

博士学位論文 2020(令和 2)年度

# 胎盤栄養膜細胞の分化における miR-126 の役割

慶應義塾大学大学院薬学研究科

潘 晓乐

## 論文内容の要約

### 【背景】

胎盤は妊娠時のみに形成される一時的な臓器であり、母体胎児間の物質交換およびガス交換を担い、胎児発育や免疫寛容に重要な役割を果たしている。胚盤胞の子宮への着床後、細胞性栄養膜細胞は絨毛栄養膜細胞と絨毛外栄養膜細胞に分化する。非遊走性の絨毛栄養膜細胞は細胞同士が融合することにより多核の合体栄養膜細胞層を形成し、胎盤関門としての機能を担う。一方、絨毛外栄養膜細胞は子宮脱落膜に浸潤し、子宮血管内皮と置き換わることで胎児の酸素および栄養要求を充足可能な太さへと子宮らせん動脈を再構築し、胎盤への血液供給を確保する。異常な胎盤形成は妊娠高血圧腎症(preeclampsia; PE)や子宮内胎児発育不全(fetal growth restriction; FGR)等の周産期合併症の発症に関与する。

microRNAs (miRNAs)は小分子 1 本鎖 RNA であり、主にターゲット mRNA の 3'非翻訳領域(untranslated region; UTR)に結合し、mRNA からタンパク質への翻訳過程を抑制することで遺伝子発現を制御する。ヒト全タンパク質の 66%が胎盤で発現し、全遺伝子の 90%の発現は miRNAs による制御を受けると推定されている。ヒト胎盤には 600 種以上の miRNAs が発現し、栄養膜細胞の増殖や遊走、浸潤などの調節、血管新生の制御などを介して、胎盤の発達に寄与している。さらに、胎盤に発現している miRNAs は、母体循環に放出され、血液や尿から検出可能であるため、妊娠合併症や胎児成長のバイオマーカーおよび治療標的としての有用性が検討されている。

miR-126 (i.e. miR-126-3p)は、ヒト、マウス、およびラット胎盤に発現し、種間で配列が高度に保存された miRNA の一つである。一般に外因性の miRNA 機能の欠失がマウスの表現型に与える影響は軽微であることが多いが、miR-126 の欠損マウスでは、胎盤の表現型異常と胎生致死が示される。したがって、miR-126 は正常な妊娠の維持に重要な miRNA であるといえる。また、ヒト妊娠高血圧腎症胎盤における miR-126 の発現は、正常胎盤と比較して上昇するという報告と減少するという報告が混在する。これは、miR-126 が妊娠の時期や発現細胞によって状況依存的な機能を示すためだと考えられているが、詳細は不明である。

miR-126 は血管内皮細胞に高発現し、血管新生や胚発生に関与することが示唆されている。ヒト臍帯血由来の内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells; EPCs)に発現する miR-126 は、phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 2 (PIK3R2)を標的として PI3K/Akt 経路を活性化することで、細胞の増殖、分化、および遊走を促進する。また、*N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

誘発性妊娠高血圧腎症モデルラット胎盤に miR-126 を導入することにより、母体血圧の低下および胎児成長が改善し、胎盤迷路部の胎児微小血管密度の上昇も観察されたことから、miR-126 が胎盤においても血管新生促進に重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、miR-126 は栄養膜細胞においても発現するにもかかわらず、miR-126 が栄養膜細胞の分化に果たす役割はほとんど明らかになっていない。miR-126 が胎盤機能に与える影響を明らかにするためには、血管内皮細胞のみならず、胎盤形成過程の栄養膜細胞における役割についても明らかにする研究が必要である。

## 【目的】

本研究では、栄養膜細胞における miR-126 の役割を明らかにすることを目的とし、ヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞を栄養膜細胞モデルとして、以下の解析を行った。第一に、細胞性栄養膜細胞の絨毛外栄養膜細胞への分化に miR-126 が与える影響を、増殖、遊走および浸潤能に基づいて解析した。第二に、細胞性栄養膜細胞の絨毛栄養膜細胞への分化に miR-126 が与える影響を、栄養膜融合因子の発現に基づいて解析した。

## 【方法】

JEG-3 細胞に miR-126、miR-126 阻害剤、forskolin、LIN28A の発現プラスミド、あるいは siLIN28A を導入または添加し、miR-126 および mRNA 発現を定量 PCR によって評価した。細胞の増殖能は MTT 試験、遊走および浸潤能はマトリゲル非コートおよびコートした transwell を通過した細胞数、タンパク質発現は western blotting、mRNA 3'非翻訳領域を介した遺伝子発現制御は luciferase assay によって、それぞれ評価した。

## 【結果】

### 1. miR-126 が JEG-3 細胞の増殖、遊走および浸潤に与える影響

JEG-3 細胞における miR-126 の過剰発現は、細胞の増殖および遊走には影響を与えなかった一方、浸潤能を 40%低下させた。また、JEG-3 細胞における miR-126 の過剰発現により、栄養膜前駆細胞の多能性維持を担う RNA 結合タンパク質である LIN28A の発現が 27%減少した。LIN28A の 3'非翻訳領域を luciferase 遺伝子の下流に挿入した plasmid を JEG-3 細胞に導入することで得られる luciferase 活性は、miR-126 を過剰発現させることによって約 50%低下した一方、LIN28A 3'

非翻訳領域に存在する miR-126 結合予測配列を変異させたベクターおよび LIN28A 3'非翻訳領域が存在しないベクターで場合には、miR-126 の過剰発現による luciferase 活性の低下は示されなかったことから、LIN28A は miR-126 の標的遺伝子であることが示された。

JEG-3 細胞に miR-126 と同時に LIN28A 過剰発現ベクターを導入して浸潤能を評価した。miR-126 によって低下した JEG-3 細胞の浸潤能は、LIN28A の過剰発現によって回復した。さらに、miR-126 過剰発現による LIN28A タンパク質の発現抑制は、siRNA による LIN28A ノックダウン (siLIN28A) 時と同程度までに JEG-3 細胞の浸潤を低下させた。miR-126 と siLIN28A を同時に JEG-3 細胞に導入した場合でも、相加的な浸潤抑制作用は示されなかった。これらより、miR-126 による JEG-3 細胞の浸潤低下は、LIN28A の発現抑制を介するものであることが示唆された。

## 2. miR-126 が JEG-3 細胞における合胞体化因子の発現に与える影響

miR-126 が JEG-3 細胞における細胞の合胞体化に関与する syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A の発現量に与える影響を評価した。JEG-3 細胞に miR-126 を過剰発現させることで、syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A の mRNA 発現量が有意に上昇した。以上の結果から、miR-126 は栄養膜細胞の合胞体化を促進する方向に遺伝子発現を誘導することが示された。

JEG-3 細胞において、forskolin は PKA シグナルを活性化し、合胞体栄養膜細胞としての機能を一部獲得する。Forskolin 添加による JEG-3 細胞中 miRNA の変動を miRNA マイクロアレイで網羅的に解析した結果、JEG-3 細胞における miR-126 の発現は、forskolin 添加によって、全 miRNA 中最大の約 5 倍に上昇した。一方、forskolin を添加した JEG-3 細胞に miR-126 阻害剤を導入することで、miR-126 の発現は、forskolin 非添加細胞と同程度に減少した。これら結果から、forskolin は miR-126 発現を上昇させることで細胞融合を促進する遺伝子の発現を誘導する可能性があることが示唆された。

Forskolin による syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A の発現誘導が miR-126 の発現上昇を介しているのかを検討するため、miR-126 阻害剤を導入した JEG-3 細胞を forskolin 添加または非添加条件で培養し、syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A の発現を定量した。Forskolin 添加によって、JEG-3 細胞における、syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A mRNA の発現はいずれも有意に増加したが、その発現上昇は、miR-126 阻害剤によって、syncytin-1 では有意に減少し、syncytin-2 についても減少傾向を示した。一方、forskolin による MFSD2A の発現上昇は、miR-126 阻害剤の有無によって変化しなかった。以上の結果から、forskolin による syncytin 発現誘導機構におい

て、一部に miR-126 が関与することが示唆された。Forskolin 添加によって、LIN28A mRNA 発現が減少したが、miR-126 阻害剤の導入によっては、その発現量は変化しなかった。また、LIN28A の過剰発現によって、syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A mRNA 発現量に有意な変動は示されなかった。さらに、siRNA による LIN28A のノックダウンによって、syncytin-1 mRNA 発現量は変化せず、syncytin-2 および MFSD2A mRNA 発現量は減少した。したがって、miR-126 による合胞体化因子の発現誘導に LIN28A が関与する可能性は低い。

### 【考察】

本研究より、miR-126 は、JEG-3 細胞増殖能および遊走能に影響せず、LIN28A の発現制御を介して JEG-3 細胞の浸潤抑制に働くことを明らかにした。栄養膜細胞の脱落膜への浸潤不足は、妊娠高血圧腎症発症に関与することから、miR-126 が正常胎盤よりも高発現する妊娠高血圧腎症胎盤では、miR-126 によって浸潤が抑制されている可能性がある。また、miR-126 の発現は妊娠後期の胎盤において妊娠初期の胎盤よりも 2.2 倍高いことから、正常な胎盤において、miR-126 は、妊娠後期における過剰な浸潤を抑制している可能性が示された。ヒト胎盤において、LIN28A 発現量は満期胎盤より first trimester の方が約 700 倍高く、LIN28A は妊娠初期のらせん動脈の再構築段階において重要な役割を果たすと考えられる。miR-126 は LIN28A 発現を抑制することから、妊娠初期における miR-126 低発現は LIN28A 高発現に結びつき、栄養膜細胞の浸潤によるらせん動脈の再構築に寄与している可能性がある。一方、妊娠後期における、miR-126 高発現は LIN28A 発現量の低下に寄与し、過度な浸潤を抑えていると考えられる。さらに、妊娠初期の胎盤における miR-126 の過度な発現上昇は LIN28A 発現を抑制することで、妊娠初期に栄養膜細胞の低浸潤によるらせん動脈の再構築不全を起こし、妊娠高血圧腎症の発症や病状に関与する可能性も示唆された。

本研究において、JEG-3 細胞における miR-126 過剰発現は、syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A mRNA 発現を上昇させることを示した。ただし、LIN28A の過剰発現やノックダウンが syncytin や MFSD2A の発現に及ぼす影響は明確ではなく、miR-126 による syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A mRNA 発現誘導機構には、LIN28A 以外の因子が働いている可能性が高い。

分化後の合胞体栄養膜細胞は増殖できないため、合胞体栄養膜細胞層によって形成さ

れる胎盤関門の維持は、単核の絨毛栄養膜細胞の合胞体栄養膜細胞層への継続的な融合に依存している。つまり、未分化の絨毛栄養膜細胞の増殖およびその合胞体栄養膜細胞への融合を適切に制御することが、合胞体栄養膜細胞層の安定性にとって重要である。Syncytin-1 は栄養膜細胞の増殖を促進し、合胞体栄養膜細胞層との融合も誘導することから、胎盤関門の成立と維持に重要な役割を果たしている。妊娠高血圧腎症の胎盤では syncytin-1 発現が減少しており、syncytin-1 の発現減少は未分化の栄養膜細胞の数を減らし、合胞体栄養膜細胞も減少させる。JEG-3 細胞において、miR-126 過剰発現によって syncytin-1 発現が誘導されたが、細胞増殖能の変化は示されず、また miR-126 が誘導した syncytin-1 発現上昇はわずかであり、細胞増殖能を促進するのに十分ではないと考えられる。ただし、miR-126 は syncytin-2 および MFSD2A の発現も誘導したため、miR-126 が合胞体栄養膜細胞形成を促進する可能性がある。miR-126 発現は妊娠進行に伴って上昇することから、妊娠後期における miR-126 発現上昇の不全は、syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A 発現誘導を抑制し、胎盤関門の機能不全に結びつく可能性がある。

JEG-3 細胞における PKA シグナルの活性化は syncytin および MFSD2A の発現量を増加させることが知られている。Forskolin 添加による miR-126 の発現上昇率は、JEG-3 に発現する miRNA 中で最も高く、さらに forskolin による syncytin mRNA 発現誘導は、miR-126 阻害剤によって減少した。したがって miR-126 は、PKA シグナルを介した栄養膜細胞合胞体化の少なくとも一部に役割を果たしている可能性が高い。

## 【結論】

本研究において、絨毛癌由来 JEG-3 細胞を栄養膜細胞モデルとして用い、miR-126 が LIN28A を介して細胞浸潤を抑制すること、そして細胞融合に重要な遺伝子である syncytin-1、syncytin-2 および MFSD2A を誘導することを明らかにした。これらは、妊娠初期における高 miR-126 発現が LIN28A を介した栄養膜細胞の浸潤を抑制して子宮らせん動脈の再構築不全を惹起し、妊娠高血圧腎症の発症に関与する可能性を示すものである。一方、妊娠後期における低 miR-126 発現は syncytin や MFSD2A の低発現につながり、胎盤関門の形成に影響する可能性も示された。本結果は、妊娠高血圧腎症胎盤で示されている異常な miR-126 発現のもたらす影響を理解する上で重要な知見である。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

X Pan, S Noguchi, M Ando, T Nishimura, M Tomi: MicroRNA-126 suppresses the invasion of trophoblast-model JEG-3 cells by targeting LIN28A, *Biochem Biophys Res Commun*, **545**: 132-137 (2021).

### 【参考論文】

S Noguchi, A Takagi, T Tanaka, Y Takahashi, X Pan, Y Kibayashi, R Mizokami, T Nishimura, M Tomi: Fluorouracil uptake in triple-negative breast cancer cells: negligible contribution of equilibrative nucleoside transporters 1 and 2, *Biopharm Drug Dispos.*, Online ahead of print. (doi: 10.1002/bdd.2261)