に関与していることが示された。

次に、*miR-675-5p/GATA2* による EVT 細胞浸潤促進系の下流因子についての検証を行った。栄養膜細胞の細胞浸潤促進に関与することが報告されている遺伝

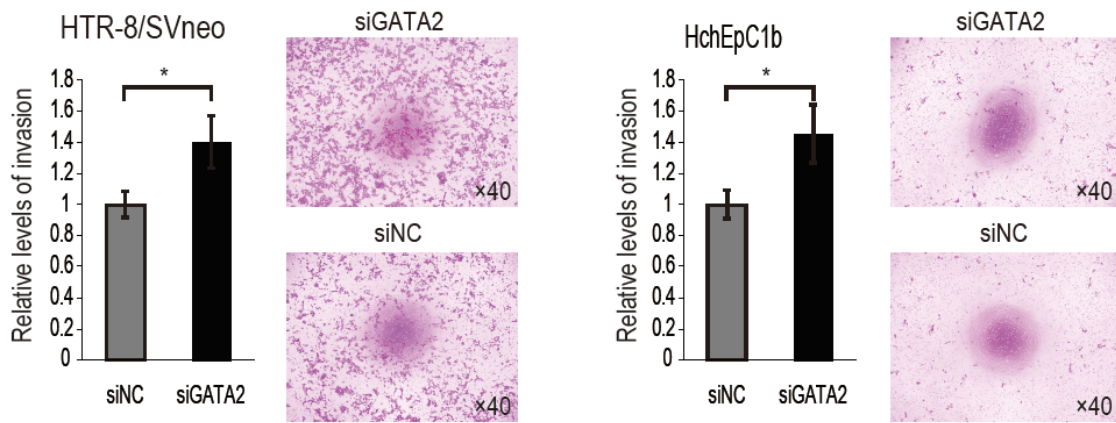
子 (*CXCL12*, *VEGFA*, *MMP2*, *MMP9*, *MMP13*, *MMP14*, *MMP15*) (9, 10, 55, 56)に注目し、*miR-675-5p* 過剰発現および *GATA2* 抑制により EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo 細胞、HChEpC1b 細胞) の発現に変化がみられるかをリアルタイム PCR で確認した (図 11C、D)。*miR-675-5p* は *CXCL12*, *VEGFA*, *MMP9*, *MMP13*, *MMP14* の発現を有意に促進した (HChEpC1b 細胞では *CXCL12* と *MMP14* の発現に変化はなかった) (図 11C)。これらの中で、*GATA2* 抑制によっても発現が上昇したのは *MMP13* と *MMP14* であった (HChEpC1b 細胞では *MMP14* の発現に変化はなかった) (図 11D)。*MMP13* と *MMP14* については、タンパク質レベルでも *miR-675-5p* 過剰発現および *GATA2* を抑制した EVT 細胞株においてその発現が上昇していることを確認した (図 11E)。これらの結果から、*miR-675-5p/GATA2* による EVT 細胞浸潤促進系の下流因子として、*MMP13* と *MMP14* に注目した。さらに、*miR-675-5p* を過剰発現させた EVT 細胞株では前駆体である lncRNA *H19* の発現が有意に上昇しており、*miR-675-5p* による lncRNA *H19* のポジティブフィードバック機構の存在が示唆された (図 11C)。

続いて、*MMP13* および *MMP14* が EVT 細胞の浸潤に関与しているかを検証するため、siRNA により *MMP13* および *MMP14* の発現を抑制した EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo 細胞、HChEpC1b 細胞) を用いて細胞浸潤アッセイを行った。まず、siMMP13 と siMMP14 がそれぞれの mRNA およびタンパク質を抑制していることをリアルタイム PCR とウェスタンブロッティングにより確認した (図 11F)。さらに、*MMP13* および *MMP14* を抑制した細胞の浸潤能がコントロールと比べて抑制されていることを確認した (図 11G)。HTR-8/SVneo 細胞では HChEpC1b 細胞に比べてその傾向がより顕著であった。これらの結果から、*MMP13* および *MMP14* は *miR-675-5p/GATA2* 系の下流因子として EVT 細胞の浸潤促進に関与していることが示唆された。

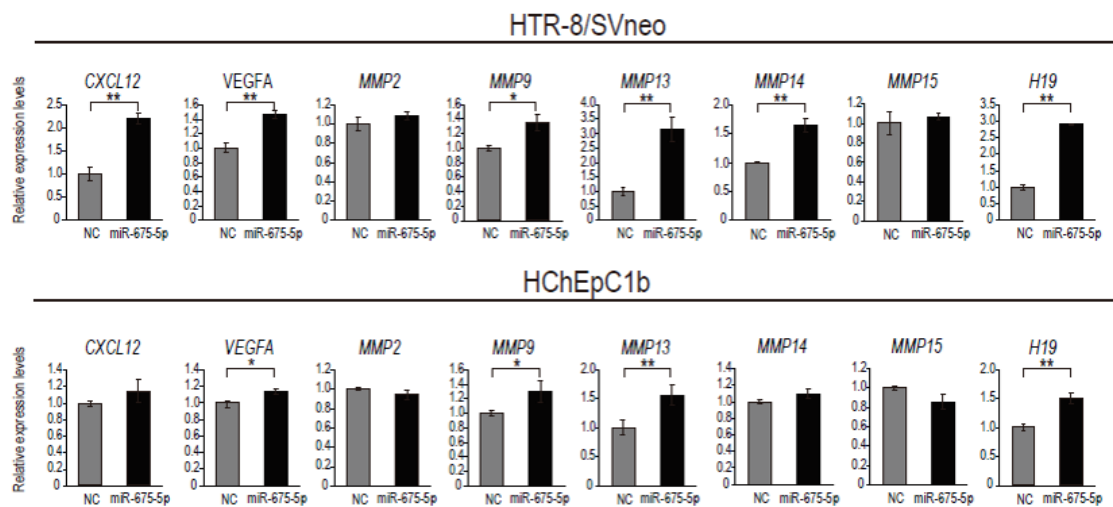
A



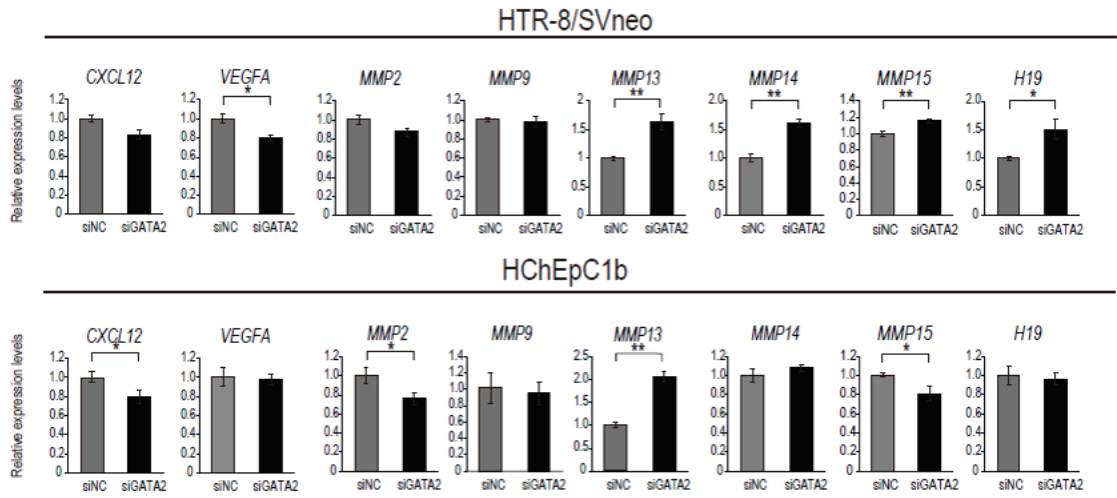
B



C



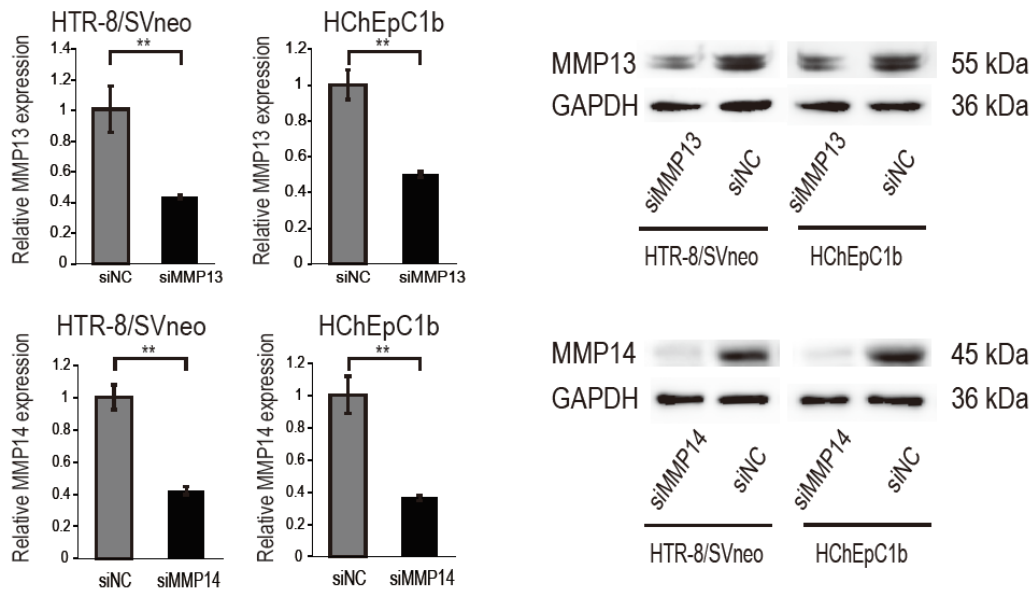
D



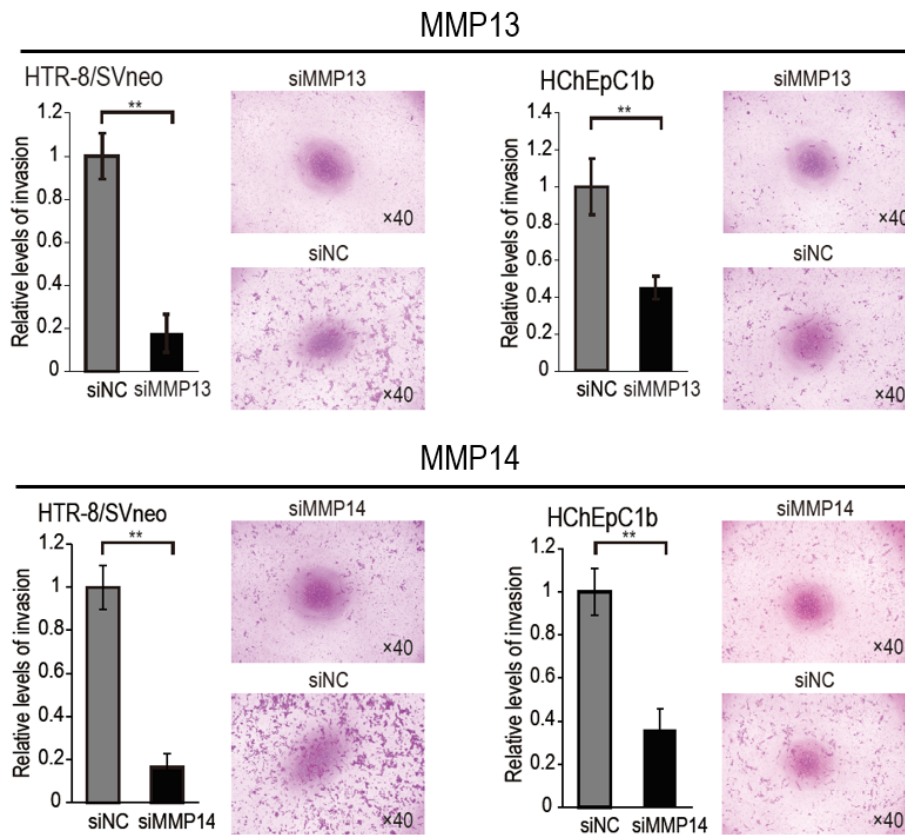
E



F



G



- 図 11. GATA2 抑制は MMP13 および MMP14 の発現を上昇させて EVT 浸潤を促進
- (A) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo、HChEpC1b) における siGATA2 の *GATA2* 抑制効果の検証。左: リアルタイム PCR、右: ウェスタンブロット。
- (B) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo、HChEpC1b) を用いた細胞浸潤アッセイ。siGATA2 または si-negative control (siNC) を導入し、HTR-8/SVneo は 24 時間後に、HChEpC1b は 48 時間後に浸潤細胞数を比較した。siNC 導入細胞の浸潤細胞数を 1.0 として示した。
- (C、D) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo、HChEpC1b) における細胞浸潤促進遺伝子の発現解析 (リアルタイム PCR)。(C) *hsa-miR-675-5p* mimic (675-5p) および negative control (NC) 導入 48 時間後の比較。(D) siGATA2 および siNC 導入 24 時間後の比較。
- (E) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo、HChEpC1b) における MMP13、MMP14 の発現解析 (ウェスタンブロット)。左: 675-5p および NC 導入 48 時間後の比較。右: siGATA2 および siNC 導入 24 時間後の比較。
- (F) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo、HChEpC1b) における siMMP13、siMMP14 の GATA2 抑制効果の検証。左: リアルタイム PCR、右: ウェスタンブロット。
- (G) EVT 細胞株 (HTR-8/SVneo、HChEpC1b) を用いた細胞浸潤アッセイ。siMMP13、siMMP14

または siNC を導入し、HTR-8/SVneo は 24 時間後に、HChEpC1b は 48 時間後に浸潤細胞数を比較した。siNC 導入細胞の浸潤細胞数を 1.0 として示した。実験は各々 3 回繰り返して、Mean±SD で示した。Student' s t 検定、*p<0.05、**p<0.01

V. 考察

今回我々は、胎盤に高発現している lncRNA *H19* より産生される *miR-675-5p* が妊娠初期の EVT 細胞の浸潤に重要な役割を担っているのではないかと仮説を立てた。そして、本研究において、*miR-675-5p* は EVT 細胞の浸潤を促進していることを示した。さらに、そのメカニズムとして *miR-675-5p* が転写調節因子 *GATA2* の抑制を介して MMP13 および MMP14 の発現を促進させていることを明らかにした。

本研究での EVT 細胞と CVT 細胞の遺伝子発現比較では、lncRNA *H19* と *miR-675-5p* は妊娠後期に比べて初期の胎盤で有意に高発現していた(図 8C)。また、RNA シークエンス解析により、CVT 細胞から EVT 細胞に分化する過程で lncRNA *H19* と *miR-675-5p* の発現が促進していることが明らかになった(図 8B)。このことは、妊娠初期に栄養膜細胞が EVT に分化し子宮脱落膜内に浸潤していく過程において、lncRNA *H19* および *miR-675-5p* が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。EVT 浸潤のみられる妊娠初期(10~18 週)は絨毛細胞は低酸素状態下にある(57)。また、lncRNA *H19* および *miR-675-5p* の発現は低酸素状況下で上昇することが報告されている(58, 59)。これらの点からも、妊娠初期の EVT 細胞において *H19* および *miR-675-5p* の発現が亢進し、その浸潤に寄与していることが推察される。

miR-675-5p の胎盤栄養膜細胞における役割についての報告は過去にいくつかあるが、いずれも細胞増殖能への影響について述べたものである。Gao らは、VT 細胞株(JEG3 細胞)を用いて、*miR-675-5p* が TGF β (transforming growth factor β)ファミリーに属する *NODAL* のインヒビターである *NOMOI* を直接抑制することで細胞増殖を抑制していることを示した(28)。また、Keniry らはマウス栄養膜幹細胞モデルを用いて *miR-675-5p* が成長促進因子の *Igf1* の受容体である *Igf1r*

を抑制して細胞増殖を抑制していることを示した(31)。しかし、本研究結果では *miR-675-5p* によるヒト EVT 細胞株の増殖能の変化はみられなかった。一方、*miR-675-5p* の胎盤栄養膜細胞の浸潤能への影響について検証した報告はこれまでになかった。本研究は、*miR-675-5p* が EVT 細胞の浸潤を促進していることを示した最初の報告である。

多くの研究により、様々な miRNA が栄養膜細胞の浸潤にその標的遺伝子を介して関与していることが報告されている(60-62)。*miR-675-5p* と細胞浸潤の関連については、癌領域の研究においては複数報告されている(32-36)。しかし、*miR-675-5p* が細胞浸潤の促進因子として働くのか、抑制因子として働くのかについては報告により結論は様々であった。Zheng らは *miR-675-5p* が腫瘍抑制遺伝子 *RBI* を抑制して神経膠腫細胞の移動、浸潤能を促進することを示した(32)。また、Zhou らは食道扁平上皮癌細胞において *miR-675-5p* が成長因子シグナル系に関与する *REPS2* を抑制して細胞浸潤および増殖を促進することを明らかにした(33)。一方、He らは *miR-675-5p* が癌遺伝子 *GPR55* の発現を抑制することで肺非小細胞癌細胞の浸潤、増殖を抑制していると報告した(35)。Wang らも *miR-675-5p* の細胞浸潤抑制能を甲状腺乳頭癌細胞を用いて示し、その標的遺伝子が *MAPK1* であることを明らかにした(36)。これらの報告から、*miR-675-5p* の細胞浸潤能への作用は組織・細胞により異なっていると考えられる。本研究の細胞株を用いた検証では、*miR-675-5p* が転写調節因子 *GATA2* の抑制を介して EVT 細胞の浸潤を促進していることが明らかになった。

胎盤栄養膜細胞の浸潤は、様々な細胞シグナルパスウェイ(MAPK シグナル、PI3K/AKT シグナル、JAK-STAT シグナル、Wnt シグナル、Rho/ROCK シグナル、TGFβファミリーシグナルなど)により複雑に制御されていることが知られている(63, 64)。これらのシグナルパスウェイの下流エフェクターとして、マトリック

スメタロプロテアーゼ (MMPs)に属し細胞基底膜の分解に関与する *MMP2* と *MMP9* は EVT 細胞に豊富に発現して、その浸潤を促進することが報告されている(10, 63, 65-67)。本研究結果では、*miR-675-5p* は EVT 細胞株の *MMP2* の発現には影響を与えなかったが、*MMP9* の発現を有意に促進させた(図 11C)。本研究で *miR-675-5p* の標的であることが明らかになった *GATA2* を抑制した際に *MMP2*、*MMP9* ともに発現の変化はみられなかったことから(図 11D)、*miR-675-5p* による EVT 細胞株の *MMP9* の発現促進作用は別の経路や標的遺伝子を介しているのかもしれない。

GATA2 は亜鉛フィンガータンパク質に属し、様々な生理学および生物学的反応の過程を担う GATA タンパクファミリー(*GATA1-6*)の一つであり、血球、血管、泌尿器、神経など幅広い組織に発現して組織の発生や恒常性維持に重要な役割を果たしている(68, 69)。また、造血幹細胞の分化に重要な役割を果たしており、*GATA2* に変異がある場合には骨髓異形成症候群や急性骨髓性白血病などの造血系腫瘍の発症リスクが増大することが報告されている(68)。*GATA2* は胎盤栄養膜細胞にも高発現しており(70)、*PL1* (placental lactogen)や *proliferin* などのホルモンを産生に関与しているが(71, 72)、胎盤における役割についてはまだ十分に明らかになっていない。また、*GATA2* と栄養膜細胞の浸潤能への関与を示した報告はこれまでにない。一方で、*GATA2* と癌細胞浸潤との関連についてはいくつか報告されているが、腫瘍促進因子として働くか抑制因子として働くかは癌種、組織により異なっているようである。Wang らは、*GATA2* は *EGFR/ERK/E1k-1* シグナルを活性化させることで神経膠腫細胞の浸潤を促進することを示した(73)。また、Wang らは *GATA2* が癌抑制遺伝子 *PTEN* の転写を活性化させるアンドロゲンレセプターを阻害することで乳癌細胞の浸潤・転移能を亢進させることを明らかにした(74)。一方で、詳細なメカニズムは明らかではないものの、Li らは肝細胞癌において *GATA2* の抑制は、その浸潤能の促進につながることを示し

た(49)。このように、種々の癌細胞において GATA2 はその浸潤能に影響を与えている。本研究では、GATA2 の抑制により EVT 細胞の浸潤能が有意に促進することを示した(図 11B)。また、GATA2 の抑制により MMP13 および MMP14 の発現が有意に上昇しており、これらが下流エフェクターとして EVT 細胞の浸潤促進に寄与している可能性が示唆された。

MMP14 は様々な細胞接着因子(I-III型コラーゲン、インテグリンなど)の分解を担う膜型 MMPs に属し、血管新生や細胞浸潤を促進することが知られている(75-78)。また、MMP14 はヒト胎盤、特に妊娠初期の EVT 細胞に高発現していることが報告されている(79, 80)。Wang らは EVT 細胞株(HTR-8/SVneo 細胞)を用いて MMP14 が Notch1 および PI3K/Akt シグナルを介して細胞浸潤を促進することを示した(81)。また、Majali-Martinez らもヒト胎盤栄養膜細胞における MMP14 の細胞浸潤促進能を明らかにした(82)。MMP13 (コラゲナーゼ 3) は I 型および II 型コラーゲンなどの繊維性コラーゲンの分解を担い、様々な癌細胞の浸潤を促進する(55, 83-86)。興味深いことに、Knauper らは線維芽細胞において MMP14 が MMP13 タンパク質をそのプロペプチド領域の分解を阻害することにより活性化させることを報告している(87)。また、MMP13 は I 型コラーゲンの豊富な関節組織に豊富に発現し骨の形成や代謝、血管新生などに関与していることが知られている(55)。胎盤栄養膜における MMP13 の働きについてはまだほとんど明らかになっていないが、Sinai らはヒト胎盤の子宮脱落膜内には豊富な I 型コラーゲンが存在していることを電子顕微鏡による観察で示しており(88)、EVT 細胞における MMP13 の発現亢進は脱落膜内の I 型コラーゲンを分解しながら自身の浸潤を促進させていく可能性を示唆していると考えられる。本研究でも細胞株を用いた細胞浸潤アッセイにより、MMP14 および MMP13 が EVT 細胞の浸潤促進に関与していることを改めて示した(図 11G)。

本研究はいくつか検証の予知を有している。まず、本研究では *miR-675-5p* の EVT 浸潤能への影響の評価および遺伝子発現解析を EVT 細胞株で行った。EVT 細胞株は EVT に特異的なマーカー (HLA-G, CK7, CD9 など) を発現し、細胞浸潤や増殖を促進するような遺伝子発現パターンをとる一方で、アレイ解析などで primary 細胞や組織と比較したクラスター解析では完全には一致した集団ではないことも示されている (38, 89, 90)。今後、primary のヒト栄養膜細胞や vivo モデルによる機能・病態解析が必要である。また、本研究では *miR-675-5p* は EVT 細胞株の増殖能には影響を与えなかったが、上述のように *miR-675-5p* が栄養膜細胞の増殖を抑制すると報告した研究がいくつかある (28, 31)。*miR-675-5p* が栄養膜細胞の増殖抑制と浸潤促進に関与しているのであれば胎盤発達においては矛盾しているようにもみえるが、妊娠時期により *miR-675-5p* の発現が変化するだけでなく、作用も異なってくるのかもしれない。また、*miR-675-5p* は EVT 浸潤が行われる妊娠初期胎盤でより高発現していた (図 8C) が、その発現がどの程度 lncRNA *H19* 由来であるのかについては示せていない。*miR-675-5p* の EVT 細胞における発現上昇は有意ではあるものの lncRNA *H19* に比べて軽度であった (図 8B)。妊娠高血圧腎症患者の胎盤の発現解析では lncRNA *H19* と *miR-675-5p* の発現は相関して変動することが示されている一方、マウス胎盤では妊娠期間における lncRNA *H19* の発現変動に比べて *miR-675-5p* のそれは小さいとされている (28, 31)。ヒト胎盤における lncRNA *H19* および *miR-675-5p* の妊娠期間における発現変動・相関についてはさらなる検証を要する。本研究では *miR-675-5p* の EVT 細胞株の浸潤促進作用の下流エフェクターとして MMP9, MMP13, MMP14 に注目した。MMP は pro-MMP として発現し、プロドメインが切断されることで活性型として機能することが分かっている (83) が、今回はリアルタイム PCR とウェスタンブロッティングのみでしか発現評価を行っておらず、これらの MMP の活性

状態についても検証を要する。さらに、今回行った RNA シーケンスにより、EVT 細胞では多くの lncRNA の発現が抑制されていたことや、14 番染色体上の miRNA の発現が有意に抑制されていたことなども分かった。14 番染色体上には胎盤特異的な miRNA クラスター (C14MC: chromosome 14 microRNA cluster) があることから(91)、これらの発現変動と EVT の浸潤能への関連は今後の研究対象となりうる。

本研究により、*miR-675-5p* が EVT 細胞の浸潤を促進することを明らかにし、そのメカニズムとして “*miR-675-5p-GATA2-MMP14/MMP13*” モデルを示した (図 12)。*miR-675-5p* は胎盤形成に重要な役割を担っていると考えられる。したがって、妊娠初期の EVT 細胞における *miR-675-5p* の発現異常は EVT の浸潤不全を引き起こし、妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの胎盤関連疾患の病態形成の原因となっているかもしれない。一方、lncRNA *H19* は *miR-675-5p* の産生以外にも、転写調節、そのほかの miRNA との競合、など様々な役割を持つことが報告されているが(23, 24)、本研究では lncRNA *H19* 自体の EVT 細胞における機能については未検証であり、今後の研究課題である。また、lncRNA *H19* および *miR-675-5p* は血中でも検出されることが分かっている(92-94)。初期妊婦の末梢血における lncRNA *H19* および *miR-675-5p* の発現を確認し、その妊娠転帰を追うことで将来的には妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの疾患の発症予知マーカーとして評価・臨床応用できる可能性があると考えている。

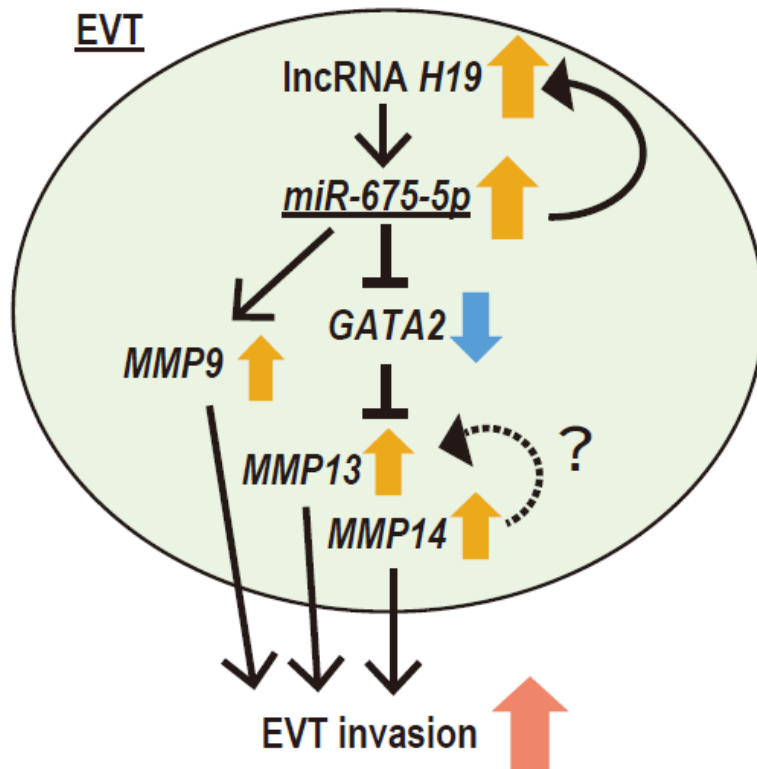


図 12. EVT 浸潤における “*miR-675-5p*-*GATA2*-*MMP14*/*MMP13*” モデル

VI. 結語

今回我々は、妊娠初期の EVT 細胞に高発現している lncRNA *H19* 由来の *miR-675-5p* が EVT 細胞の浸潤を促進していることを明らかにした。また、そのメカニズムの一つとして、*miR-675-5p* による転写調節因子 *GATA2* の抑制を介した *MMP14* および *MMP13* の発現促進が関与している可能性を示した。“*miR-675-5p*-*GATA2*-*MMP14*/*MMP13* モデル” は胎盤形成の一端を担っている可能性がある。

VII. 補足

補足表 1. リアルタイム PCR 用プライマー配列

遺伝子		プライマー配列
<i>H19</i>	F	GATCGGTGCCTCAGCGTT
	R	TCATGTCCTGCTTGTACGTC
<i>CXCL12</i>	F	TGCCCTTCAGATTGTAGCCC
	R	GTGGGTCTAGCGGAAAGTCC
<i>VEGFA</i>	F	GAGGAGCAGTTACGGTCTGTG
	R	TCCTTTCCTTAGCTGACACTTGT
<i>MMP2</i>	F	GATACCCCTTTGACGGTAAGGA
	R	CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC
<i>MMP9</i>	F	AGCGACAAGAAGTGGGGCTT
	R	ATGATCTAAGCCCAGCGCGT
<i>MMP13</i>	F	ATGCTTTTCCTCCTGGGCCA
	R	CAGGGTCCTTGGAGTGGTCA
<i>MMP14</i>	F	GAGCTCAGGGCAGTGGATAG
	R	GGTAGCCCGGTTCTACCTTC
<i>MMP15</i>	F	CAGGCCACACCTTCTTCTTC
	R	CCAGTATTTGGTGCCCTTGT
<i>GATA2</i>	F	CATCAAGCCCAAGCGAAGACT
	R	CAGCTCCTCGAAGCACTCCG
<i>BHLHE41</i>	F	GCATGAAACGAGACGACACC
	R	CGCTCCCCATTCTGTAAAGC
<i>CDKN2A</i>	F	TAGAAGCAGGCATGCGTAGG
	R	ATCGGGGATGTAATGCCAGG
<i>CHMP1A</i>	F	AGAGTGTGCCCGTGTGTATG
	R	TGGAGTCCTCCATCACCGAT
<i>DDB2</i>	F	CTCCTCAATGGAGGGAACAA
	R	GTGACCACCATTTCGGCTACT
<i>DRD2</i>	F	GCTGGAAGCCTCAAGCAG
	R	ACCAGGACAGATTCAGTGGA
<i>EMILIN1</i>	F	AGCTACCCTCCTCGAGGTTT
	R	CGGCGGTACATGATGCTTTG
<i>ING5</i>	F	GGGAGATGATTGGCTGTG
	R	CCTTTGGGTTTCGTGGTA
<i>LCN2</i>	F	TCACCTCCGTCCTGTTTAGG
	R	CGAAGTCAGTCCTTGGTTC
<i>NOG</i>	F	AAGCTGCGGAGGAAGTTACA
	R	GTACAGCACGGGGCAGAA
<i>RUNX1</i>	F	CCGAGAACCTCGAAGACATC
	R	GATGGTTGGATCTGCCTTGT
<i>SMAD5</i>	F	GCTTTCATCCCACCACTGTCTGTA
	R	CCTGCCGGTGATATTCTGCTC
<i>18S</i>	F	AGTTGGTGGAGCGATTTGTC
	R	CGGACATCTAAGGGCATCAC

補足表 2. ルシフェラーゼベクターへ挿入する遺伝子の 3' UTR 内配列増幅プライマー配列

遺伝子		プライマー配列	増幅塩基長 (bp)
<i>GATA2</i>	F	GAGGGAGCTCACCTTAGCAGCCCAGCAT	327
	R	ACGCACGCGTCACCAAGTCTCCAAGTCCTTGTT	
<i>BHLHE41</i>	F	GAGGGAGCTCAGGAGGTTCAAGCAGAGTGAGAAGTT	341
	R	ACGCACGCGTCACCTAGCTCAGCCACAGAACAG	
<i>CHMP1A</i>	F	GAGGGAGCTCGCCCTGTGGACTTTCACCC	287
	R	ACGCACGCGTGAGACACCACCCCTGGAGTG	
<i>NOG</i>	F	GAGGGAGCTCCTGCTTCAGTAAGCGCTCGTG	261
	R	ACGCACGCGTGCTAGAGGGTGGTGGAACTGGT	

補足表 3. ルシフェラーゼ変異 (mutant) ベクター作成用 inverse PCR プライマー配列

遺伝子		プライマー配列
<i>GATA2</i>	F	tgagaggctgcctccacgctgaccgctgcCCAGGT
	R	gcagcggtcaggcgtggaggcagcctctcaGCGGTG
<i>BHLHE41</i>	F	ttgctcatcaccacgccccaccCCCCACCCTCCACACACTAA
	R	ggtggggggcgtggtgatgagcaaAACAGGAACTCCG
<i>CHMP1A</i>	F	gaggcctctaccacgcccctcagcggGCAGGAGGT
	R	ccgctgaggggcgtggtagggcctcAGGGAGTTGTTTGG
<i>NOG</i>	F	ggggccccctgccacgcccggacactgaTCGATC
	R	tcaagtgtccgggcgtgggcagggggccccCGA

* 相補配列は小文字で示す

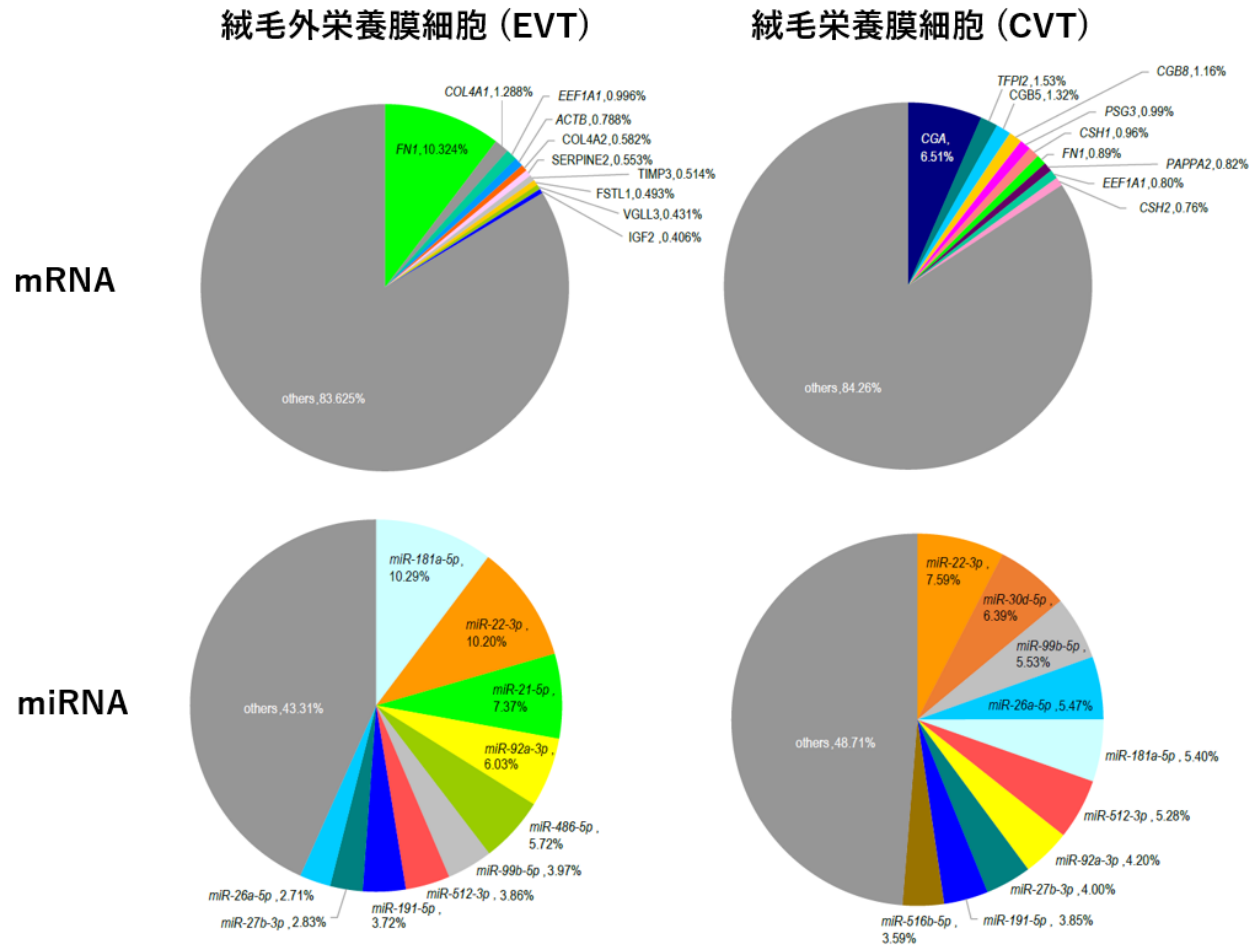
補足表 4 *miR-675-5p* 標的候補かつ細胞浸潤抑制遺伝子

遺伝子	標的候補配列の 数	<i>miR-675-5p</i> seed配列との 相補塩基数 (bp)	The context++ score	これまでに報告された腫瘍組織
<i>BHLHE41</i>	1	8	-0.55	乳癌 [Montagner M. 2012 (44)], 子宮内膜癌 [Liao Y. 2014 (95)]
<i>CDKN2A</i>	1	8	-0.76	乳癌 (Yang X. 2017 (45)), メラノーマ [Zeng H. 2018 (96)]
<i>CHMP1A</i>	1	8	-0.55	腎細胞癌 [You Z. 2012 (46)], 膵臓癌 [Li J. 2008 (97)]
<i>DDB2</i>	1	7	-0.48	大腸癌 [Costa V. 2017 (34)], 乳癌 [Ennen M. 2013 (98)], 頭頸部癌 [Bommi P.V. 2018 (99)]
<i>DRD2</i>	1	7	-0.34	下垂体腫瘍 [Peverelli E. 2016 (47)], 胃癌 [Huang H. 2016 (100)]
<i>EMILIN1</i>	1	7	-0.28	胃癌 [Qi Y. 2019 (101)]
<i>GATA2</i>	1	7	-0.27	肝細胞癌 [Li MW. 2014 (49)]
<i>ING5</i>	1	7	-0.16	食道扁平上皮癌 [Zhang GJ. 2018 (50)], 肺癌 [Liu XL. 2017 (102)], 胃癌 [Gou WF. 2015 (103)]
<i>LCN2</i>	1	8	-0.77	大腸癌 [Kim SL. 2017 (51)]
<i>NOG</i>	1	7	-0.41	乳癌 [Guo D. 2012 (52)], 肝細胞癌 [Maegdefrau U. 2012 (104)], 卵巣癌 [Therault BL. 2007 (105)]
<i>RUNX1</i>	1	7	-0.30	前立腺癌 [Zhang G. 2018 (53)], 肺腺癌 [Ramsey J. 2018 (106)]
<i>SMAD5</i>	1	6	-0.14	食道癌 [Zhang Q. 2018 (54)]

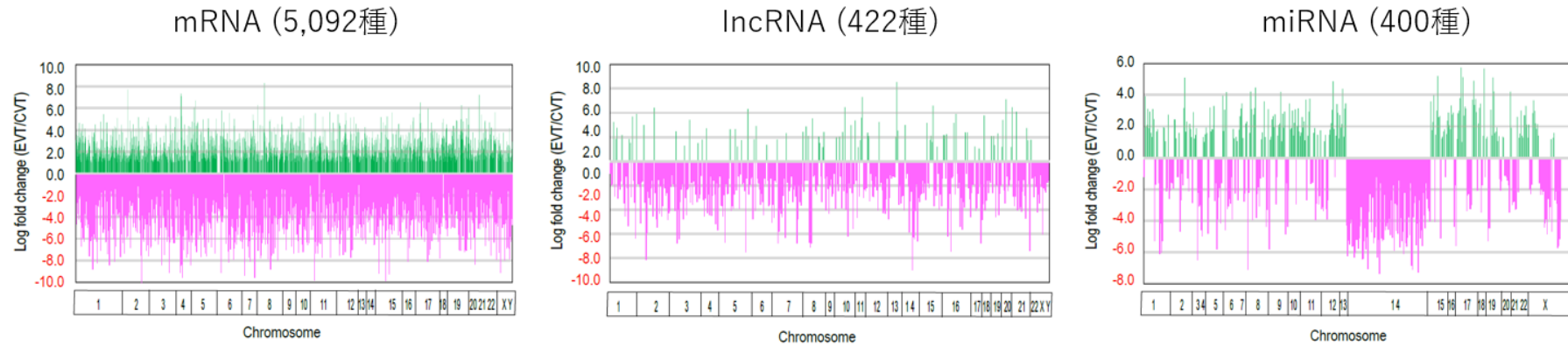
* The Context++ score: 14 の項目 (遺伝子の 3'UTR 長、AU 配列、open reading frame 長など)をもとに計算されたスコア。この値が低いほど標的遺伝子である可能性が高いことを示す (107)。

補足図 1

A



B



- (A) 分離培養した絨毛外栄養膜細胞 (EVT、妊娠 7 週、n=3) と絨毛栄養膜細胞 (CVT、妊娠 7 週、n=3、EVT と同一胎盤から回収) における mRNA および miRNA の発現割合 (RNA シークエンス)。各遺伝子の発現量/全ての lncRNA の発現量の合計で示している。
- (B) EVT 細胞と CVT 細胞間での有意発現変動遺伝子の数とその染色体座位。サンプルは (A) と同じ。発現量は RNA シークエンスで評価し、EVT/CVT 発現量比は \log_2 fold change (EVT/CVT) で示している。有意発現変動遺伝子: \log_2 fold change ≥ 1 、 $q < 0.05$

VIII. 謝辞

本研究においてご指導をいただきました自治医科大学産科婦人科学講座の大口昭英教授、高橋宏典教授、松原茂樹名誉教授、藤原寛行教授に深謝いたします。実際の研究において計画から実施、解析までご指導いただきました日本医科大学分子解剖学講座の瀧澤俊広教授、趙 東威先生、小管拓治技術員をはじめ、同講座の皆さまに心より感謝いたします。

本研究の一部は自治医科大学大学院補助金、日本学術振興会科学研究費によって行われました。

IX. 参考文献

1. Vićovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat* 156: 202-216, 1996
2. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69: 1-7, 2003
3. Robertson WB, Brosens IA, Dixon HG. Placental bed vessels. *Am J Obstet Gynecol* 117: 294-295, 1973
4. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1: 3-19, 1980
5. Brosens I, Dixon HG, Robertson WB. Fetal growth retardation and the arteries of the placental bed. *Br J Obstet Gynaecol* 84: 656-663, 1977
6. Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 88: 876-881, 1981
7. Hannon T, Innes BA, Lash GE, Bulmer JN, Robson SC. Effects of local decidua on trophoblast invasion and spiral artery remodeling in focal placenta creta - an immunohistochemical study. *Placenta* 33: 998-1004, 2012
8. Wu HX, Guo PF, Jin LP, Liang SS, Li DJ. Functional regulation of thymic stromal lymphopoietin on proliferation and invasion of trophoblasts in human first-trimester pregnancy. *Hum Reprod* 25: 1146-1152, 2010
9. Wang L, Li X, Zhao Y, Fang C, Lian Y, Gou W, Han T, Zhu X. Insights into the mechanism of CXCL12-mediated signaling in trophoblast functions and placental angiogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 47: 663-672, 2015

10. Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am J Reprod Immunol* 75: 341-350, 2016
11. Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol* 187: 233-238, 2002.
12. van den Brûle F, Berndt S, Simon N, Coulon C, Le Goarant J, Munaut C, Noël A, Frankenne F, Foidart JM. Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chem Immunol Allergy* 88: 163-180, 2005
13. Takahashi H, Takizawa T, Matsubara S, Ohkuchi A, Kuwata T, Usui R, Matsumoto H, Sato Y, Fujiwara H, Okamoto A, Suzuki M, Takizawa T. Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction. *Placenta* 35: 163-170, 2014
14. Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling. *Mol Cell Endocrinol* 503: 110699, 2020.
15. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 12: 861-874, 2011
16. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*. 157: 77-94, 2014
17. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835-840, 2010
18. Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell* 172: 393-407, 2018
19. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10: 155-159, 2009
20. Yao RW, Wang Y, Chen LL. Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat Cell*

Biol 21: 542-51, 2019

21. Bhat SA, Ahmad SM, Mumtaz PT, Malik AA, Dar MA, Urwat U, Shah RA, Ganai NA. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility.

Noncoding RNA Res 1: 43-50, 2016

22. Nordin M, Bergman D, Halje M, Engstrom W, Ward A. Epigenetic regulation of the Igf2/H19 gene cluster. *Cell Prolif* 47: 189-99, 2014
23. Matouk IJ, Halle D, Gilon M, Hochberg A. The non-coding RNAs of the H19-IGF2 imprinted loci: a focus on biological roles and therapeutic potential in Lung Cancer. *J Transl Med* 13: 113, 2015
24. Ghafouri-Fard S, Esmaeili M, Taheri M. H19 lncRNA: Roles in tumorigenesis. *Biomed Pharmacother* 123: 109774, 2020
25. Lecerf C, Le Bourhis X, Adriaenssens E. The long non-coding RNA H19: an active player with multiple facets to sustain the hallmarks of cancer. *Cell Mol Life Sci* 76: 4673-4687, 2019
26. Goshen R, Rachmilewitz J, Schneider T, de-Groot N, Ariel I, Palti Z, Hochberg AA. The expression of the H-19 and IGF-2 genes during human embryogenesis and placental development. *Mol Reprod Dev* 34: 374-379, 1993.
27. Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 13: 313-316, 2007.
28. Gao WL, Liu M, Yang Y, Yang H, Liao Q, Bai Y, Li YX, Li D, Peng C, Wang YL. The imprinted H19 gene regulates human placental trophoblast cell proliferation via encoding miR-675 that targets Nodal Modulator 1 (NOMO1). *RNA Biol* 9: 1002-1010, 2010
29. Koukoura O, Sifakis S, Zaravinos A, Apostolidou S, Jones A, Hajjiioannou J,

- Widschwendter M, Spandidos DA. Hypomethylation along with increased H19 expression in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. *Placenta* 32: 51-57, 2011.
30. Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154: 343-354, 2010
 31. Keniry A, Oxley D, Monnier P, Kyba M, Dandolo L, Smits G, Reik W. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat Cell Biol* 14: 659-665, 2012
 32. Zheng Y, Lu X, Xu L, Chen Z, Li Q, Yuan J. MicroRNA-675 promotes glioma cell proliferation and motility by negatively regulating retinoblastoma 1. *Hum Pathol* 69: 63-71, 2017
 33. Zhou YW, Zhang H, Duan CJ, Gao Y, Cheng YD, He D, Li R, Zhang CF. miR-675-5p enhances tumorigenesis and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by targeting REPS2. *Oncotarget* 7: 30730-30747, 2016
 34. Costa V, Lo Dico A, Rizzo A, Rajata F, Tripodi M, Alessandro R, Conigliaro A. MiR-675-5p supports hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells. *Oncotarget* 8: 24292-24302, 2017
 35. He D, Wang J, Zhang C, Shan B, Deng X, Li B, Zhou Y, Chen W, Hong J, Gao Y, Chen Z, Duan C. Down-regulation of miR-675-5p contributes to tumor progression and development by targeting pro-tumorigenic GPR55 in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 14: 73, 2015
 36. Wang J, Xiao T, Zhao M. MicroRNA-675 directly targets MAPK1 to suppress the oncogenicity of papillary thyroid cancer and is sponged by long non-coding RNA RMRP. *Onco Targets Ther* 12: 7307-7321, 2019

37. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res* 206: 204-211, 1993
38. Omi H, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Kawaguchi R, Umehara N, Sugiura K, Saito M, Kiyono T, Tanaka T. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation. *Int J Mol Med* 23: 229-236, 2009
39. Sato Y, Higuchi T, Yoshioka S, Tatsumi K, Fujiwara H, Fujii S. Trophoblasts acquire a chemokine receptor, CCR1, as they differentiate towards invasive phenotype. *Development* 130: 5519-5532, 2003
40. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5: 209-219, 2005
41. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 439:231-250, 2015
42. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif) 25: 402-408, 2001
43. Cormack B. Directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 8: 5, 2001
44. Montagner M, Enzo E, Forcato M, Zanconato F, Parenti A, Rampazzo E, Basso G, Leo G, Rosato A, Bicciato S, Cordenonsi M, Piccolo S. SHARP1 suppresses breast cancer metastasis by promoting degradation of hypoxia-inducible factors. *Nature* 487: 380-384, 2012

45. Yang X, Sun Y, Li H, Shao Y, Zhao D, Yu W, Fu J. C-terminal binding protein-2 promotes cell proliferation and migration in breast cancer via suppression of p16INK4A. *Oncotarget* 8: 26154-26168, 2017
46. You Z, Xin Y, Liu Y, Sun J, Zhou G, Gao H, Xu P, Chen Y, Chen G, Zhang L, Gu L, Chen Z, Han B, Xuan Y. Chmp1A acts as a tumor suppressor gene that inhibits proliferation of renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 319: 190-196, 2012
47. Peverelli E, Giardino E, Treppiedi D, Locatelli M, Vaira V, Ferrero S, Bosari S, Lania A. G, Spada A, Mantovani G. Dopamine receptor type 2 (DRD2) inhibits migration and invasion of human tumorous pituitary cells through ROCK-mediated cofilin inactivation. *Cancer Lett* 381: 279-286, 2016
48. Qi Y, Lv J, Liu S, Sun L, Wang Y, Li H, Qi W, Qiu W. TSPAN9 and EMILIN1 synergistically inhibit the migration and invasion of gastric cancer cells by increasing TSPAN9 expression. *BMC Cancer* 19: 630, 2019
49. Li YW, Wang JX, Yin X, Qiu SJ, Wu H, Liao R, Yi Y, Xiao Y. S, Zhou J, Zhang BH, Fan J. Decreased expression of GATA2 promoted proliferation, migration and invasion of HepG2 in vitro and correlated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 9 :e87505, 2014
50. Zhang GJ, Zhao J, Jiang ML, Zhang LC. ING5 inhibits cell proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma through regulation of the Akt/NF-kappaB/MMP-9 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 496: 387-393, 2018
51. Kim SL, Lee ST, Min IS, Park YR, Lee JH, Kim DG, Kim SW. Lipocalin 2 negatively regulates cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition through changing metabolic gene expression in colorectal cancer. *Cancer Sci* 108:

2176-2186, 2017

52. Guo D, Huang J, Gong J. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer. *Mol Cell Biochem* 363: 179-190, 2012
53. Zhang G, Han G, Zhang X, Yu Q, Li Z, Li Z, Li J. Long non-coding RNA FENDRR reduces prostate cancer malignancy by competitively binding miR-18a-5p with RUNX1. *Biomarkers* 23: 435-445, 2018
54. Zhang Q, Gan H, Song W, Chai D, Wu S. MicroRNA-145 promotes esophageal cancer cells proliferation and metastasis by targeting SMAD5. *Scand J Gastroenterol* 53: 769-776, 2018
55. Amar S, Smith L, Fields GB. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 1940-1951, 2017
56. Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction* 126: 569-77, 2003
57. Huppertz B, Weiss G, Moser G. Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. *J Reprod Immunol* 101-102: 74-79, 2014
58. Shih JW, Kung HJ. Long non-coding RNA and tumor hypoxia: new players ushered toward an old arena. *J Biomed Sci* 24: 53, 2017
59. Saieva L, Barreca MM, Zichittella C, Prado MG, Tripodi M, Alessandro R, Conigliaro A. Hypoxia-Induced miR-675-5p Supports β -Catenin Nuclear Localization by Regulating GSK3- β Activity in Colorectal Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 21: 3832, 2020
60. Doridot L, Miralles F, Barbaux S, Vaiman D. Trophoblasts, invasion, and microRNA. *Front Genet* 4: 248, 2013

61. Hu XQ, Zhang L. MicroRNAs in Uteroplacental Vascular Dysfunction. *Cells* 8: 1344, 2019.
62. Hemmatzadeh M, Shomali N, Yousefzadeh Y, Mohammadi H, Ghasemzadeh A, Yousefi M. MicroRNAs: Small molecules with a large impact on pre-eclampsia. *J Cell Physiol* 235: 3235-3248, 2020
63. Gupta SK, Malhotra SS, Malik A, Verma S, Chaudhary P. Cell Signaling Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells. *Am J Reprod Immunol* 75: 361-371, 2016
64. Fritz R, Jain C, Armant DR. Cell signaling in trophoblast-uterine communication. *Int J Dev Biol* 58: 261-271, 2014
65. Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Prog Mol Biol Transl Sci* 148: 87-165, 2017
66. Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochem* 106: 353-362, 2004
67. Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF, Takayama M. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 24: 53-64, 2003
68. Bresnick EH, Katsumura KR, Lee HY, Johnson KD, Perkins AS. Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. *Nucleic Acids Res* 40: 5819-5831, 2012
69. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 371: 221-226, 1994

70. Home P, Kumar RP, Ganguly A, Saha B, Milano-Foster J, Bhattacharya B, Ray S, Gunewardena S, Paul A, Camper SA, Fields PE, Paul S. Genetic redundancy of GATA factors in the extraembryonic trophoblast lineage ensures the progression of preimplantation and postimplantation mammalian development. *Development* 144: 876-888, 2017
71. Ma GT, Roth ME, Groskopf JC, Tsai FY, Orkin SH, Grosveld F, Engel JD, Linzer DI. GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development* 124: 907-914, 1997
72. Ng YK, George KM, Engel JD, Linzer DI. GATA factor activity is required for the trophoblast-specific transcriptional regulation of the mouse placental lactogen I gene. *Development* 120: 3257-3266, 1994
73. Wang Z, Yuan H, Sun C, Xu L, Chen Y, Zhu Q, Zhao H, Huang Q, Dong J, Lan Q. GATA2 promotes glioma progression through EGFR/ERK/Elk-1 pathway. *Med Oncol* 32: 87, 2015
74. Wang Y, He X, Ngeow J, Eng C. GATA2 negatively regulates PTEN by preventing nuclear translocation of androgen receptor and by androgen-independent suppression of PTEN transcription in breast cancer. *Hum Mol Genet* 21: 569-576, 2012
75. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272: 2446-2451, 1997
76. Deryugina EI, Bourdon MA, Jungwirth K, Smith JW, Strongin AY. Functional activation of integrin alpha V beta 3 in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Int J Cancer* 86: 15-23, 2000

77. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153: 893-904, 2001
78. Sithu SD, English WR, Olson P, Krubasik D, Baker AH, Murphy G, D'Souza, SE. Membrane-type 1-matrix metalloproteinase regulates intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-mediated monocyte transmigration. *J Biol Chem* 282: 25010-25019, 2007
79. Bjørn SF, Hastrup N, Larsen JF, Lund LR, Pyke C. Messenger RNA for membrane-type 2 matrix metalloproteinase, MT2-MMP, is expressed in human placenta of first trimester. *Placenta* 21: 170-176, 2000
80. Hiden U, Ghaffari-Tabrizi N, Gauster M, Tam-Amersdorfer C, Cetin I, Dieber-Rotheneder M, Lang U, Desoye G. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 regulates trophoblast functions and is reduced in fetal growth restriction. *Am J Pathol* 182: 1563-1571, 2013
81. Wang H, Cheng H, Shao Q, Dong Z, Xie Q, Zhao L, Wang Q, Kong B, Qu X. Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling. *Biol Reprod* 90: 78, 2014
82. Majali-Martinez A, Hoch D, Tam-Amersdorfer C, Pollheimer J, Glasner A, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Beristain AG, Hiden U, Dieber-Rotheneder M, Desoye G. Matrix metalloproteinase 15 plays a pivotal role in human first trimester cytotrophoblast invasion and is not altered by maternal obesity. *Faseb j* 34: 10720-10730, 2020
83. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases.

Amino Acids 41: 271-290, 2011

84. Dumortier M, Ladam F, Damour I, Vacher S, Bieche I, Marchand N, de Launoit Y, Tulasne D, Chotteau-Lelievre A. ETV4 transcription factor and MMP13 metalloprotease are interplaying actors of breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 20: 73, 2018
85. Tan MY, Mu XY, Liu B, Wang Y, Bao ED, Qiu JX, Fan Y. SUMO-specific protease 2 suppresses cell migration and invasion through inhibiting the expression of MMP13 in bladder cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 32: 542-548, 2013
86. Liu JF, Lee CW, Tsai MH, Tang CH, Chen PC, Lin LW, Lin CY, Lu CH, Lin YF, Yang SH, Chao CC. Thrombospondin 2 promotes tumor metastasis by inducing matrix metalloproteinase-13 production in lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 155: 537-546, 2018
87. Knäuper V, Will H, López-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271: 17124-17131, 1996
88. Sinai Talaulikar V, Kronenberger K, Bax BE, Moss R, Manyonda I. Differences in collagen ultrastructure of human first trimester decidua basalis and parietalis: implications for trophoblastic invasion of the placental bed. *J Obstet Gynaecol Res* 40: 80-88, 2014
89. Takao T, Asanoma K, Kato K, Fukushima K, Tsunematsu R, Hirakawa T, Matsumura S, Seki H, Takeda S, Wake N. Isolation and characterization of human trophoblast side-population (SP) cells in primary villous cytotrophoblasts and

- HTR-8/SVneo cell line. *PLoS One* 6: e21990, 2011
90. Bilban M, Tauber S, Haslinger P, Pollheimer J, Saleh L, Pehamberger H, Wagner O, Knöfler M. Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta* 31: 989-96, 2010
 91. Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Schmidt A, Chaiwangyen W, Markert UR. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta* 35 Suppl:S39-45, 2014
 92. Tsui NB, Jiang P, Wong YF, Leung TY, Chan KC, Chiu RW, Sun H, Lo YM. Maternal plasma RNA sequencing for genome-wide transcriptomic profiling and identification of pregnancy-associated transcripts. *Clin Chem* 60: 954-962, 2014
 93. Tarca AL, Romero R, Erez O, Gudicha DW, Than NG, Benshalom-Tirosh N, Pacora P, Hsu CD, Chaiworapongsa T, Hassan SS, Gomez-Lopez N. Maternal whole blood mRNA signatures identify women at risk of early preeclampsia: a longitudinal study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 3: 1-12, 2020
 94. Ghaedi H, Mozaffari MAN, Salehi Z, Ghasemi H, Zadian SS, Alipour S, Hadianpour S, Alipour B. Co-expression profiling of plasma miRNAs and long noncoding RNAs in gastric cancer patients. *Gene* 687: 135-142, 2019
 95. Liao Y, Lu W, Che Q, Yang T, Qiu H, Zhang H, He X, Wang J, Qiu M, Zou Y, Gu W, Wan X. SHARP1 suppresses angiogenesis of endometrial cancer by decreasing hypoxia-inducible factor-1alpha level. *PLoS One* 9: e99907, 2014
 96. Zeng H, Jorapur A, Shain AH, Lang UE, Torres R, Zhang Y, McNeal AS, Botton T, Lin J, Donne M, Bastian IN, Yu R, North JP, Pincus L, Ruben BS, Joseph NM, Yeh I, Bastian BC, Judson RL. Bi-allelic Loss of CDKN2A Initiates Melanoma Invasion via BRN2 Activation. *Cancer Cell* 34: 56-68, 2018

97. Li J, Belogortseva N, Porter D, Park M. Chmp1A functions as a novel tumor suppressor gene in human embryonic kidney and ductal pancreatic tumor cells. *Cell Cycle* 7: 2886-2893, 2008
98. Ennen M, Klotz R, Touche N, Pinel S, Barbieux C, Besancenot V, Brunner E, Thiebaut D, Jung AC, Ledrappier S, Domenjoud L, Abecassis J, Plenat F, Grandemange S, Becuwe P. DDB2: a novel regulator of NF-kappaB and breast tumor invasion. *Cancer Res* 73: 5040-5052, 2013
99. Bommi PV, Ravindran S, Raychaudhuri P, Bagchi S. DDB2 regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Oral/Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncotarget* 9: 34708-34718, 2018
100. Huang H, Wu K, Ma J, Du Y, Cao C, Nie Y. Dopamine D2 receptor suppresses gastric cancer cell invasion and migration via inhibition of EGFR/AKT/MMP-13 pathway. *Int Immunopharmacol* 39: 113-120, 2016
101. Qi Y, Lv J, Liu S, Sun L, Wang Y, Li H, Qi W, Qiu W. TSPAN9 and EMILIN1 synergistically inhibit the migration and invasion of gastric cancer cells by increasing TSPAN9 expression. *BMC Cancer* 19: 630, 2019
102. Liu XL, Zhang XT, Meng J, Zhang HF, Zhao Y, Li C, Sun Y, Mei QB, Zhang F, Zhang T. ING5 knockdown enhances migration and invasion of lung cancer cells by inducing EMT via EGFR/PI3K/Akt and IL-6/STAT3 signaling pathways. *Oncotarget* 8: 54265-54276, 2017
103. Gou WF, Shen DF, Yang XF, Zhao S, Liu YP, Sun HZ, Su RJ, Luo JS, Zheng HC. ING5 suppresses proliferation, apoptosis, migration and invasion, and induces autophagy and differentiation of gastric cancer cells: a good marker for carcinogenesis and subsequent progression. *Oncotarget* 6: 19552-19579, 2015

104. Maegdefrau U, Bosserhoff AK. BMP activated Smad signaling strongly promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Mol Pathol* 92: 74-81, 2012
105. Theriault BL, Shepherd TG, Mujoomdar ML, Nachtigal MW. BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 28: 1153-1162, 2007
106. Ramsey J, Butnor K, Peng Z, Leclair T, van der Velden J, Stein G, Lian J, Kinsey CM. Loss of RUNX1 is associated with aggressive lung adenocarcinomas. *J Cell Physiol* 233: 3487-3497, 2018
107. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4: e05005, 2015