

氏名	おこやま まなぶ 小古山 学
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 627 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	<b>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</b>
論文審査委員	(委員長) 高橋 将文 教授 (委員) 高木 健次郎 教授 三瀬 名丹 准教授

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

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)の母体脱落膜や子宮筋層、らせん動脈への“浸潤”はきわめて重要である。子宮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、豊富な母体血液が絨毛間腔へ流入する。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。一方で、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ことが分かっている。したがって、EVT の浸潤調節機構の解明が望まれるが、現時点ではその機序は十分に明らかになっていない。

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り、その中には遺伝子発現調節に関与しているものも多い。ncRNA のうち、20-25 塩基長の microRNA (miRNA) はヒトでは約 2,000 種が同定されており、標的遺伝子 mRNA 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。また、近年注目を集めている long non-coding RNA (lncRNA) はヒトでは約 25,000 種が同定されており、様々な機序で遺伝子発現調節に関与している可能性が報告されているが、多くの lncRNA の発現様式や機能は明らかになっていない。本研究では、lncRNA *H19* に注目した。*H19* は多くの腫瘍組織に高発現しており、転写調節、miRNA 抑制などを介して腫瘍形成に関与していると多くの癌領域の研究で報告されている。さらに、*H19* は自身が lncRNA として機能するだけでなく、*miR-675* (*miR-675-5p* および *miR-675-3p*) を産生することも分かっている。また、*H19* は胎芽組織および胎盤栄養膜細胞にも高発現しており、出生後の各種組織や細胞ではその発現が減少する。このことから、*H19* は胎盤形成に重要な役割を果たしていることが予想されるが、これまで、*H19* および *miR-675* 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* のうち、*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。

今回、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* は EVT の浸潤に関与しているか

*miR-675-5p* が EVT 浸潤に関与しているのであれば、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

## 2 研究方法

**細胞:** EVT 細胞株として、HTR-8/SVneo および HChEpC1b を用いた。また、自治医科大学および日本医科大学の倫理委員会承認を得て、妊娠初期および後期の妊婦から回収した胎盤から EVT を分離培養して利用した。

**遺伝子発現評価:** リアルタイム PCR、RNA シークエンス、ウェスタンブロットを行った。

**遺伝子過剰発現:** *miR-675-5p* mimic または negative control (NC) をリポフェクションで導入した。

**遺伝子抑制:** siRNA (siGATA2, siMMP13, siMMP14, siNC) をリポフェクションで導入した。

**細胞浸潤能評価:** 24 ウェルプレートの上下2層からなるチャンバーの上層に一定細胞数を添加し、24 時間後もしくは 48 時間後にマトリゲルでコーティングした膜を通過した細胞数を計測し評価した。

**細胞増殖能評価:** 96 ウェルプレートに一定細胞数を添加し、0、24、48、72 時間後の ATP 活性を測定することで評価した。

**microRNA 標的遺伝子候補の抽出:** TargetscanHuman release 7.2 データベース ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/;](http://www.targetscan.org/vert_72/)) を用いた。

**ルシフェラーゼレポーターアッセイ:** ホタルルシフェラーゼ活性を有するベクターの末端に標的候補遺伝子の 3' UTR 配列を挿入したベクター (wild) と変異配列を挿入したベクター (mutant) を作成した。*miR-675-5p* mimic または NC をベクターとともに EVT 細胞株に導入し、24 時間後にホタルルシフェラーゼ活性を測定した。各実験系においてホタルルシフェラーゼ活性は同時に導入したウミシイタケルシフェラーゼベクターの活性で補正し、評価した。

**統計解析:** 連続変数については、Student t 検定、Mann-Whitney U 検定、ANOVA (多重検定は Tukey 法) を使用した。p<0.05 を有意差ありとした。

## 3 研究成果

1. lncRNA *H19* および *miR-675-5p* の EVT における発現状態

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 で行くと、いずれも後期胎盤に比べて初期胎盤で有意に高発現していた。妊娠初期胎盤 (7 週、3 例) から分離した EVT 細胞と CVT 細胞の RNA シークエンス解析では、*H19* と *miR-675-5p* は CVT 細胞に比べ EVT 細胞で有意に高発現していた。

2. *miR-675-5p* は EVT の浸潤に関与しているか

*miR-675-5p* の EVT の浸潤能への影響を検証するため、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。*miR-675-5p* mimic と NC 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 EVT 細胞株の浸潤能を有意に促進した。

### 3. *miR-675-5p* が EVT 浸潤に関与しているのであれば、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

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抽出し、それらの中から、過去に細胞浸潤抑制効果を報告された複数の遺伝子に注目した。それらの候補遺伝子中で、EVT 細胞株において *BHLHE41*、*CHMP1A*、*GATA2*、*NOG* の発現が *miR-675-5p* の過剰発現により有意に抑制されていた。そのうち、胎盤に高発現している転写調節因子 *GATA2* が *miR-675-5p* に直接抑制されていることをルシフェラーゼレポーターアッセイにより確認した。続いて、*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 細胞株を用いて細胞浸潤アッセイを行った。siGATA2 により *GATA2* を抑制した細胞はコントロールと比べて有意に浸潤能が促進していた。さらに、*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するため、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*) に注目し、*miR-675-5p* 過剰発現および *GATA2* 抑制によりこれらの発現に変化がみられるか検証した。このうち、*miR-675-5p* 過剰発現と *GATA2* 抑制のいずれにおいても EVT 細胞株における発現が上昇したのは *MMP13* と *MMP14* であった。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 細胞株を用いて細胞浸潤アッセイを行うと、*MMP13* および *MMP14* を抑制した細胞はコントロールと比べて浸潤能が抑制されていた。

## 4 考察

本研究で注目した、lncRNA *H19* 由来の *miR-675-5p* は EVT 細胞株の浸潤能を有意に促進させた。*miR-675-5p* およびその前駆体である lncRNA *H19* は妊娠後期に比べ、EVT 浸潤の盛んな初期胎盤で高発現していた。また、*H19* および *miR-675-5p* のいずれも CVT に比べて EVT で高発現していたことから、これらは妊娠初期の EVT 浸潤に関与している可能性が示唆された。また、*miR-675-5p* による EVT 浸潤促進に関与する標的遺伝子として、胎盤に高発現している転写調節因子 *GATA2* を見出した。EVT 細胞株に *miR-675-5p* を過剰発現させると *GATA2* の発現は有意に抑制された。また、*GATA2* の発現を抑制すると EVT 細胞株の浸潤能は有意に促進した。*GATA2* は腫瘍組織においては浸潤促進にも抑制にも働くことが報告されているが、本研究においては EVT の浸潤を抑制することが示唆された。また、*miR-675-5p* 過剰発現および *GATA2* 抑制のいずれにおいても細胞浸潤を促進する *MMP13* と *MMP14* の発現が上昇していた。このことから、*miR-675-5p* の EVT 浸潤促進の機序の一つとして *miR-675-5p/GATA2/MMP13*、*MMP14* のシグナルパスウェイが関与しているかもしれない。

*miR-675-5p* (およびその前駆体の lncRNA *H19*) が妊娠初期の EVT 浸潤および胎盤形成に重要な役割を担っている可能性を示した。これらの発現異常は妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの病態形成にも関与している可能性がある。また、母体血中でのこれらの発現を評価することで、妊娠高血圧腎症や胎児発育不全の発症予知因子として利用できる可能性も秘めている。

## 5 結論

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 の発現促進が関与している可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

妊娠初期の絨毛外栄養膜細胞 (EVT) のらせん動脈への浸潤は、胎盤形成において極めて重要なプロセスであり、これが異常となると様々な妊娠関連疾患を発症することが知られている。

申請者は、近年、注目を集めている lncRNA のうち lncRNA H19 とその下流にある miR-675-5p に着目し、これらの発現がヒト妊娠初期胎盤で有意に増加していることを見出した。また、2 種類の EVT 細胞に miR-675-5p を導入すると EVT 浸潤や増殖が有意に亢進すること、miR-675-5p の標的分子として *GATA2* を抽出し、miR-675-5p が *GATA2* を低下させることを明らかにした。実際、*GATA2* の siRNA 導入により EVT 浸潤が増加することも確かめられた。さらに、*GATA2* の下流分子として、MMP-13/14 が機能して EVT 浸潤を促進することも明らかにした。

以上の結果から、H19 に由来する miR-675-5p が *GATA2*-MMP-13/14 経路を介して EVT 浸潤に重要な役割を果たしていることが明らかになり、H19 および miR-675-5p が EVT 浸潤異常における新たな治療標的となる可能性や、末梢血 H19 および miR-675-5p 発現の評価が妊娠関連疾患の発症予知マーカーとなる可能性が示された。EVT 浸潤の詳細な機序は未だ明らかではないことから、これらの研究結果は医学的にも重要である。また、miR-675-5p の新たな役割を解明したことから、学術的にも価値があると考えられる。一方、審査の結果、それぞれの審査員から研究の方法や結果の解析と考察、学位論文の記載や誤字・脱字などの問題点が指摘され、申請者に修正を求めた。これらについて適切に修正することを条件として、審査委員全員で合格と判定した。なお、指摘された問題点については、後日適切な修正が行われたことを審査委員全員によって確認した。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は、研究背景や目的、方法、結果、考察について、決められた時間内で要領よく説明した。その内容の骨子は「論文審査の結果」に記載したとおりである。なお、審査委員からなされた主な質問やコメントは以下の通りである。

- 1) 胎盤における H19 と miR-675-5p の関係、miR-675-5p のその他の機能
- 2) MMP-13/14 の発現および活性化の評価
- 3) lncRNA H19 の遺伝子導入
- 4) 初代培養細胞や生体での解析の必要性
- 5) 本研究の今後の方向性および将来の臨床応用への展望

申請者は、ほとんどの質問に対して的確に返答したが、一部の質問に関しては、検討されていない、あるいは現在のところ、分かっていないとのことで、申請者自身の仮説を交えることで適切に答えることができた。また、提出された学位論文では、字句の表記の修正や略語表の追加、文献の追加なども指摘されたが、審査委員から指摘された諸点に従って、学位論文および論文要旨が適切に修正、加筆された。

以上の発表および質疑応答から、申請者が十分な資質と能力を有していることが明らかになり、審査委員全員一致で合格と判断された。