

Abstract of Doctoral Thesis

Name Lita Rakhma Yustinasari

Title: Studies of exosome dynamics in mice and canines during normal pregnancy and the roles of exosomes and microRNA in the pathogenesis of preeclampsia

(マウスとイヌの正常妊娠期におけるエクソソームの動態、および妊娠高血圧症候群モデルにおけるエクソソームとマイクロ RNA の役割)

Abstract of thesis:

(General Introduction)

Throughout pregnancy, the placenta releases various substances that affect the health of both the mother and the developing fetus. These substances play a crucial role in communication between the fetus and the mother during a normal pregnancy.

Extracellular vesicles (EVs) are classified based on how they are produced, their physical characteristics, and their composition. There are three main types: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. Exosomes are the smallest type of EVs, ranging from 30-150 nanometers, and are released by all types of cells. They are formed through a process involving endosomes and contain nucleic acids, proteins, lipids, cytokines, and metabolites. Exosomes can transfer RNA to target cells, where messenger RNA can be translated into protein, and microRNA (miRNA) can alter the gene expression of the recipient cells. Certain types of miRNA are abundant in exosomes and are specific to the cells they come from. The process of sorting miRNAs into exosomes is regulated but not yet fully understood. Exosomes play various roles in immune responses, viral pathogenesis, pregnancy, nervous system diseases, and cancer progression. The amount, formation, content, and functions of exosomes vary depending on the stage of pregnancy. Exosomes derived from the placenta can indicate the physiological state of the fetoplacental functions and the progression of a normal pregnancy. In humans, syncytiotrophoblasts are the primary source of exosomes, but this has not been studied in other animals. Increased exosome levels have been observed in cases of preeclampsia (PE). Certain miRNAs are suggested to contribute to the development of PE, indicating that the contents of placenta-derived exosomes differ based on the stage of pregnancy.

This study examined the specific substances released by the normal canine placenta. It also demonstrated the exosome dynamics and miRNAs in mice. Additionally, a mouse model of preeclampsia was created to investigate the roles of exosomes and their miRNAs in the pathomechanism.

(Chapter 1)

Humoral factors released from the placenta are known to influence the pregnancy progression, but the involvement of the canine placenta is often unidentified. This study investigated specific genes in

(Appended form No. 3)

canine placentas and analyzed their translated proteins in serum. Furthermore, the presence of cell-free RNA embedding in exosomes was also confirmed. These findings highlight relaxin 2, lipocalin 2, and tissue factor pathway inhibitor 2 as high-expressed and placenta-specific genes. These three factors were detected as soluble proteins in pregnant serums, with a noticeable increase observed only in RLN2 from non-pregnancy to day 41 of pregnancy. While the concentration of exosomes during canine pregnancy did not significantly increase, the successful detection of cell-free RNA related to RLN2 suggests the potential for specific marker genes. This indicates that factors contained in exosomes may still be present and reflect fetal development and placental formation in pregnant canine serum.

(Chapter 2)

Exosomes are found in the blood of pregnant mice and are considered to play a role in pregnancy physiology. It is expected that the exosomes present during pregnancy are derived from the mouse placenta, but the specific cells that produce these exosomes and their localization are not well understood. We studied the appearance and dynamics of exosomes in the serum and placentas of pregnant mice. Variations of miRNA were also examined. Nanoparticle-tracking assay (NTA) revealed a significant increase in the levels of exosomes, up to 97.5% at Gd 18.5. Western blotting showed positive reactivity to the specific markers and clarified that the detection using anti-CD63 was most consistent with the exosome's appearance detected by NTA. Immunohistochemistry using anti-CD63 antibody showed positive reactions in the mouse placentas at syncytiotrophoblasts and endothelial cells of fetal capillaries. Significantly higher amounts of miR-10b-3p, miR-25b-3p, and miR-143-3p were included in the exosomes of Gd 18.5.

(Chapter 3)

Exosomes are found in higher concentrations in the serum of pregnancies with preeclampsia compared to healthy pregnancies. Additionally, exosomal miRNA has been discovered to play a role in placental angiogenesis. In this study, a mouse model of preeclampsia induced by L-NG-Nitro-arginine methyl ester (L-NAME) was established, and the appearance of exosomes was investigated. As a result, protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) was elevated in both the placenta and serum-derived EVs of the PE-mouse model. Furthermore, the total concentration of exosomes in the serum was higher in the PE-mouse model, and there was downregulation of miR-16-5p and upregulation of miR-25b-3p. The low expression of miR-16-5p may lead to inflammation and increased VEGF levels, potentially contributing to the development of PE.

(Conclusion)

The exosomes produced in the canine and mouse placentas can transfer the specific factors to maternal or fetal bloodstreams. Especially in mice, exosome dynamics in serum and placenta were specific during gestation. It was suggested that exosomes and miRNA have a crucial physiological effect in normal gestation as well as in the pathogenesis of preeclampsia, making them useful biomarkers to reflect pregnancy status.

(About 800 words in English)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Lita Rakhma Yustinasari
審査委員	主 査：山口大学 教授 日下部 健
	副 査：山口大学 教授 加納 聖
	副 査：鹿児島大学 教授 藤田 秋一
	副 査：山口大学 教授 森本 将弘
	副 査：山口大学 准教授 渋谷 周作
題 目	Studies of exosome dynamics in mice and canines during normal pregnancy and the roles of exosomes and microRNA in the pathogenesis of preeclampsia (マウスとイヌの正常妊娠期におけるエクソソームの動態、および妊娠高血圧症候群モデルにおけるエクソソームとマイクロ RNA の役割)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>胎盤は生理活性因子を分泌し、排卵抑制、黄体形成、子宮筋層の弛緩、免疫寛容などの効果を発揮して妊娠の成立・維持に寄与する。獣医学分野では、胎盤由来因子の同定は妊娠診断や妊娠生理のモニタリングに有用であるが、ウシ以外の動物では理解が進んでいない。</p> <p>エクソソームは直径 30~150nm の細胞外小胞で、様々な種類の細胞から体液中に放出される。内部に RNA、DNA、タンパク質を含み、エクソソームの受容細胞へ内容物を伝達する。マイクロ RNA が伝達された場合は、受容細胞の遺伝子発現に干渉する。エクソソームの生理学的役割は、癌細胞の浸潤と転移、免疫応答のメカニズムにおいて研究が進んでいる。</p> <p>ヒトでは妊娠期に血中エクソソームが増加し、胎盤の合胞体性栄養膜細胞がエクソソームの主な供給源であることが分かっているが、他の動物では明らかではない。エクソソームに含まれる因子は、妊娠生理マーカーとしての有用性が期待できる。また、妊娠高血圧症候群の患者では血中エクソソームが増加し、エクソソーム含有因子は病態機序に関与している可能性がある。</p> <p>第 1 章では、イヌの正常胎盤についてトランスクリプトーム解析を行い、特異的な発現遺伝子について調べた。さらに 3 種の犬種の胎盤、および非妊娠期の子宮での発現解析を加え、イヌ胎盤において relaxin 2、lipocalin 2、tissue factor pathway inhibitor 2 が強く発現していることを明らかにした。これらの三因子は妊娠血清中に可溶性タンパクとして検出され、特に relaxin 2 は妊娠期に有意に増加した。一方で、非妊娠期のイヌの血清中ではエクソソームが存在したが、妊娠に伴った増加は認められなかった。血清から RNA を回収し、リアルタイム PCR 解析によって relaxin 2 を検出したが、非妊娠期と妊娠期の間に量的な有意差は認</p>	

められなかった。以上の解析から、イヌ胎盤に由来する特異的な分泌因子を同定し、妊娠生理を反映するバイオマーカーとしての有用性を示した。

第 2 章では、マウスの正常妊娠におけるエクソソームの動態について解析を行った。ナノ粒子トラッキングアッセイ (NTA) により計測すると、マウス血清中のエクソソームは非妊娠期から妊娠 10.5 日の間で有意に増加した (6.33×10^{10} から 9.10×10^{10} 個/mL)。さらに妊娠 18.5 日では 8.56×10^{11} 個/mL に達した。ウェスタンブロット解析では、特異的マーカーに対する陽性反応性が検出され、特に抗 CD63 抗体による定量解析の変動パターンが、NTA で検出されたエクソソームの出現頻度と類似性を示した。免疫染色では、マウス胎盤の栄養膜細胞と胎子毛細血管において CD63 に対する陽性反応が認められた。妊娠 18.5 日の血清エクソソームには miR-10b-3p、miR-25b-3p、miR-143-3p が含まれていた。以上より、マウス胎盤ではエクソソームとマイクロ RNA が存在し、妊娠の維持や分娩に寄与する可能性が示唆された。

第 3 章では、妊娠高血圧症候群 (preeclampsia、以下 PE) のモデルマウスを作成し、病態発症におけるエクソソームとマイクロ RNA の変動について検証した。N-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME) を妊娠 7.5 日から 17.5 日まで継続的に皮下投与すると、血圧は 150/116 mmHg、尿蛋白は 200 ng/dL に増加した (対照群では 115/82 mmHg、25 ng/dL)。L-NAME 投与マウスの子宮内では 22% の胎子が死亡または吸収され (対照群では 0%)、PE モデルマウスを樹立できた。PE モデルの胎盤では栄養膜細胞が減少し、母体の血液洞が拡張していた。胎盤の抽出タンパクを調べると、PE モデルの胎盤では血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生量が対照群の三倍以上に増加していた。血清中のエクソソームは対照群では 9.46×10^8 個/mL、PE モデルでは 3.48×10^9 個/mL であった。エクソソームから RNA を抽出してマイクロ RNA を調べると、PE モデルにおいて miR-16-5p の減少と miR-25b-3p の増加が確認された。特に miR-16-5p は VEGF を標的遺伝子として作用することが分かっており、PE の発症要因としての重要性が示唆された。

これらの研究成果は生殖生理学、病理学的研究に有用であり、獣医学領域において重要な研究基盤となると評価できる。以上により、本論文は博士 (獣医学) の水準を満たしていると判断した。