

## 学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 子宮内膜機能異常関連疾患に関する基礎的研究とその臨床応用

研究代表者 梶原 健 (大学病院 産科婦人科)

研究分担者 石原 理<sup>1)</sup>, 藤田 恵子<sup>2)</sup>

## 緒言

体外受精・胚移植周期においては排卵誘発・胚培養技術を含めた様々な部分で工夫がなされそれに伴い妊娠率も上昇してきたが、ここ数年間の妊娠率にはほぼ変化がなく、また形態良好胚を移植しても妊娠に至らない症例が散見される。この原因の大きな一つは着床期周辺の子宮内膜機能のメカニズムに関し未だ不明な点が多く、その部分に関する工夫がほとんどなされていないためである。そのため着床期周辺の子宮内膜機能のメカニズム一端を明らかとし、その知見より適切な治療法を開発することは不妊症治療における着床率改善、しいては妊娠率上昇のためには重要なポイントである。

microRNA (miRNA) は、遺伝子発現の転写後調節を司る機能性低分子RNAである。miRNAは子宮内膜を含めた女性生殖組織にも発現が認められ、様々な生理的・病理学的機能を担っていると考えられている。またmiRNAは多くの病態診断のバイオマーカーとして有望であるのみならず、標的遺伝子が同定されその発現を制御するmiRNAの機能が明らかとなれば、そのmiRNAは新規治療薬のターゲットとなり得る。そこで本研究では脱落膜化過程を制御する転写因子の発現を制御しているmiRNAをMicro array解析により同定し、その機能を解析する事を目的とした。

## 材料と方法

良性疾患により子宮摘出を行った患者から同意を得て、常法にて子宮内膜間質細胞を分離・培養した。脱落膜化刺激は8-br-cAMPとMPAで行った。脱落膜化刺激を施行した群(脱落膜化群)と施行しない群(control群)からmiRNAを含む全RNAを抽出しmiRNA発現アレイを施行した。また上記2群間でmRNA発現アレイを行い、脱落膜化前後で発現変動するmiRNAとその標的遺伝子であるmRNAの組み合わせを、解析ソフトを用いて照合した。その結果から、有意な発現変動を認めたmiRNAの中で、

脱落膜化過程に関連するmRNAを標的遺伝子とするものを抽出した。

## 結果

## ■ 脱落膜化前後で変動するmiRNAの同定

良性疾患により子宮内膜組織を採取し、ヒト子宮内膜間質細胞(HESCs)を単離した。単離したHESCsを非脱落膜化群と、8-br-cAMPとMPAで脱落膜化刺激を加えた脱落膜化群に分け6日間培養した。脱落膜化の確認は、位相差顕微鏡による形態学的変化や、リアルタイムPCR法を用いて脱落膜化マーカーとして広く知られている*PRL*、*IGFBP1*のmRNAの発現を確認した。HESCsは、脱落膜化刺激を加え6日間培養すると、1つ1つの細胞が大型化し敷石状の変化を示した。更に、mRNAレベルでは、*PRL*の発現が脱落膜化群では有意に上昇した(\* $p < 0.05$ )。また、*IGFBP1*に関しても同様の結果であった。

次に、各3検体を非脱落膜化群と脱落膜化群の2群にわけ、合計6枚のmiRNA発現アレイを施行した。計6枚のアレイ全ての結果から、脱落膜化前後で発現シグナルが2倍以上上昇するもの、また1/2以下に低下しているmiRNAのみを抽出した。その結果、1368個のmiRNAの中で脱落膜化前後で有意差を持って変動したmiRNAは、9種類であった。抽出した9種類のmiRNAの内訳は、8種類は脱落膜化後に2倍以上に上昇し、1種類は1/2以下に低下していた。

## ■ 脱落膜化前後で変動するmiRNAに対応する標的遺伝子の同定

miRNA発現アレイとmRNA発現アレイの結果を、解析ソフトであるIngenuity Pathways Analysis (IPA)を使用し、9種類のmiRNAとそれらに対応する脱落膜化に関連する標的mRNAの組み合わせを抽出した。

最終的に、脱落膜化過程に関連する遺伝子を標的とするmiRNAはmiR-542-3p、miR-424、miR-503、miR-155の4種類であった。この中から、脱落膜化マーカーである*IGFBP1*を標的遺伝子とするmiR-542-3pについてさらに実験をすすめた。

1) 大学病院 産科婦人科

2) 医学部 解剖学

### ■ miR-542-3pは脱落膜化マーカーである*IGFBP1*を標的とする

発現アレイでの結果を他のサンプルを用いリアルタイムPCR法で確認した。miRNA発現アレイの結果同様、miR-542-3pは脱落膜化刺激後に有意差を持って低下した(\* $p < 0.05$ )。また、*IGFBP1*も同様に有意差を持って発現の上昇を認めた(\* $p < 0.05$ )。

### ■ HESCsにmiR-542-3pを強制発現すると、脱落膜化は抑制される

HESCsにmimic Negative Controlを強制発現させ、同時に脱落膜化刺激を加えると、細胞は大型で敷石状の配列を示し、脱落膜化変化を認めた。しかし、miR-542-3pを強制発現させ、同時に脱落膜化刺激を加えると、形態学的に脱落膜化変化を示さなかった。HESCsにmiR-542-3pを強制発現させた細胞では、標的遺伝子である*IGFBP1*のmRNAの発現は有意に低下した(\*\* $p < 0.001$ )。また、もう1つの脱落膜化マーカーである*PRL*のmRNAの発現も有意に低下した(\*\* $p < 0.01$ )。miR-542-3pを強制発現させたHESCsの培養上清中の*IGFBP-1*の蛋白濃度も低下していた(\*\* $p < 0.001$ )。

これらのデータから、miR-542-3pは、タンパクレベルやmRNAレベル、更には形態学的にも、脱落膜化を*IGFBP1*の発現を介して制御していることが明らかとなった。

### ■ miR-542-3pは*IGFBP1*の発現を直接的に制御する

最後に、miR-542-3pと*IGFBP1*の直接的な制御関係を確認するため、Luciferase reporter assayを行った。ルシフェラーゼ遺伝子の下流に*IGFBP1*の標的候補部位の配列を組み込みレポーターベクター(*IGFBP1* 3'UTR wt)を作成した。また、*IGFBP1*の標的候補部位の配列に変異を加えたレポーターベクター(*IGFBP1* 3'UTR mut)も作成した。

前述した両ベクターをcos7細胞に導入し、Luciferase reporter assayを行った。その結果、*IGFBP1* 3'UTR wtでは、転写活性が有意に30%低下したが(\*\* $p < 0.01$ )、*IGFBP1* 3'UTR mutでは転写活性に差は見られなかった。

以上のことから、miR-542-3pは*IGFBP1*の非翻訳領域の標的配列を直接的に制御している事が明らかとなった。

## 考 察

miR-542-3pは*IGFBP-1*の発現を制御することにより、形態学的にも生理学的にも子宮内膜間質細胞の分化過程である脱落膜化に対して重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) 栃木秀乃, 梶原 健, 田丸俊輔, 亀井良政, 石原 理. 脱落膜化過程で発現するmicroRNAとその標的遺伝子の探索, 第66回日本産科婦人科学会学術講演会, 平成26年4月18-20日, 東京
- 2) 栃木秀乃, 梶原 健, 水野洋介, 田丸俊輔, 亀井良政, 岡崎康司, 石原 理. miR542-3pは*IGFBP1*の発現制御を介して脱落膜化過程を制御する, 第22回日本胎盤学会学術集会, 平成26年10月3-4日, 京都
- 3) 栃木秀乃, 梶原 健, 石原 理. 脱落膜化過程で発現変動するmicroRNAとその標的遺伝子の探索, 第59回日本生殖医学会学術講演会, 平成26年12月4-5日, 東京
- 4) Tochigi H, Kajihara T, Yosuke M, Tamaru S, Kamei Y, Okazaki Y, Ishihara O. MicroRNAs and their target genes related to endometrial decidualization, ASRM2014 Annual Meeting, 2014/10/18-22, Hawaii