

平成30年 5月28日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20156

研究課題名(和文)胎盤絨毛細胞における分子シャペロン - カルレティキュリンの産生とその細胞機能の解明

研究課題名(英文)The mechanism of synthesis of calreticulin, a molecular chaperone, and the cellular function in trophoblasts

研究代表者

山本 円 (Yamamoto, Madoka)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70596973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：4つの絨毛細胞株、および同意を取得した正常妊婦の胎盤組織においてカルレティキュリン(CRT)の発現を認めた。ヒト絨毛外栄養膜細胞(EVT)株HTR8/SVneo細胞において、CRT発現抑制は細胞浸潤能およびフィブロネクチンへの接着能を低下させ、細胞接着後のAktのリン酸化を抑制した。またCRT発現抑制によりインテグリン(Intg) 1のN-グリカンが変化しており、複数の主要な糖転移酵素の発現レベルが変化していた。CRTは糖鎖を認識する分子シャペロンであり、Intg 1への糖鎖修飾の調節を介して、EVTの基質接着能および浸潤能に促進的に働くことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The expression of Calreticulin (CRT) was detected in four trophoblastic cell lines and human placenta of normal pregnant women which was obtained with informed consent. In the human extravillous trophoblast (EVT) cell line HTR8/SVneo cells, CRT knockdown suppressed the invasion ability and the adhesion to fibronectin, and suppressed the phosphorylation level of Akt on attachment to fibronectin. CRT knockdown modulated N-glycosylation of integrin (Intg) 1, and changed the expression level of several glycosyltransferases in the cells. These results showed that CRT, which interacts with the glycosylated protein, promotes cell adhesion and invasion ability of EVT by regulating N-glycosylation of Intg 1.

研究分野：産婦人科学

キーワード：胎盤 絨毛外栄養膜細胞 カルレティキュリン 分子シャペロン 妊娠高血圧症候群

1. 研究開始当初の背景

胎盤は母体と胎児を結び、児の生命を維持する非常に重要な臓器である。妊娠初期における胎盤形成の過程において絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) の浸潤が非常に重要な役割を果たす。EVT は母体の脱落膜内から子宮筋層の浅層に浸潤し、子宮壁の血管構造が EVT により置換されることにより絨毛間腔へと流入する母体血液量が確保される。妊娠初期の EVT の浸潤が不十分であると胎盤形成不全となり妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの疾患をきたすと言われている。EVT の浸潤機構はまだ不明な部分も多く、その解明は胎盤形成の生理的意義のみならず妊娠高血圧腎症などの疾患の病態解明にもつながる可能性がある。近年、妊娠とともに血中濃度が増加し、妊娠高血圧腎症に関与する分子として、小胞体の分子シャペロンであるカルレティキュリン (CRT) が報告された。

小胞体は分泌・膜タンパク質の生合成の場であり、分子シャペロンは生合成途中のタンパク質の折りたたみを手助けする。CRT は小胞体における Ca²⁺ イオンの貯蔵と糖タンパク質のフォールディング、品質管理に関わる。CRT は細胞接着やアポトーシスなど、様々な細胞の機能にも関わることが報告されているが、胎盤におけるその機能や生理的意義については未だ明らかではない。そこで、胎盤形成過程における CRT の細胞機能を明らかにする。これにより胎盤形成不全を基礎とする妊娠高血圧症候群の病態が解明されることが期待される。

2. 研究の目的

胎盤形成における絨毛外栄養膜細胞浸潤に着目し、EVT における CRT の役割について検討する。

3. 研究の方法

- (1) 3 つの絨毛癌細胞株 BeWo、Jar、JEG3、ヒト EVT 細胞株 HTR8/SVneo、およびインフォームドコンセントの下に得られたヒト胎盤組織において、CRT の発現を Western blotting もしくは免疫組織化学染色を用いて検討した。
- (2) HTR8/SVneo に CRT-shRNA 発現ベクターを遺伝子導入し、CRT 低発現安定細胞株を作製した。
- (3) CRT の発現抑制による細胞増殖能、マトリゲル浸潤能、および細胞外基質への接着能の変化について比較検討した。
- (4) CRT の発現抑制によるインテグリン (Itg) の発現とその変化について検討した。
- (5) CRT の発現抑制による Itg の糖鎖修飾の変化、および糖転移酵素の発現の変化について検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト絨毛細胞株、ヒト胎盤組織における CRT の発現の検討: Western blotting では絨毛細胞株および正常ヒト胎盤組織において CRT が高発現していた。特に妊娠初期では高いレベルで発現していた (図 1A)。また免疫組織化学染色において脱落膜内の EVT に CRT の局在を認めた (図 1B)。

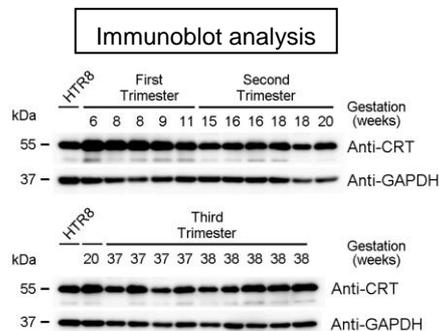


図 1A ヒト正常妊娠胎盤における CRT の発現

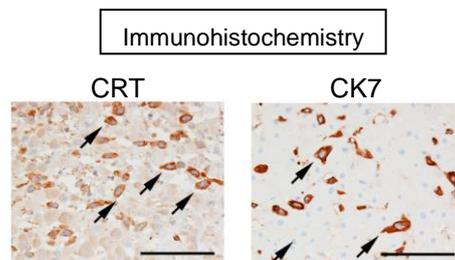


図 1B ヒト正常妊娠胎盤における CRT の発現

(2) CRT 発現抑制株の作製: CRT-shRNA 発現ベクターの遺伝子導入により CRT 発現抑制安定細胞株を作製した。mRNA とタンパクレベルで CRT の発現が抑制されていることを確認した。

(3) CRT 発現抑制による細胞機能の変化についての検討: HTR8/SVneo において CRT 低発現細胞 (CRT-shRNA2) では 24 時間後のマトリゲル浸潤能が 11% と著明に低下していた (図 2A)。またフィブロネクチン (FN) への接着能が低下していた。(図 2B) CRT 低発現細胞では FN 接着後の Akt のリン酸化が抑制されていた。

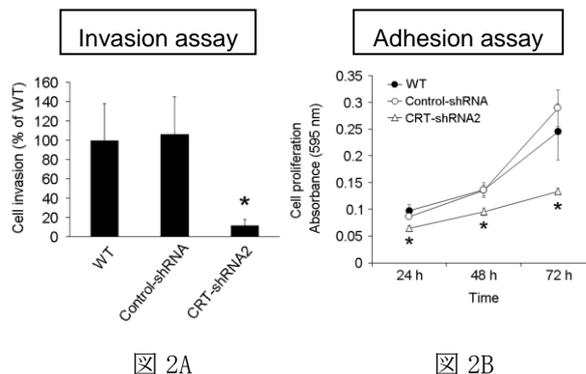


図 2A

図 2B

(4) CRT 発現抑制による Itg の発現と局在の変化: Itg は細胞接着分子の1つで α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットからなるヘテロダイマーである。このダイマー形成がその細胞機能に関わるとされており、EVT の分化過程においてもインテグリン発現サブタイプの変化とともに浸潤能を獲得することが知られている。FN の受容体である Itg $\alpha 5 \beta 1$ に着目し Itg の発現を解析した。HTR8/SVneo において、CRT 発現抑制による Itg $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ の発現量に差は認めなかったが、CRT 低発現細胞では Itg $\beta 1$ が高分子化しており、PNGase (Peptide-N-Glycosidase) 処理により N-グリカン を脱グリコシル化すると同分子量になった (図 3)。免疫蛍光染色では、CRT 低発現細胞において Itg $\beta 1$ は小胞体内に少なく細胞膜への偏在を認め、局在が異なっていた。

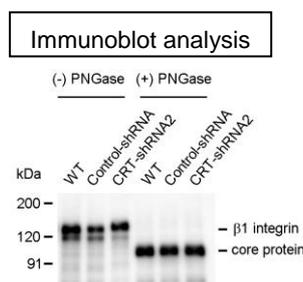


図 3 インテグリン $\beta 1$ の発現

(5) CRT 発現抑制による Itg $\beta 1$ の糖鎖修飾の変化、および糖転移酵素の発現の検討: CRT 低発現細胞において Itg $\beta 1$ が糖鎖修飾を受けている可能性が考えられ、糖鎖の評価を行った。HTR8/SVneo において、抗 Itg $\beta 1$ 抗体で免疫沈降した後の Lectin blotting により、CRT 低発現細胞では Itg $\beta 1$ に結合する DSA (ガラクトース結合性) は多く、ConA (マンノース結合性)、SSA (シアル酸結合性)、UEA1 (フコース結合性) は少なくなっていた (図 4)。

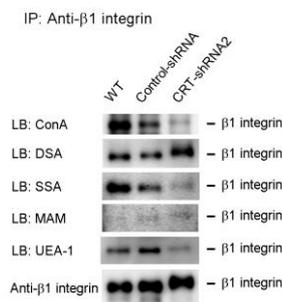


図 4 Lectin blotting による Itg $\beta 1$ の糖鎖解析

糖転移酵素の発現を mRNA とタンパクレベルで検討したところ、CRT 低発現細胞では $\beta 1$ 、4-ガラクトース転移酵素-I ($\beta 4 \text{GalT-I}$) の転写およびタンパクレベルの増加、 $\alpha 2$ 、6-シアル酸転移酵素-I (ST6Gal-I) と $\alpha 1$ 、2-フコース転移酵素-I (FucT-I) のタンパクレベルの減少を認めた (図 5)。これらの糖転移酵素

の発現量の変化は、図 4 における Lectin blotting で解析した糖鎖の変化と一致していた。

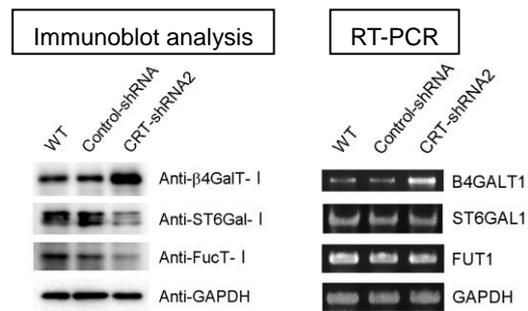


図 5 糖転移酵素の発現

CRT 低発現細胞では複数の糖転移酵素のタンパクレベルが変化しており、Itg $\beta 1$ の糖鎖構造が変化していた。Itg $\beta 1$ の糖鎖の変化により FN への接着能が低下し、FN 接着後のインテグリン関連シグナルが減弱することにより、浸潤能が低下したものと推察された (図 6)。

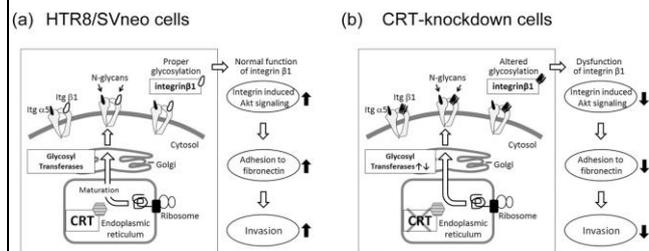


図 6 CRT 低発現による浸潤抑制機構 (仮説)

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 3 件)

- ① Yamamoto M, Ikezaki M, Toujima S, Iwahashi N, Mizoguchi M, Nanjo S, Minami S, Ihara Y, Ino K. Calreticulin is involved in invasion of extravillous trophoblast cells through the regulation of integrin $\beta 1$ maturation. *Endocrinology*. 2017. 158. 3874-3889. DOI: 10.1210/en.2016-1996. 査読有
- ② Nanjo S, Minami S, Mizoguchi M, Yamamoto M, Yahata T, Toujima S, Shiro M, Kobayashi A, Muragaki Y, Ino K. Levels of serum-circulation angiogenic factors within 1 week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with pre-eclampsia, gestational hypertension, and/or fetal growth restriction. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. 2017. 43. 1805-1814. DOI: 10.1111/jog.13452. 査読有

- ③ Iwahashi N, Yamamoto M, Nanjo S, Toujima S, Minami S, Ino K. Downregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the villous stromal endothelial cells of placentas with preeclampsia. J. Reprod. Immunol. 2017. 119. 54-60. DOI: 10.1016/j.jri.2017.01.003. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山本円, 岩橋尚幸, 池崎みどり, 井篁一彦, 井原義人. カルレティキュリンはインテグリンβ1への関与を介しヒト絨毛外栄養膜細胞浸潤を制御する. 第90回日本生化学会大会. 2017年12月. 神戸.
- ② 山本円, 池崎みどり, 東嶋左緒里, 岩橋尚幸, 南條佐輝子, 溝口美佳, 城道久, 太田菜美, 馬淵泰士, 八木重孝, 南佐和子, 井原義人, 井篁一彦. カルレティキュリンはインテグリンへの関与を介し絨毛外栄養膜細胞浸潤を制御する. 第24回日本胎盤学会. 2016年11月. 和歌山.
- ③ 山本円, 池崎みどり, 東嶋左緒里, 岩橋尚幸, 南條佐輝子, 溝口美佳, 城道久, 太田菜美, 馬淵泰士, 八木重孝, 南佐和子, 井原義人, 井篁一彦. 絨毛外栄養膜細胞浸潤における小胞体分子シャペロン・カルレティキュリンの役割. 第37回日本妊娠高血圧学会. 2016年10月. 埼玉.
- ④ 山本円, 池崎みどり, 岩橋尚幸, 南條佐輝子, 井篁一彦, 井原義人. カルレティキュリンはヒト絨毛細胞株(HTR8/SVneo)において細胞浸潤能に関与する. 第63回日本生化学会近畿支部例会. 2016年5月. 神戸.
- ⑤ 山本円, 岩橋尚幸, 南條佐輝子, 溝口美佳, 小林彩, 谷崎優子, 城道久, 太田菜美, 馬淵泰士, 八木重孝, 南佐和子, 井篁一彦. 小胞体分子シャペロンであるカルレティキュリンは絨毛外栄養膜細胞浸潤に関与する. 第68回日本産科婦人科学会学術講演会, 2016年4月. 東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 円 (Yamamoto Madoka)

(旧姓 吉田 (Yoshida))

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70596973

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし