

氏 名	山下 (布出) 実紗
(ふりがな)	(やました (ぬので) みさ)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲 第52号
学位審査年月日	令和5年1月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	miR-515-5p suppresses trophoblast cell invasion and proliferation through XIAP regulation in preeclampsia (miR-515-5pは妊娠高血圧腎症におけるXIAPを介 して栄養膜細胞の浸潤と増殖を抑制する)
論文審査委員	(主) 教授 芦田 明 森 龍彦 高井 真司

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《目 的》

妊娠高血圧腎症は全妊婦の約2-8%に発症する合併症で、重症化すると母体および胎児・新生児の双方が生命の危険に脅かされる重篤な疾患であるが、その予防法はない。妊娠高血圧腎症の現時点での唯一の治療は妊娠終了であり、その発症時期が早ければ人工早産をせざるを得ない状況である。

妊娠高血圧腎症の発症メカニズムとしてはこれまでに様々な説が示されており、胎盤トロホブラストの浸潤が不十分であるという説は研究者に広く受け入れられているが、その病態は未解明な部分が多く残されている。

XIAPは、アポトーシス蛋白阻害物質の一種であり、胎盤の形成過程において発現している。XIAPは上皮間葉転換を促進することにより、細胞移動を促進していることが知られて

いる。妊娠高血圧腎症ではトロホブラストにおける XIAP の発現が低下し、胎盤のアポトーシスの増加と関連していると考えられているが、どのように制御されているかは不明である。

これまでの研究により、ヒト胎盤には大量の miRNA が存在し、妊娠高血圧腎症胎盤で発現量の異なる miRNA が多数報告されている。

本研究では、XIAP の発現を制御する miRNA の候補を同定し、妊娠高血圧腎症の病態における役割を明らかにすることを目的とした。

## 《方法と結果》

### 1. 妊娠高血圧腎症合併妊婦血清中における特異的 miRNA の同定

妊娠高血圧腎症合併妊婦 3 名と正常妊婦 3 名の母体血清から抽出した RNA を用いて網羅的な miRNA マイクロアレイ解析を行った。正常妊婦と比較し、妊娠高血圧腎症合併妊婦で有意に発現量が異なった 76 の miRNA のうち、先行研究により妊娠高血圧腎症の胎盤で有意に増加していることが報告されている miR-515-5p が正常妊婦と比較し、血清中でも発現レベルが有意に上昇していた。

### 2. HTR8/SVneo における miR-515-5p の過剰発現による XIAP の発現量への影響の検討

ヒト絨毛モデル細胞である HTR8/SVneo に pre-miR-515-5p または negative control miRNA をトランスフェクションし、XIAP の発現量を RT-qPCR 法および Western blot 法により比較した。pre-miR515-5p をトランスフェクションすることにより negative control をトランスフェクションした場合と比較し、XIAP の発現量は有意に低下した。この結果は RT-qPCR 法および Western blot 法でともに確認した。

### 3. HTR8/SVneo において XIAP が miR-515-5p の標的遺伝子であるかの検討

HTR8/SVneo に pre-miR-515-5p、anti-miR-515-5p または negative control miRNA と野生型ヒト XIAP の 3' UTR を組み込んだベクターを共導入し、それぞれ 48 時間後に培養液を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼで標識した XIAP の 3' UTR を組み込んだベクターと、pre-miR-515-5p を共導入すると、同ベクターと negative control

miRNA を共導入した場合と比較し、ルシフェラーゼ活性が有意に低下した。同様に同ベクターと anti-miR-515-5p を共導入すると、ルシフェラーゼ活性は有意に上昇した。このことから、miR-515-5p が XIAP 3' UTR を直接標的とすることにより XIAP の発現量を低下させることが示された。

#### 4. miR-515-5p の過剰発現が HTR8/SVneo の細胞増殖能と浸潤能に及ぼす影響の検討

HTR8/SVneo に pre-miR-515-5p または negative control miRNA をトランスフェクションし、miR-515-5p の過剰発現による増殖能、浸潤能の変化を MTT assay、invasion assay で評価した。pre-miR-515-5p を過剰発現させた細胞では negative control と比較し、細胞増殖能および細胞浸潤能が有意に抑制された。

#### 5. ヒト胎盤における XIAP 発現量の比較検討

正常妊婦 3 名と比較し、妊娠高血圧腎症合併妊婦 3 名の胎盤で XIAP の発現量が低下しているか否かを RT-qPCR 法で評価した。XIAP の発現は妊娠高血圧腎症の胎盤で正常妊婦の胎盤と比較し、有意に低下していた。

#### 6. ヒト胎盤における上皮間葉転換の変化に関する比較検討

正常妊婦の胎盤と比較し、妊娠高血圧腎症の胎盤において、上皮間葉転換が抑制されているか否かを免疫組織学的染色により評価した。正常妊婦の胎盤と比較し、妊娠高血圧腎症の胎盤では Ki-67 の発現が低い傾向にあり、また、E-cadherin の消失および vimentin の増加が確認された。この結果は、妊娠高血圧腎症の胎盤では上皮間葉転換が抑制されていることが示唆される。

### 《 結 論 》

本研究では、絨毛モデル細胞において、miR-515-5p が XIAP の発現抑制を介して、細胞の増殖能および浸潤能を低下させることを示した。さらに妊娠高血圧腎症の胎盤では正常妊婦の胎盤と比較し、XIAP の発現が低下しており、上皮間葉転換の減少が観察された。

miR-515-5p の過剰発現による XIAP の発現量低下は、胎盤トロホブラスト細胞の適切な細胞増殖および浸潤を阻害し、妊娠高血圧腎症の発症に関与している可能性があり、血清中

の miR-515-5p は妊娠高血圧腎症を予測するバイオマーカーとして機能する可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

妊娠高血圧腎症は母体および胎児・新生児の双方の生命を脅かす重篤な妊娠合併症である。胎盤形成には母体脱落膜や子宮筋層へのトロホブラストの浸潤が必要であり、それらが障害をうけると妊娠高血圧腎症を引き起こす。

本研究は妊娠高血圧腎症患者の血中で増加している miRNA を同定し、その中で miR-515-5p が XIAP の発現抑制を介して、トロホブラストへの細胞増殖能、浸潤能へ与える影響を、ヒト絨毛モデル細胞である HTR8/SVneo を用いて明らかとした。さらに正常妊婦と妊娠高血圧腎症合併妊婦の胎盤での XIAP の発現量を比較検討したものである。

申請者は以下の実験を行った。本学附属病院で分娩となった正常妊婦および妊娠高血圧腎症合併妊婦より分娩時に採取した血清から抽出した RNA を用いて網羅的な miRNA マイクロアレイ解析を行い、先行研究により妊娠高血圧腎症の胎盤で有意に増加していることが報告されている miR-515-5p が血清中でも発現レベルが有意に上昇していることを確認した。HTR8/SVneo に miR-515-5p を遺伝子導入したところ、XIAP の発現は低下し、細胞の増殖能及び浸潤能が低下していた。続いて、miR-515-5p が XIAP の 3' UTR を直接標的としていることをルシフェラーゼアッセイで示した。臨床胎盤でも評価を行い、XIAP の発現が正常胎盤と比較し、妊娠高血圧腎症の胎盤で有意に低下していることを RT-qPCR 法で確認した。また、免疫組織学的染色で、妊娠高血圧腎症の胎盤で上皮間葉転換が抑制されていることを示した。

以上の結果より、miR-515-5p の過剰発現による XIAP の発現量の低下が、胎盤トロホブラスト細胞の適切な細胞増殖および浸潤を阻害し、妊娠高血圧腎症の発症に関与している可能性があり、血清中の miR-515-5p は妊娠高血圧腎症を予測するバイオマーカーとして機能する可能性を示唆しており、将来的な妊娠高血圧腎症の早期発見につながる研究成果であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Molecular and Cellular Endocrinology

22:559: 111779. 2022 Sep

doi: 10.1016/j.mce.2022.111779. Online ahead of print.