

氏名	多賀 紗也香
(ふりがな)	(たが さやか)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第44号
学位審査年月日	令和4年7月27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-486-5p inhibits invasion and migration of HTR8/SVneo trophoblast cells by down-regulating ARHGAP5 (miR-486-5p は ARHGAP5 の発現を抑制することにより絨毛モデル細胞 HTR8/SVneo の浸潤能、移動能を抑制する)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 矢野 貴人 教授 朝日 通雄

### 学位論文内容の要旨

#### 《目的》

胚の着床において、絨毛細胞の子宮内膜への浸潤、移動は高度に制御されており、この過程の障害が妊娠高血圧腎症の発症に関わることが近年明らかになってきている。

Rho GTPase-activating protein 5 (ARHGAP5) は、細胞骨格を制御することで細胞の浸潤や移動を促進しており、複数の癌種で癌化に関わることが報告されている。また、肺癌において、microRNA (miR)-486-5p の発現の減少により、その標的遺伝子である ARHGAP5 の発現が増加し、癌腫の増大や転移が促進されるとの報告がある。さらに、母体の血液中の胎盤由来のエクソソーム内の miR-486-5p が、正常妊娠と比較して妊娠高血圧腎症で上昇しているという報告があるが、妊娠高血圧腎症における miR-486-5p と ARHGAP5 の役割は

未解明である。

本研究では絨毛モデル細胞である HTR8/SVneo を用いて、miR-486-5p の ARHGAP5 を介した浸潤能、移動能への影響を検討し、正常妊娠と妊娠高血圧腎症症例の胎盤での miR-486-5p と ARHGAP5 の発現を比較した。

## 《方 法》

### 1. HTR8/SVneo における、miR-486-5p の遺伝子導入による ARHGAP5 の発現量への影響の検討

HTR8/SVneo に pre-miR-486-5p または negative control miRNA を transfection し、ARHGAP5 の発現量を RT-qPCR 法および Western blot 法により比較した。

### 2. HTR8/SVneo において ARHGAP5 が miR-486-5p の標的遺伝子であるかの検討

miR-486-5p が ARHGAP5 の 3'UTR に直接結合し作用するか否かをルシフェラーゼアッセイにより検討した。HTR8/SVneo に pre-miR-486-5p または negative control miRNA と、野生型ヒト ARHGAP5 の 3'UTR が組み込まれたベクターを co-transfection し、それぞれ 48 時間後に培養液を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。

### 3. miR-486-5p の過剰発現が HTR8/SVneo の浸潤能、移動能に及ぼす影響の検討

HTR8/SVneo に pre-miR-486-5p または negative control miRNA を transfection し、miR-486-5p の過剰発現による浸潤能、移動能の変化を wound healing assay、invasion assay で評価した。

### 4. ARHGAP5 の発現抑制が HTR8/SVneo の浸潤能、移動能に及ぼす影響の検討

ARHGAP5 siRNA または negative control siRNA を HTR8/SVneo に transfection し、ARHGAP5 の発現量を RT-qPCR 法および Western blot 法で確認した。さらに浸潤能、移動能の変化を wound healing assay、invasion assay で評価した。

### 5. miR-486-5p と ARHGAP5 の胎盤での発現の検討

miR-486-5p が、正常妊娠(n=8)と比較して妊娠高血圧腎症(n=14)の胎盤で増加して

いるか否かを RT-qPCR 法で評価した。また、ARHGAP5 が正常妊娠と比較して妊娠高血圧腎症の胎盤で減少しているか否かを免疫組織学的染色で評価した。

## 《結 果》

1. HTR8/SVneo に pre-miR-486-5p を transfection することにより、negative control miRNA を transfection した場合と比較して ARHGAP5 の発現量は有意に低下した。この結果は RT-qPCR 法においても Western blot 法においても同様に見られた。
2. ルシフェラーゼで標識した ARHGAP5 の 3'UTR を組み込んだベクターと、pre-miR-486-5p を co-transfection すると、同じベクターと negative control miRNA を co-transfection した場合と比較して、ルシフェラーゼ活性は有意に低下した。この結果は miR-486-5p が ARHGAP5 を直接の標的として発現を低下させることを示している。
3. HTR8/SVneo に pre-miR-486-5p を transfection することにより、細胞の浸潤能、移動能は negative control miRNA を transfection した場合と比較して有意に抑制された。
4. HTR8/SVneo に、ARHGAP5 siRNA を transfection することにより、ARHGAP5 の発現は negative control siRNA を transfection した場合と比較して有意に低下した。この結果は RT-qPCR 法においても Western blot 法においても同様に見られた。また、ARHGAP5 siRNA を transfection することにより、HTR8/SVneo の浸潤能、移動能は negative control siRNA を transfection した場合と比較して有意に低下した。これらの結果は pre-miR-486-5p を transfection した際の変化と同様であり、miR-486-5p の過剰発現による HTR8/SVneo への影響は ARHGAP5 の発現抑制を介したものであることが示唆される。
5. miR-486-5p の発現は、正常妊娠の胎盤と比較して妊娠高血圧腎症の胎盤で有意に増加していた。ARHGAP5 の発現は、正常妊娠胎盤と比較して妊娠高血圧腎症の胎盤で低下していた。

## 《結 論》

本研究では、絨毛モデル細胞において、miR-486-5p が ARHGAP5 の発現抑制を介して、細胞の浸潤能、移動能を低下させることを示した。さらに、実際に妊娠高血圧腎症の胎盤では、正常妊娠の胎盤と比較して miR-486-5p の発現は有意に高く、ARHGAP5 の発現は低いことが示された。

miR-486-5p の過剰発現による ARHGAP5 の発現低下が、絨毛細胞の適切な浸潤、移動を妨げ、妊娠高血圧腎症の発症に関与している可能性があり、妊娠高血圧腎症の発症を予測するバイオマーカーや治療介入の標的となる可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

胚の着床においては、絨毛細胞の適切な子宮内膜への浸潤、移動が不可欠であり、その過程は高度に制御されているが、この過程の障害が妊娠高血圧腎症の発症に関わることが近年明らかになってきている。

本研究で申請者は絨毛モデル細胞である HTR8/SVneo を用いて、妊娠高血圧腎症において血中で増加する microRNA (miR)-486-5p の、細胞骨格を制御する Rho GTPase-activating protein 5 (ARHGAP5) を介した絨毛細胞への浸潤能、移動能への影響を検討し、さらに正常妊娠と妊娠高血圧腎症症例の胎盤での miR-486-5p と ARHGAP5 の発現を比較するため、以下の実験を行った。

HTR8/SVneo に miR-486-5p を遺伝子導入したところ、ARHGAP5 の発現は低下し、細胞の浸潤能、移動能は抑制された。次に、miR-486-5p が ARHGAP5 の 3'UTR に直接作用することをルシフェラーゼアッセイで確認した。さらに ARHGAP5 の発現を、siRNA を遺伝子導入して直接抑制することにより、HTR8/SVneo の浸潤能、移動能は miR-486-5p を遺伝子導入した際と同様に抑制された。これらの結果から、絨毛モデル細胞 HTR8/SVneo において、miR-486-5p は ARHGAP5 の発現を抑制することを介して細胞の浸潤能、移動能を抑制することが示された。さらに、臨床検体を用いた実験で、妊娠高血圧腎症の胎盤において miR-486-5p の発現は有意に上昇し、ARHGAP5 の発現は低下していることを明らかにした。

本研究では、miR-486-5p の過剰発現による ARHGAP5 の発現低下が、絨毛細胞の適切な浸潤、移動を妨げ、妊娠高血圧腎症の発症に関与している可能性を明らかにし、妊娠高血圧腎症の発症を予測するバイオマーカーや治療介入の標的となる可能性を示している。

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)

Placenta 123: 5-11, 2022 Jun In press

doi: 10.1016/j.placenta.2022.04.004. Online ahead of print.