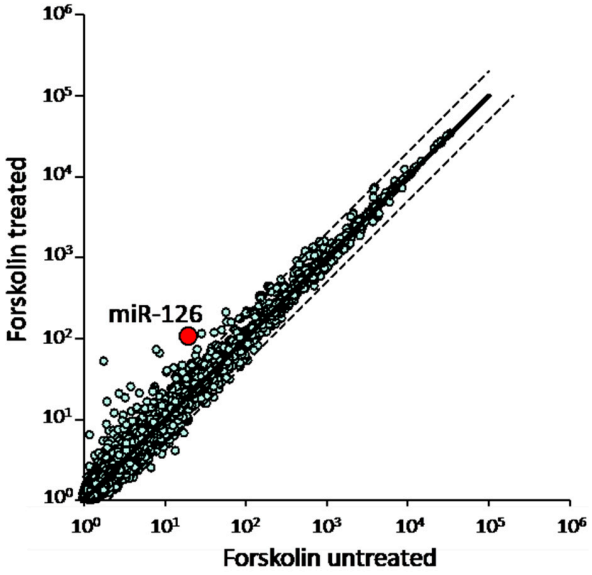
88　胎盤特異的マイクロRNAによる妊婦薬物動態の統合制御	登美　斉俊

【目的】妊婦層への薬物治療の拡大には、妊娠に伴う薬物動態変動を規定する機構の解明が重要である。そこで本研究では、胎盤および母体における薬物動態規定因子発現に及ぼす胎盤由来 miRNA の影響を解明することを目指し、研究を行った。具体的には、胎盤関門形成に及ぼす miRNA の影響に加え、胎盤由来エクソソーム中 miRNA が肝実質細胞における薬物代謝酵素活性に与える影響を明らかにすることを目的とした。胎盤特異的 miRNA を妊婦体内動態評価のマーカーとしても活用できれば、妊婦における薬物動態変動予測における問題を解決する突破口ともなる。

【方法】Forskolin あるいは miR-126 を添加したヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞における miRNA または mRNA の発現を、マイクロアレイおよび定量 PCR 法で解析した。3'非翻訳領域を介した miR-126 による遺伝子発現制御は、ルシフェラーゼアッセイで評価した。JEG-3 細胞の培養上清からエクソソームを抽出してヒト肝癌由来 HepG2 細胞の培養液中に添加し、培養後の mRNA 発現の変動を定量 PCR 法で解析した。

【結果】1. 胎盤関門形成における miRNA の役割:JEG-3 細胞に PKA アゴニストである forskolin を添加することで、合胞体化因子や関門トランスポーター発現が促進される。Forskolin 添加後の miRNA 発現変動をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、miR-126-3p の変動が大きく、発現量が約 5 倍に上昇することを見出した (図)。さらに、miR-126 を導入後の JEG-3 細胞において、胎盤関門形成時の合胞体化抑制機能を持つ可能性がある *LIN28A* や *F3* の発現が有意に減少した。一方、miR-126 は胎盤栄養膜細胞の融合を担う *syncytin-1* および *syncytin-2* に加えて、syncytin-2 の受容体である *MFSD2A* の発現を上昇させることが示された。これらは、forskolin 添加後の JEG-3 細胞における発現変動パターンと相関していた。*LIN28A* あるいは *F3* 遺伝子の 3'非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだプラスミドを遺伝子導入した JEG-3 細胞において、miR-126 導入はルシフェラーゼ活性を半分以下に低下させた。加えて、*LIN28A* 遺伝子の 3'非翻訳領域のうち、miR-126 との結合予想領域の一部に変異を加えると影響は消失した。以上の結果から、miR-126 は PKA 活性化に伴い発現量を上昇させ、*LIN28A* の 3'非翻訳領域と結合してその発現を抑制することが明らかとなり、miR-126 が胎盤関門形成に大きな役割を果たす可能性が示された。2. 母体薬物代謝に及ぼす胎盤由来 miRNA の影響:JEG-3 細胞の培養上清から抽出したエクソソーム画分は、HepG2 細胞における *CYP3A4* および *CYP1A2* の発現量を上昇させる一方、*CYP2C9* および *CYP2D6* の発現量は減少させることが示された。胎盤エクソソームは肝臓における薬物代謝酵素の発現を調節可能であることが示され、少なくとも *CYP3A4* の発現上昇は、妊娠時における薬物代謝活性変動と相関していた。

PKA アゴニストが JEG-3 細胞における miRNA 発現量に及ぼす影響



88. 胎盤特異的マイクロ RNA による妊婦薬物動態の統合制御

登美　斉俊

慶應義塾大学 薬学部 薬剤学講座

Key words：胎盤関門，妊婦薬物動態，マイクロ RNA，エクソソーム

緒　言

薬物は本来、合併症妊娠や妊娠合併症に対して高い治療効果を発揮できる。さらに、胎内診断技術の向上に伴い胎児不整脈など胎児疾患の発見が容易となり、母体に加えて胎児を標的とする薬物治療のニーズは高まっている。しかし、母体および胎児を標的とした薬物治療は抑制的である。妊婦への薬物治療を妨げている要因として、胎児・妊婦における薬物動態が不透明なため、毒性リスクを評価できる説得力の高い方法論に欠けている点である。妊娠時、母体における生理機能は、肝代謝など薬物体内動態に関わるものも含め、広範囲で変動を受けており、その程度は妊娠進行に伴って変化していくと考えられる。胎児への薬物暴露を規定する胎盤関門トランスポーター発現量についても、妊娠中期と末期では異なることが知られている。しかし、妊娠進行に伴う変化も踏まえた妊婦への薬物動態変動を適切に予測し、実際の薬物治療に生かすことは現時点で不可能である。妊婦層への薬物治療の実現には、妊娠に伴う機能変動を規定する機構の解明が重要である。

妊娠時における生理機能の変動原因を考える際、妊娠特有の臓器である胎盤に原因を求めることは合理的である。従来から、胎盤は内分泌臓器としてプロゲステロンなどのホルモンを分泌し、胎盤自身の機能を制御するほか、母体においても肝臓における CYP の発現を誘導することなどが知られてきた。一方、妊娠に伴い発現が減少する CYP 分子種の発現制御機構など、ホルモンの影響だけでは説明ができない機能変動も多く、大部分の機構は不明のままである。我々は、胎盤による機能変動を司る新たな分子としてマイクロ RNA（miRNA）群に着目した。miRNA を内包するエクソソームは母体血中に分泌され、エクソソームを介して miRNA を受け取った母体細胞における遺伝子発現に影響を与えうる［1］。

本研究では、胎盤および母体における薬物動態規定因子発現に及ぼす胎盤由来 miRNA の影響を解明することで、妊婦薬物動態を統合調節する miRNA ネットワークを明らかにすることを目指した。具体的には、胎盤関門形成に及ぼす miRNA の影響に加え、胎盤由来エクソソーム中 miRNA が肝実質細胞における薬物代謝酵素活性に与える影響を明らかにすることを目的とした。母体血中に存在する胎盤特異的 miRNA など胎児由来核酸は、胎児機能マーカーとしての活用に向けて研究が精力的に進められている。胎盤特異的 miRNA を妊婦体内動態評価のマーカーとしても活用できれば、妊婦における薬物動態変動予測における問題を解決する突破口となる。

方　法

1．胎盤関門形成における miRNA の役割

Forskolin に曝露したヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞における miRNA または mRNA の発現、および miR-126 を導入した JEG-3 細胞における mRNA の発現は、マイクロアレイおよび定量 PCR 法によって解析した。3'非翻訳領域を介した miR-126 による遺伝子発現制御は、ルシフェラーゼアッセイで評価した。*LIN28A* および *F3* 遺伝子の 3'非翻訳領域を pLightSwitch_3UTR ベクターのルシフェラーゼ遺伝子下流に挿入し、合成 miRNA と共に JEG-3 細胞に導入した後、ルシフェラーゼ遺伝子の翻訳活性を発光強度として検出した。miR-126 結合予測領域への変異導入には、QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit（Agilent Technologies）を用いた。

２．母体薬物代謝に及ぼす胎盤由来 miRNA の影響

ヒト胎盤絨毛細胞のモデルとして、ヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞を、ヒト肝実質細胞のモデルとしてヒト肝癌由来 HepG2 細胞を使用した。JEG-3 細胞の培養上清からのエクソソームの抽出には、Total Exosome Isolation/from cell culture media（Invitrogen）を用い、CD63 の発現を Western blot 法で検出することで精製を確認した。miR-517a-3p および各種薬物代謝酵素の mRNA 発現量は、HepG2 細胞の培養液中に JEG-3 細胞由来胎盤エクソソームを添加し、48 時間後に RNA を抽出し、定量 PCR 法で解析した。

結　果　と　考　察

1. 胎盤関門形成における miRNA の役割

JEG-3 細胞に PKA アゴニストである forskolin を添加することで、細胞融合（合胞体化）因子やトランスポーター発現が促進されるなど、胎盤関門の形成が促されることが報告されている［2］。我々はこの胎盤関門の成熟プロセスには miRNA も重要な役割を果たしていると考え、forskolin 添加後の miRNA 発現変動をマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、様々な miRNA の発現量の変動が示されたが、特に miR-126-3p の変動が大きく、forskolin で発現量が約 5 倍に上昇することを見出した（図 1）。そこで次に、miR-126 を導入後の JEG-3 細胞における mRNA 発現変動をマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、血管内皮前駆細胞において miR-126 による制御が報告されている *PIK3R2* の発現が減少したことに加え［3］、胎盤関門形成時の細胞融合抑制機能を持つ可能性がある *LIN28A* や *F3* の発現量が miR-126 によって有意に減少することが明らかとなった。一方、miR-126 は胎盤栄養膜細胞の融合を担う *syncytin-1* および *syncytin-2* に加えて、syncytin-2 の受容体である *MFSD2A* の発現量を上昇させることが示された。Forskolin 添加後の JEG-3 細胞における mRNA 発現変動についても、マイクロアレイで網羅的に解析した結果、*LIN28A* および *F3* の発現量は減少することが示された一方、*syncytin-1*、*syncytin-2*、および *MFSD2A* の発現量は増加することが示され、miR-126 導入後の変動と相関する結果となった。この結果から、PKA 活性化を介した胎盤関門の形成過程において、miR-126 が役割を果たしていることが強く示唆された。

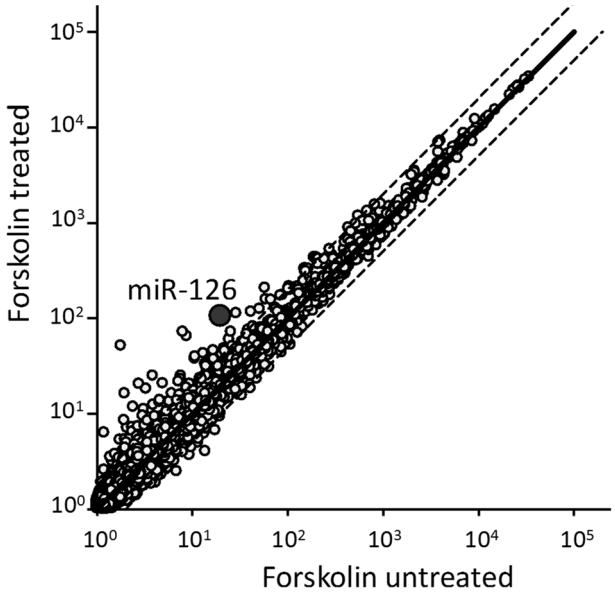


図 1. PKA アゴニストが JEG-3 細胞における miRNA 発現量に及ぼす影響
JEG-3 細胞を PKA アゴニストである forskolin 添加あるいは非添加培地で 48 時間培養後、miRNA 発現量の変動をマイクロアレイで解析した。

miR-126 による *LIN28A* および *F3* の発現抑制機構を明らかにするため、*LIN28A* あるいは *F3* 遺伝子の 3'非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだプラスミドを JEG-3 細胞に遺伝子導入し、miR-126 導入がそれぞれのルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を評価した。その結果、ルシフェラーゼ活性は miR-126 導入によって半分以下に低下することが示された（図 2）。miRWalk2.0 データベース（http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/mirwalk2）において、*LIN28A* および *F3* は miR-126-3p の標的遺伝子と予想されている。そこで、*LIN28A* 遺伝子の 3'非翻訳領域のうち、miR-126 と結合することが予想されている領域の一部に変異を加え、同様にルシフェラーゼアッセイを行ったところ、miR-126 導入がルシフェラーゼ活性に及ぼす影響は消失した。つまり、miR-126 は *LIN28A* mRNA の 3'非翻訳領域と結合することで、LIN28A タンパク発現を抑制していることが示された。

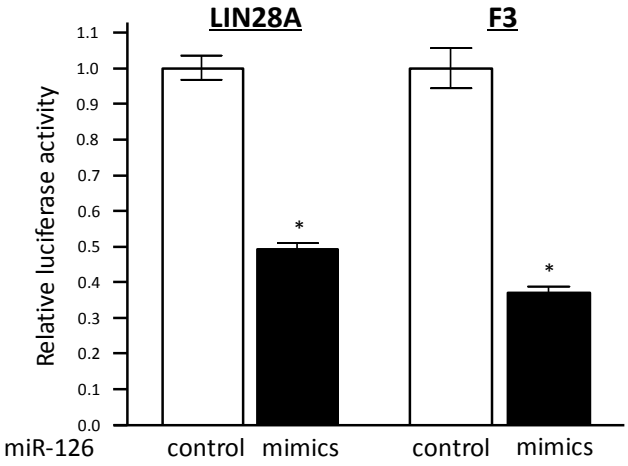


図 2. miR-126 が *LIN28A* および *F3* mRNA の 3'非翻訳領域に及ぼす影響
LIN28A あるいは *F3* 遺伝子の 3'非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだプラスミドを導入した JEG-3 細胞において、miR-126 導入がルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を解析した。*$p < 0.05$ by t-test. Mean ± S.E.M.($n = 4$).

miR-126 欠損マウスでは胎盤関門が形成される迷路部の萎縮が報告されているため［4］、miR-126 が胎盤関門の形成に関与する可能性は十分ある。本研究の結果から、胎盤関門成熟に関わる新たな機構として、miR-126 による *LIN28A* の発現抑制を介したメカニズムが提示できた。妊娠高血圧腎症の妊婦では、胎盤における miR-126 発現量が減少すること［5］、さらにラット妊娠高血圧腎症モデルにおいては miR-126 の強制発現が胎児・胎盤重量の増加をもたらすことが報告されている［6］。そのため、本研究で得られた成果は、妊婦薬物動態を制御する胎盤関門の形成機構だけでなく、妊娠期疾患の発症機構を理解する上でも重要である。

2. 母体薬物代謝に及ぼす胎盤由来 miRNA の影響

ヒト胎盤絨毛細胞のモデルとして用いた JEG-3 細胞の培養上清から抽出したエクソソーム画分において、エクソソームマーカーである CD63 の発現が検出され、エクソソームの精製が示された。さらに、JEG-3 細胞由来のエクソソームを培養上清に添加することで、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞において、胎盤特異的 miRNA である miR-517a-3p の発現が検出された。従って、エクソソームに内包された miR-517a-3p は肝臓のモデル細胞として用いた HepG2 細胞に導入されたことが示され、母体血中に分泌された胎盤エクソソームが肝細胞に導入されうることが示された。

次に胎盤由来エクソソームが肝細胞における薬物代謝に及ぼす影響を明らかにするため、JEG-3 細胞由来のエクソソームを添加した HepG2 細胞において、薬物代謝酵素 CYP の発現量を解析した。その結果、*CYP3A4* の発現量は胎盤由来エクソソームによって上昇することが示された（図 3）。この結果は、デキストロメトルファンの CYP3A4 代謝物、N-脱メチル化体が妊娠期を通して 35 %程度上昇するという報告と相関する［7］。一方、*CYP1A2* の発現量はエクソソームの添加により上昇したが、これは CYP1A2 の基質であるカフェインのクリアランスが妊娠期間中に 48～65 %低下するとの報告と相関しなかった［7］。また、*CYP2C9*、*CYP2D6* はエクソソームの添加により発現量が減少した。

これについても、CYP2C9 の基質であるフェニトインのクリアランスは妊娠第 3 三半期で 25 %上昇すること［8］、デキストロメトルファンの CYP2D6 代謝物である O-脱メチル化体は妊娠期間中に 26～48 %増加すること［7］とは相関しなかった。

以上の結果から、胎盤エクソソームは肝臓における薬物代謝酵素の発現を調節可能であることが示された。

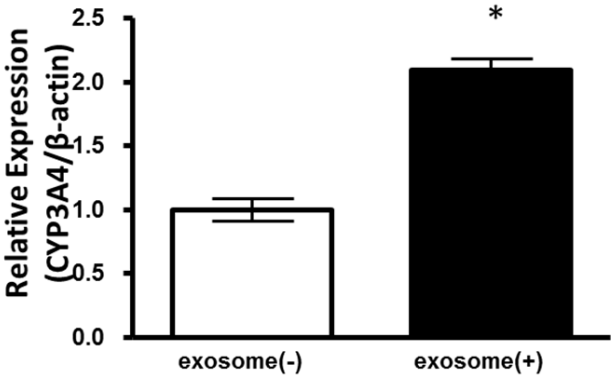


図 3. HepG2 細胞における *CYP3A4* mRNA 発現に及ぼす JEG-3 細胞由来エクソソームの影響
HepG2 細胞をエクソソーム(100 μg/mL)添加あるいは非添加培地で 48 時間培養後、*CYP3A4* mRNA 発現量をリアルタイム定量 PCR 法で解析した。*$p < 0.05$ by t-test. Mean ± S.E.M.($n = 3$).

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学薬学部薬剤学講座の西村友宏、野口幸希、直井潤平、安藤美鈴、竹村千尋、潘暁楽である。

文　献

1) Kambe S, Yoshitake H, Yuge K, Ishida Y, Ali MM, Takizawa T, Kuwata T, Ohkuchi A, Matsubara S, Suzuki M, Takeshita T, Saito S, Takizawa T. Human exosomal placenta-associated miR-517a-3p modulates the expression of PRKG1 mRNA in Jurkat cells. Biol Reprod. 2014 Nov;91(5):129. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25273530 DOI: 10.1095/biolreprod.114.121616.
2) Tomi M, Miyata Y, Noguchi S, Nishimura S, Nishimura T, Nakashima E. Role of protein kinase A in regulating steroid sulfate uptake for estrogen production in human placental choriocarcinoma cells. Placenta. 2014 Aug;35(8):658-60. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24969759 DOI: 10.1016/j.placenta.2014.06.003.
3) Yan T, Liu Y, Cui K, Hu B, Wang F, Zou L. MicroRNA-126 regulates EPCs function: implications for a role of miR-126 in preeclampsia. J Cell Biochem. 2013 Sep;114(9):2148-59. PMID: 23553946 DOI: 10.1002/jcb.24563.
4) Sharma A, Stuhlmann H. miR-126 regulates placental development and glucose metabolism. Placenta. 2016 Sep;45:100. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.06.137.
5) Hong F, Li Y, Xu Y. Decreased placental miR-126 expression and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia. J Int Med Res. 2014 Dec;42(6):1243-51. Epub 2014 Oct 23. PMID: 25341970 DOI: 10.1177/0300060514540627.
6) Yan T, Cui K, Huang X, Ding S, Zheng Y, Luo Q, Liu X, Zou L. Assessment of therapeutic efficacy of miR-126 with contrast-enhanced ultrasound in preeclampsia rats. Placenta. 2014 Jan;35(1):23-9. Epub 2013 Nov 6. PMID: 24239158 DOI: 10.1016/j.placenta.2013.10.017.
7) Tracy TS, Venkataramanan R, Glover DD, Caritis SN. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A Activity) during pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2005 Feb;192(2):633-9. PMID: 15696014 DOI: 10.1016/j.ajog.2004.08.030.

8) Tomson T, Lindbom U, Ekqvist B, Sundqvist A. Disposition of carbamazepine and phenytoin in pregnancy. Epilepsia. 1994 Jan-Feb;35(1):131-5. PMID: 8112235 DOI: 10.1111/j.1528-1157.1994.tb02922.x.