

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19790763  
 研究課題名 (和文) 胎児栄養膜細胞の分化・浸潤における微小管制御因子スタスミンの機能解析  
 研究課題名 (英文) Physiological significance of stathmin in human trophoblast migration and differentiation  
 研究代表者  
 吉江 幹浩 (YOSHIE MIKIHIRO)  
 東京薬科大学・薬学部・助教  
 研究者番号：50434014

## 研究成果の概要：

胎盤形成において胎児由来栄養膜細胞の分化と子宮内膜への浸潤は、必須の過程である。栄養膜細胞における微小管制御因子スタスミンの発現をノックダウンすると、分化刺激による絨毛性ゴナドトロピン (hCG) 産生が減少し、また、形態学的分化である栄養膜細胞の融合 (シンシチウム化) も抑制された。これら細胞にスタスミンを強制発現させると hCG 産生及びシンシチウム化が回復した。さらに、スタスミン発現の抑制により、栄養膜細胞の増殖・浸潤能が低下したことから、胎盤形成に不可欠な栄養膜細胞の増殖、浸潤及び分化をスタスミンが調節することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：栄養膜細胞、スタスミン、胎盤

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠時に形成される胎盤は、胎児-母体間での栄養代謝やガス交換だけでなく性ステロイドや成長因子を産生・分泌する特異な高次機能組織である。胎児胎盤である栄養膜細胞 (トロホプラスト) は、機能的分化により妊娠維持や胎児発育に不可欠な性ステロイドや絨毛性ゴナドトロピン (hCG)、ヒト胎盤性ラクタゲンを分泌するシンシチオトロホプラスト (Syncytiot) や絨毛先端部か

ら子宮内膜へと浸潤する絨毛外栄養膜細胞 (EVT) へと変化する。Syncytiotは、単核の未分化な栄養膜細胞 (サイトトロホプラスト: CytoT) が分化・融合 (シンシチウム化) した多核の細胞である。EVTは、子宮内膜の脱落膜組織中の血管内皮に浸潤し、胎児-母体間の物質交換を可能にする。胎盤形成過程での栄養膜細胞の分化機構を解析することは、その生理的意義に留まらず、栄養膜細胞の浸潤能異常による妊娠高血圧症候群

や絨毛癌などの病態を理解する上で重要である。妊娠初期(7週目)のヒト胎児胎盤組織において未分化な CytoT 並びに EVT に微小管調節因子として知られるスタスミンが高発現していること、その一方で、CytoT が分化した SyncytioT ではその発現がみられないといった栄養膜細胞の性質によるスタスミン発現レベルの差を確認している。これらの知見から、栄養膜細胞の分化・浸潤過程においてスタスミン発現が、厳密に調節されていることが伺えるが、栄養膜細胞におけるスタスミンの発現に関する報告はなく、その役割は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、胎盤形成に不可欠である栄養膜細胞の機能におけるスタスミンの発現意義を総合的に評価するが、特に栄養膜細胞の分化・融合(シンシチウム化と子宮内膜への浸潤)におけるスタスミンの役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト栄養膜細胞の培養

ヒト胎盤組織は、米山産婦人科病院(東京都、八王子市)において、十分な説明の後、同意を得た上で、妊娠6週~10週までの人工中絶の患者15名から採取を行った。ヒト組織の使用にあたり、東京薬科大学薬学部「ヒト組織等を研究活用するための倫理委員会」の承認(承認番号07-02)を得て本実験を行った。ヒト栄養膜細胞は、0.25%トリプシン及び0.25%コラゲナーゼ液にて消化後、パーコール密度勾配遠心法にて単離した。

ヒト絨毛癌細胞株BeWo細胞、JEG-3細胞は、The American type Culture Collectionより購入し、ヒトEVT細胞株HTR-8/SVneo細胞は、Queen's大学、Graham教授より供与された。単離栄養膜細胞及び絨毛癌細胞株の培養には、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むHam's 12メディウムを用い、HTR-8/SVneo細胞の培養にはRPMI1640メディウムを用いた。

### (2) 栄養膜細胞の分化・融合におけるスタスミンの役割

#### ① 栄養膜細胞の分化・融合に対するスタスミン発現抑制の効果

BeWo細胞及び単離栄養膜細胞(2.5 x10<sup>4</sup>個/well)を24穴プレートに播種後、コントロールsiRNAまたはスタスミンsiRNA(各15 pmol/well)を、トランスフェクション試薬(Lipofectamin<sup>TM</sup> RNAiMAX, Invitrogen)にて細胞に導入した。各siRNAを処置してから48時間培養後に、分化誘導刺激として1 mMジブチルcAMP(db-cAMP)を含む1%FBS/Ham's F-12メディウムを処置し、さらに48時間培養した。なお、24時間ごとに1 mMのdb-cAMPを含

むメディウムを交換し、48時間培養後に培養メディウムと細胞を回収し、hCGβ、シンシチン、スタスミンの発現と細胞融合の割合を調べた。

細胞融合の評価方法として、細胞-細胞間の境界を抗デスモソーマル蛋白質抗体にて、核をDAPIにて染色し、蛍光顕微鏡にてランダムに撮影した5視野における多核細胞をカウントし、全細胞数に対する融合化細胞数の割合を計算した。

#### ② 栄養膜細胞の分化・融合に対するスタスミン強制発現の影響

任意にスタスミンの発現を増加させることができるBeWo細胞を作成した。Tet-On gene expression system(Clontech)を用いてドキシサイクリン(Dox)処置により変異型Tetリプレッサー蛋白質とVP16活性化ドメインの融合蛋白質であるリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA)を発現するpTet-On BeWo細胞を作成した。rtTAは、Dox存在下でテトラサイクリン応答配列(TRE)に結合し、その下流遺伝子の発現を誘導する。TREの下流にスタスミンのオープンリーディングフレームを連結させたスタスミンの発現ベクター(pTRE-stathmin)を作成し、本ベクターをpTet-On BeWo細胞に導入することにより、Dox処置に応答してスタスミン発現を上昇させることを可能にした。

上記のpTet-On BeWo細胞(2.5 x10<sup>4</sup>個/well)を24穴プレートに播種後、上記と同様にコントロールsiRNA及びスタスミンsiRNAを処置した。翌日、600 ngのpTRE-stathminベクターまたは空ベクター(pTRE-tight)をトランスフェクションして24時間培養した。Dox(2 μg/ml)のみを1日間処置した後、db-cAMP(1 mM)とDox(2 μg/ml)を2日間処置し、その後のhCGβ産生とシンシチン発現、細胞融合を評価した。

### (3) 栄養膜細胞の子宮内膜への浸潤過程におけるスタスミンの役割

#### ① 脱落膜細胞を用いた栄養膜細胞浸潤モデルの作製

CytoTの一部は、EVTとなり子宮内膜の脱落膜組織に浸潤する。通常、細胞浸潤能はボイデンチャンバーにマトリゲルなどの細胞外マトリックスでコートしたメンブランを浸潤障壁として、そのメンブラン孔を通過する細胞数をカウントすることにより評価する。このメンブラン上にマトリゲルとともに脱落膜細胞へと分化させた子宮内膜間質細胞を播くことにより、より生体内環境下に近い栄養膜細胞の浸潤モデルを実現できると考え、この浸潤アッセイ系の確立を試みた。

#### ② 栄養膜細胞の増殖・浸潤に対するスタスミン発現抑制の効果

BeWo 細胞、JEG-3 細胞及び単離した栄養膜細胞、HTR-8/SVneo 細胞にスタスミン siRNA を処置し、24 時間処置したものを実験に用いた。浸潤アッセイは 24 穴プレートにフィブロネクチンでコートしたケモタキセル (ポアサイズ: 8  $\mu\text{m}$ , Kurabo) をセットした。その上にスタスミン siRNA を処置した BeWo 細胞、JEG-3 細胞、単離栄養膜細胞 ( $2.5 \times 10^4$  個) を播種し、ケモタキセルの上層には 2% FBS を含むメディウムを加え、下層には 10% FBS を含むメディウムを加えて 72 時間培養した。また HTR-8/SVneo 細胞は  $1 \times 10^4$  個を播種し、48 時間培養した。培養終了後、ケモタキセルを 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、メンブランの上層の細胞を剥離し、メンブランの下層に移動した細胞を DAPI にて核染色した。このメンブランをプレパレート上に固定し、蛍光顕微鏡にて浸潤細胞の数 (ランダムに選んだ 5 視野の細胞数) をカウントし、コントロール siRNA 処置群と比較した。

栄養膜細胞は、浸潤過程においてマトリックスメタロプロテアーゼを発現することが知られている。そこで、培養メディウム中のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2、-9 のゲラチナーゼ活性はゲラチンゼイモグラフィ法を用いて解析した。同量の蛋白質を含む培養メディウムを非還元条件下にてゲラチン (0.25%) 含有ポリアクリルアミドにて電気泳動した後、酵素活性化処理を行い、クマシーブリリアントブルーにて染色した。染色後、MMP-2、-9 の活性により生じるバンドを確認するまで 10% 酢酸水溶液にて洗浄した。

栄養膜細胞の増殖アッセイは、Cell Counting Kit (Dojindo) を用いて行った。BeWo 細胞、JEG-3 細胞 (各  $5 \times 10^3$  個 / well)、HTR-8/SVneo 細胞 ( $5 \times 10^3$  個 / well) を 48 穴プレートに播種後、24 時間培養し、上記コントロール siRNA とスタスミン siRNA (15 pmol / well) を処置し、24 時間、48 時間、72 時間培養した。各培養終了後、WST-1 試薬を培養メディウムに添加し 37  $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間培養し、培養メディウムを 96 穴プレートに移し、マイクロプレートリーダーにて吸光度 450 nm (参照波長 650 nm) を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト栄養膜細胞の分化・融合におけるスタスミンの役割

SyncytioT は、単核の CytoT が分化・融合 (シンシチウム化) した多核の栄養膜細胞であり、妊娠維持に不可欠な絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を分泌する。絨毛癌細胞 (BeWo 細胞) や単離した栄養膜細胞への cAMP アナログ (ジブチリル cAMP) 処置により SyncytioT への分化を *in vitro* で再現することが可能である。

そこで、この分化モデルを用いて SyncytioT への分化・融合過程におけるスタスミンの役割を hCG  $\beta$  の産生と細胞融合を指標として解析した。

##### ① 栄養膜細胞の分化・融合に対するスタスミン発現抑制の効果

BeWo 細胞と単離栄養膜細胞の SyncytioT への分化におけるスタスミンの役割を調べるため、スタスミン発現を抑制した各細胞に db-cAMP を処置し、48 時間後の hCG  $\beta$  とシンシチンの発現及びメディウム中への hCG  $\beta$  分泌量を解析した (図 1)。BeWo 細胞において siRNA 処置によりスタスミン発現をノックダウンすると (siRNA: +)、コントロール siRNA 処置細胞 (siRNA: -) と比較して、db-cAMP で上昇する hCG  $\beta$  とシンシチン mRNA 発現量は抑制された (図 1A)。また、メディウム中の hCG  $\beta$  分泌量もスタスミン siRNA 処置により顕著に抑制された (図 1C)。また、単離栄養膜細胞においてもスタスミン発現を抑制することにより、db-cAMP 誘導性の hCG  $\beta$  発現及び分泌量は抑制された (図 1B, D)。さらに、スタスミン発現抑制により、分化刺激により誘導される細胞融合が顕著に減少した (図 1E, F)。

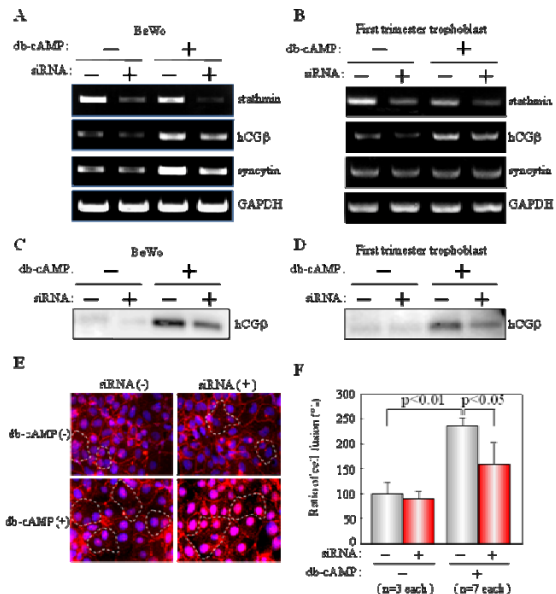


図 1. 栄養膜細胞の分化・融合に対するスタスミン発現抑制の効果

##### ② 栄養膜細胞の分化・融合に対するスタスミン強制発現の効果

テトラサイクリン誘導体 (ドキシサイクリン: Dox) に応答してスタスミンの発現が誘導される BeWo 細胞を作製し、分化・融合に対するスタスミン強制発現の効果について検討した。スタスミン siRNA 処置により低下した hCG  $\beta$  とシンシチン mRNA の発現が、Dox 処置によるスタスミンの発現誘導により回復した (図 2A, B)。また、培養メディウム中への hCG  $\beta$  分泌もスタスミンの強制発現により

増加した (図 2C)。さらに、スタスミン発現抑制により減少した細胞融合もスタスミンの強制発現により回復した (図 2D, E)。

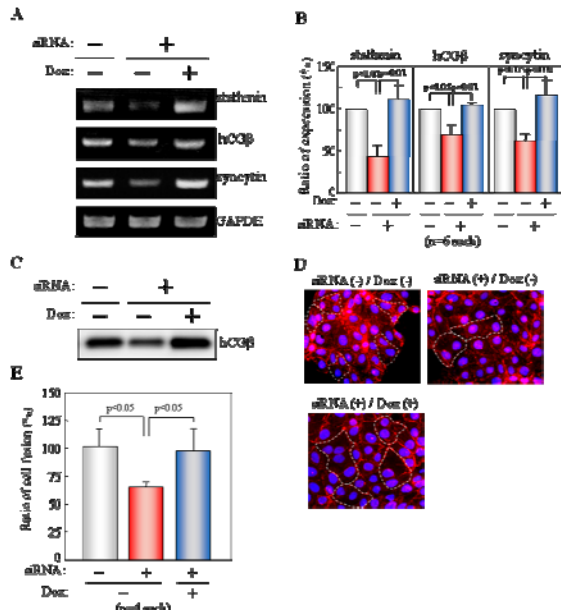


図 2. 栄養膜細胞の分化・融合に対するスタスミン強制発現の効果

## (2) 栄養膜細胞の浸潤におけるスタスミンの役割

妊娠初期の栄養膜細胞は、子宮内膜へ遊走・浸潤する。すでに、ヒト胎盤組織の免疫組織染色により浸潤性の栄養膜細胞 (EVT) にスタスミンが発現していることを確認している。そこで、栄養膜細胞の浸潤とスタスミン発現との関係について調べた。

### ① 脱落膜細胞を用いた栄養膜細胞浸潤モデルの作製

栄養膜細胞の浸潤を評価するためのモデルとして、トランスウェルのフィルター上に脱落膜細胞を播種した系を作製した。本モデルは、より生体内環境に近い栄養膜細胞の浸潤を再現できると考えられる。なお、本実験進行中に同様のモデルが、他の研究グループからも発表された (Spessotto *et al.*, 2006 J Cell Sci. 119: 4574)。

### ② 栄養膜細胞の増殖・浸潤におけるスタスミンの役割

絨毛癌細胞株 (BeWo, JEG-3)、絨毛外栄養膜細胞株 (HTR-8/SVneo)、妊娠初期の絨毛組織より単離した栄養膜細胞 (First trimester trophoblast) におけるスタスミン発現を siRNA にてノックダウンし、浸潤への影響について検討したところ、コントロール siRNA を処置した対照群 (siRNA:-) と比較して、スタスミン発現の抑制 (siRNA:+) によりこれらを用いた全ての細胞の浸潤が抑制された (図 3 A-D)。栄養膜細胞では、ゲラチナーゼ活性を

有するメタロマトリックスプロテナーゼ (MMP) -2、-9 が子宮内膜への浸潤に関与していることを示唆する報告があるため、スタスミン発現抑制時の培養メディウム中の MMP-2 及び MMP-9 の活性をゲラチンゼイモグラフィ法により検討したが、スタスミンのノックダウンは、これら細胞の MMP-2、-9 活性に対して影響しなかった (図 3 E, F)。また、BeWo, JEG-3, HTR-8/SVneo 細胞の増殖に対するスタスミンノックダウンの影響について検討したところ、上記の浸潤アッセイと比較するとその作用は弱いものの、有意な細胞増殖の抑制効果がみられた。

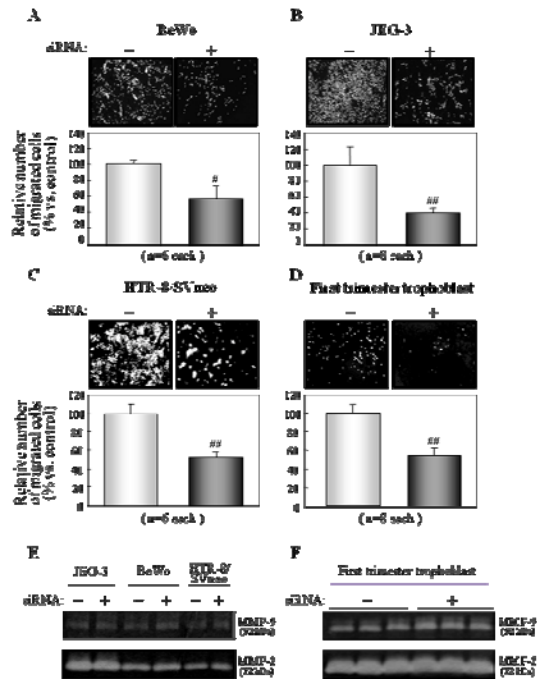


図 3. 栄養膜細胞の浸潤に対するスタスミン発現抑制の効果

以上より、ヒト栄養膜細胞に発現するスタスミンは、胎盤形成に不可欠な栄養膜細胞の浸潤、増殖および、シンシチオトロホプラストへの分化に関与する因子であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Yoshie M, Miyajima E, Kyo S, Tamura K. Stathmin, a microtubule regulatory protein is associated with hypoxia-inducible factor-1 levels in human endometrial and endothelial cells. *Endocrinology* 150:2413-2418 2009 査読有

- (2) Yoshie M, Kashima H, Bessho T, Takeichi M, Isaka K, Tamura K. Expression of stathmin, a microtubule regulatory protein, is associated with the migration and differentiation of cultured early trophoblasts. *Human Reproduction* 12:2766-2774 2008 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 吉江幹造, 草間和哉, 沓掛真彦, 田村和広  
ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における cAMP 仲介因子 Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) の役割 日本薬学会 第 129 年会 2009 年 3 月 28 日 京都
- (2) 金山けい, 吉江幹造, 井坂恵一, 沓掛真彦, 田村和広 ヒト胎盤形成における Exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) を介した cAMP シグナリング第 82 回日本薬理学会年会 2009 年 3 月 17 日 横浜
- (3) 宮島恵理, 吉江幹造, 沓掛真彦, 田村和広 ヒト臍帯静脈血管内皮細胞におけるスタスミンによる HIF-1 $\cdot$  の調節 第 62 回 西東京内分泌代謝研究会 2008 年 11 月 17 日 東京
- (4) 吉江幹造, 金山けい, 沓掛真彦, 武市信, 樋熊千夏, 西洋孝, 井坂恵一, 田村和広 ヒト絨毛癌細胞のシンシチウム化における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) の役割 第 16 回 日本胎盤学会学術集会 2008 年 11 月 14 日 浜松
- (5) 金山けい, 吉江幹造, 加島英明, 田村和広 ヒト栄養膜細胞のホルモン産生における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) の役割 第 61 回 西東京内分泌代謝研究会 2008 年 6 月 9 日 東京
- (6) 宮島恵理, 吉江幹造, 田村和広, 向後博司 ヒト臍帯静脈血管内皮細胞における低酸素培養誘導性 HIF-1 $\cdot$  及び VEGF 発現へのスタスミンの関与 日本薬学会 第 128 年会 2008 年 3 月 27 日 横浜
- (7) 吉江幹造, 田村和広, 宮島恵理, 原孝彦, 京哲, 向後博司 ヒト子宮内膜細胞において stathmin は PI3K/Akt シグナル経路を介して低酸素刺激による VEGF と HIF-1 $\cdot$  の発現に関与する 第 81 回 日本薬理学会年会 2008 年 3 月 18 日 横浜
- (8) 加島英明, 田村和広, 吉江幹造, 別所俊夫, 武市信, 向後博司 ヒト栄養膜細胞における stathmin の役割 第 81 回 日本薬理学会年会 2008 年 3 月 17 日 横浜
- (9) 加島英明, 吉江幹造, 田村和広, 別所俊夫, 武市信, 向後博司 微小管調節因子・

スタスミンは絨毛栄養膜細胞の分化と浸潤に寄与する 第 12 回 日本生殖内分泌学会 2007 年 10 月 19 日 東京

- (10) 吉江幹造, 加島英明, 田村和広, 向後博司 Involvement of a Microtubule Regulatory Protein Stathmin in Trophoblast Proliferation, Migration and Differentiation 13<sup>th</sup> International Federation of Placenta Associations Meeting 2007 年 8 月 18 日 キングストン、カナダ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉江 幹造 (YOSHIE MIKIHIRO)  
東京薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：50434014

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：