

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11085

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の病態解明をめざして

研究課題名(英文) Aiming for the elucidation of the mechanism of pregnancy and hypertension

研究代表者

佐藤 幸保 (Sato, Yukiyasu)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：00508236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群の病態解明をめざして、まず血管内EVTの発現因子を調べた。まず血管内EVTに特異的に発現している可能性のあるマーカーを抽出することを目的として、血小板共培養の有無で初代EVTを比較するマイクロアレイ分析を行った。その中で表面発現分子であるCD59(補体制御因子)に着目した。器官培養から分離したEVTにおけるCD59発現を制御する因子について検討したところ、TGF- $\beta$ がCD59発現を増強させる主要な因子であることがわかった。以上の結果より血管内EVTは母体血液内で血小板由来のTGF- $\beta$ を利用してCD59を獲得し母体の補体免疫機構を回避している可能性を提唱し論文投稿した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群の病態解明は、児の危険のみならず母体合併症を減らすために、非常に重要な研究テーマである。今回の報告した結果は、その一端を担うものであることに間違いがなく、今後臨床応用に向けて更に研究を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism of pregnancy induced hypertension, we examined the expression factors of endovascular EVT.

First, in order to extract markers that might be specifically expressed in endovascular EVT, microarray analysis was performed to compare primary EVT with and without platelet co-culture. Among them, we focused on the surface expressed molecule CD59 (complement regulator). When examining the factors which regulating CD59 expression in isolated EVT from organ culture, it was found that TGF- $\beta$  is a major factor enhancing CD59 expression. Based on the these results, we proposed that intravascular EVT might obtain CD59 by using platelet-derived TGF- $\beta$  in maternal blood and avoid the maternal complement immune mechanism, and we submitted a paper.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：EVT PIH CD59

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト胎盤において、trophoblast の幹細胞である cytotrophoblast (CTB) は2方向の分化を示す。浮遊絨毛では、CTB は合体体化して syncytiotrophoblast を形成し、母児間でのガスや栄養物の交換を行う。一方、絨毛の母体面付着部では CTB は重層化し、cell column という構造を形成する。Cell column 内で CTB は extravillous trophoblast (EVT) に分化し、増殖能を失うかわりに浸潤能を獲得する。EVT は、cell column 遠位端より母体脱落膜および母体血管に浸潤していく。母体脱落膜を浸潤する EVT は interstitial trophoblast (iEVT)、母体血管を浸潤する EVT は endovascular trophoblast (eEVT) と呼ばれる。妊娠初期から中期にかけて、eEVT は母体血管壁を浸潤し母体血管の再構築(リモデリング)を引き起こす。これにより母体血管径は増大し、種々の血管作動物質への反応性を失う。この eEVT による母体血管リモデリングは胎児発育に必要な絨毛間腔への血流を確保するために不可欠であるとされている (Ramsey J Reprod Med 1981)。広範な母体血管リモデリングは霊長類に特異的な現象であり、マウスやラットの胎盤では認められない (Cross et al. Mol Cell Endocrinol 2002)。動物実験での解析が困難であること、またヒトを含めた霊長類で妊娠初期の着床部位のサンプルを得るのが困難なことから、母体血管リモデリングの分子機構はほとんど分かっていない。

早発型重症の FGR および PIH の発症機構として two-step theory が提唱されている。First step は、eEVT による母体血管リモデリングが十分に起こらないことである。これにより、絨毛間腔への血流が低下し胎児への酸素や栄養物の供給が減少することで FGR が発症する。Second step は、絨毛間腔への血流の低下により低酸素となった胎盤から何らかの液性因子が放出されることである。この液性因子は母体血中を循環し全身性の血管内皮障害を引き起こすことで PIH の主症状である高血圧や蛋白尿が発症する。近年、PIH 症状をもたらす液性因子として抗血管新生因子である sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) や sEng (soluble endoglin) が重要であることが明らかにされた。しかし、first step の成因についてはほとんど分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、eEVT の分子学的特徴を解析することにより母体血管リモデリングの分子機構を解明することである。母体血管リモデリングの分子機構を解明することにより、FGR や PIH 発症の first step の成因が明らかとなり、ひいては FGR や PIH を早期に予知できる母体血中マーカーの発見につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト妊娠着床部位の切片において、cell column 内の EVT (cEVT) とそこから分化した eEVT との蛋白発現プロファイルをプロテオミクス法により比較する。ここから得られた蛋白発現プロファイルを、免疫組織染色で確認し eEVT で有意に発現が増強あるいは減弱している分子(「eEVT マーカー」)を抽出する。妊娠中期の FGR/PIH 胎盤と正常対照胎盤との間で eEVT における eEVT マーカーの蛋白発現を比較することで、FGR/PIH 発症の病態に関わっている可能性のある「FGR/PIH 関連分子」を絞り込むことを目的とした。さらに、分離 EVT 細胞を用いて FGR/PIH 関連分子の発現を制御している因子を見出すこと、分離 EVT 細胞やそれから樹立した EVT 細胞株を用いて母体血管リモデリングの分子機構を解明すること、最終的に FGR および PIH 発症の first step にアプローチし、その発症を早期に予知できる母体血中マーカーを見出すことを目標とした。

## 4. 研究成果

まず、プロテオミクス法による血管内 EVT (eEVT) マーカーの抽出であるが、予定通りホルマリン固定されたパラフィン切片を用いて試みたが、固定時間の長短により抽出されるタンパク質プロファイルに変動があり、うまくいかなかった。今後は凍結切片を用いて行う予定である。

次に、絨毛組織の器官培養から分離した EVT から新しい EVT 細胞株を樹立する試みであるが、当初予定していた hTERT 遺伝子を導入するだけでは、既存の EVT 細胞株と同様、線維芽細胞の性格をあわせもった細胞しか得られない可能性が高いと考えた。通常分離 EVT にはほとんど増殖能がなく1週間以内でそのすべてが細胞死に至るが、絨毛組織と共培養することでその生存期間が1ヶ月以上に延長することが、その後の検討で明らかとなった。マウスでは胚盤胞を fibroblast growth factor 4 (FGF4) の存在に培養することによりトロホプラスト幹細胞を分離することに成功しており (Tanaka S et al. Science 1998)、FGF4 などの絨毛間質由来因子には分離 EVT の分化を抑制する作用があると推察している。この性質を応用して EVT 細胞株の樹立を試みることを予定している。

最後に、FGR/PIH 発症 first step へアプローチするために、eEVT に特異的に発現している表面マーカーを抽出する目的で血小板共培養の有無で分離 EVT 細胞を比較するマイクロアレイ分析を行った。抽出されてきた分子の中で、CD59 (補体制御因子) に着目した。CD59 が EVT の中で eEVT に特異的に発現していることが明らかとなった。母体血管内では EVT は母体の補体因子に必然的にさらされるが、eEVT は CD59 を獲得することで補体による攻撃を回避している可能性があることを提唱し、論文として投稿した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 35 件)

### 【和文】

1. 破裂を反復した産褥期卵巣動脈瘤の 1 例  
丸山俊輔、多賀敦子、江本郁子、金 共子、佐藤幸保  
日本周産期・新生児医学会雑誌 52(1)、p140-143、2016
2. 多胎妊娠分娩時の出血対策  
佐藤幸保、多賀敦子、江本郁子、丸山俊輔、金 共子  
産婦人科の実際 65(5)、p555-560、2016
3. 病理組織診断に苦慮した子宮頸癌の一例  
榮 智恵子、佐藤幸保、多賀敦子、佐竹由美子、江本郁子、丸山俊輔、金 共子  
滋賀県産科婦人科雑誌 8、p53-57、2016
4. 細胞診所見を念頭においた円錐切除術の可能性  
榮智恵子、金 共子、多賀敦子、佐竹由美子、江本郁子、丸山俊輔、三瀬裕子、佐藤幸保  
滋賀県産科婦人科雑誌 8、p49-51、2016
5. 経膈分娩が可能であった前置血管 (low-lying type) の 2 症例  
多賀敦子、佐藤幸保、榮智恵子、江本郁子、丸山俊輔、三瀬裕子、金 共子  
滋賀県産科婦人科雑誌 8、p39-43、2016
6. 妊娠 36 週時に診断された低置胎盤症例の転帰について  
丸山俊輔、多賀敦子、榮 智恵子、佐竹由美子、江本郁子、三瀬裕子、金 共子、佐藤幸保  
滋賀県産科婦人科雑誌 8、p15-19、2016
7. 双胎の分娩方法についての後方視的検討  
佐藤幸保、江本郁子、榮智恵子、多賀敦子、佐竹由美子、丸山俊輔、三瀬裕子、金共子  
滋賀県産科婦人科雑誌 8、p3-7、2016
8. 妊娠中期に発症し待機的管理を行った常位胎盤早期剥離の 2 症例。  
江本郁子、多賀敦子、丸山俊輔、金 共子、佐藤幸保  
日本周産期・新生児医学会雑誌 53(3):885-889. 2017
9. 前置穿通胎盤に対して保存的療法を選択した 2 症例。  
多賀敦子、江本郁子、丸山俊輔、金 共子、佐藤幸保  
日本周産期・新生児医学会雑誌 53(3):890-895. 2017
10. 術中に気づかれなかった尿管損傷を術後早期に検出する因子についての検討。  
多賀敦子、佐藤幸保、上林翔大、江本郁子、丸山俊輔、三瀬裕子、金 共子  
滋賀県産科婦人科雑誌 9:19-23. 2017
11. 緊急子宮頸管縫縮術後の妊娠継続に関与する因子についての検討  
上林翔大、佐藤幸保、多賀敦子、江本郁子、丸山俊輔、三瀬裕子、金 共子  
滋賀県産科婦人科雑誌 9:25-29. 2017
12. 後腹膜原発の粘液性腺癌の 1 例。  
多賀敦子、丸山俊輔、上林翔大、江本郁子、三瀬裕子、金 共子、佐藤幸保  
滋賀県産科婦人科雑誌 9:51-55. 2017
13. 妊娠中期の羊水過少に対して経腹的人工羊水持続注入を試みた 4 症例についての検討  
上林 翔大、丸山俊輔、多賀敦子、江本郁子、三瀬裕子、金 共子、佐藤幸保  
滋賀県産科婦人科雑誌 9:67-72. 2017

### 【英文】

14. Maruyama S, Sato Y, Nakaki A, Satake Y, Emoto I, Kim T. Postpartum duodenal perforation after acute fatty liver of pregnancy. Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology. 2016;36(1):58-9.
15. Maruyama S, Sato Y, Taga A, Emoto I, Shirase T, Haga H. Immunoglobulin G4-related disease presenting as bilateral ovarian masses and mimicking advanced ovarian cancer. J Obstet Gynaecol Res. 2016;42(1):103-8.
16. Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Suginami K, Tani H, Hattori A, et al. CD9 suppresses human extravillous trophoblast invasion. Placenta. 2016;47:105-12.
17. Sato Y, Emoto I, Maruyama S, Taga A, Fujii T. Twin vaginal delivery is associated with lower umbilical arterial blood pH of the second twin and less intrapartum blood loss. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016;29(19):3067-71.
18. Suizu A, Sato Y, Maruyama S, Nakaki A, Satake Y, Mise H, et al. Successful management of monochorionic diamniotic triplet pregnancy. Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology. 2016;36(6):758-9.
19. Tani H, Sato Y, Ueda M, Miyazaki Y, Suginami K, Horie A, et al. Role of Versican in the Pathogenesis of Peritoneal Endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(11):4349-56.

20. Ueda M, Koshiyama M, Sato Y. Prophylactic corticosteroids in pulmonary oil embolism after hysterosalpingography. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2016;36(1):137-8.
21. Kanbayashi S, Sato Y, Taga A, Satake Y, Emoto I, Maruyama S, et al. Positive vaginal culture at rescue cerclage predicts subsequent preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017:1-5.
22. Maruyama S, Sato Y, Moriuchi K, Kanbayashi S, Ri Y, Taga A, et al. Fetal death following idarubicin treatment for acute promyelocytic leukemia in pregnancy-A case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017.
23. Sakae C, Sato Y, Kanbayashi S, Taga A, Emoto I, Maruyama S, et al. Introduction of management protocol for early-onset severe pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017;43(4):644-52.
24. Suginami K, Sato Y, Horie A, Matsumoto H, Kyo S, Araki Y, et al. Platelets are a possible regulator of human endometrial re-epithelialization during menstruation. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2017;77(1).
25. Suginami K, Sato Y, Horie A, Matsumoto H, Tani H, Mizumoto Y, et al. Platelet-derived microparticles and soluble factors differentially regulate human endometrial epithelial cell movement. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2017.
26. Taga A, Sato Y, Sakae C, Satake Y, Emoto I, Maruyama S, et al. Do All Cases of Vasa Previa Need Cesarean Delivery? A case Report and Review of the Literatures. *Int J Pregn & Chi Birth*. 2017;2(5):37-42.
27. Taga A, Sato Y, Sakae C, Satake Y, Emoto I, Maruyama S, et al. Planned vaginal delivery versus planned cesarean delivery in cases of low-lying placenta. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017;30(5):618-22.
28. Yasumoto K, Sato Y, Ueda Y, Ito T, Kawaguchi H, Nakajima M, et al. Expectant management for abdominal pregnancy. *GMIT*. 2017;6:82-4.
29. Emoto I, Moriuchi K, Kanbayashi S, Inohaya A, Ri Y, Sato Y. Power morcellation-induced dissemination of sarcomatous component arising in leiomyoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018;44(9):1843-9.
30. Fujiwara H, Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Ono M, Nakamura M, et al. Factors regulating human extravillous trophoblast invasion. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2018.
31. Miyazaki Y, Horie A, Tani H, Ueda M, Okunomiya A, Suginami K, et al. Versican V1 in human endometrial epithelial cells promotes BeWo spheroid adhesion in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2018.
32. Ri Y, Sato Y, Moriuchi K, Inohaya A, Ueda M, Kim T. Intrapartum balloon placement ameliorates repetitive variable decelerations of fetal heart rate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018;231:281-2.
33. Taga A, Sato Y, Kanbayashi S, Ri Y, Emoto I, Maruyama S, et al. Clinical Evidence for Adenoma-Carcinoma Sequence in Primary Retroperitoneal Mucinous Cystadenocarcinoma. *Obstet Gynecol Res*. 2018;1(1):1-8.
34. Koshida S, Ono T, Tsuji S, Sato Y, Murakami T, Arima H, et al. Impact of the recommendation for embryo transfer limitation on multiple pregnancy: A population-based study in Japan. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;237:113-6.
35. Ueda M, Sato Y, Horie A, Tani H, Miyazaki Y, Okunomiya A, et al. Endovascular trophoblast expresses CD59 to evade complement-dependent cytotoxicity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2019.

[学会発表](計 39 件)

1. 学会名：第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 28 年 4 月 21-24 日 於 東京  
演題名：Role of CD59 in remodeling of the maternal spiral artery  
発表者：Masashi Ueda, Akihito Horie, Yukiyasu Sato, Koh Suginami, Hirohiko Tani, Yumiko Miyazaki, Asuka Okunomiya, Ikuo Konishi
2. 学会名：第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 2016 年 4 月 21-24 日 於 東京  
演題名：Role of Versican V1 in an Embryo Implantation Model  
発表者：Yumiko Miyazaki, Akihito Horie, Yukiyasu Sato, Koh Suginami, Hirohiko Tani, Masashi Ueda, Asuka Okunomiya, Ikuo Konishi, Tamayuki Shinomura
3. 学会名：第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 2016 年 4 月 21-24 日 於 東京  
演題名：Upregulation of versican in apparently normal peritoneum in women with endometriosis is not be secondary event but may be the cause  
発表者：Hirohiko Tani, Akihito Horie, Yukiyasu Sato, Koh Suginami, Yumiko Miyazaki, Masashi Ueda, Asuka Okunomiya, Ikuo Konishi, Tamayuki Shinomura

4. 学会名：第9回温知会サマークリニカルフォーラム 平成28年7月18日 於：京都市  
演題名：学術奨励賞講演「双胎分娩方法に関する後方視的検討」  
発表者：佐藤幸保
5. 学会名：第34回日本受精着床学会学術講演会 2016年9月15-16日 於 軽井沢  
演題名：「ヒト子宮内膜における versican の役割：胚着床モデルを用いた解析」  
発表者：宮崎有美子、堀江昭史、佐藤幸保、谷 洋彦、上田 匡、奥宮明日香、松村謙臣、篠村多摩之
6. 学会名：第61回日本生殖医学会学術講演会 2016年11月3-4日 於 横浜  
演題名：「ヒト子宮内膜における versican の役割：胚着床モデルを用いた解析」  
発表者：宮崎有美子、堀江昭史、佐藤幸保、谷 洋彦、上田 匡、奥宮明日香、松村謙臣、篠村多摩之
7. 学会名：第61回日本生殖医学会学術講演会 2016年11月3-4日 於 横浜  
演題名：「Versican はヒアルロン酸を介し子宮内膜症の腹膜病変形成に関与する」  
発表者：谷 洋彦、堀江昭史、佐藤幸保、宮崎有美子、上田 匡、奥宮明日香、松村謙臣、篠村多摩之
8. 学会名：第24回日本胎盤学会学術集会 2016年11月24-25日 於 和歌山  
演題名：「EVTにおける、CD59 発現による母体補体経路からの回避機構の解明」  
発表者：上田 匡、堀江昭史、佐藤幸保、谷 洋彦、宮崎有美子、奥宮明日香、松村謙臣
9. 学会名：第26回 滋賀県母性衛生学会学術集会 平成29年1月29日 於：大津市  
演題名：教育講演「よりよい周産期医療に向けて」  
発表者：佐藤幸保
10. 学会名：第53回日本周産期・新生児学会 平成29年7月16日～18日 於：横浜市  
演題名：「早発型重症妊娠高血圧腎症に対する管理プロトコルの有用性」  
発表者：佐藤幸保、多賀敦子、江本郁子、丸山俊輔、金 共子
11. 学会名：日本産婦人科学会 2018年4月11-13日 於 仙台  
演題名：CD59 expression on human extravillous trophoblast may be regulated by surrounding microenvironment  
発表者：Masashi Ueda, Akihito Horie, Yukiyasu Sato, Hirohiko Tani, Asuka Okunomiya, Yusuke Sagae, Masaki Mandai
12. 学会名：第40回日本血栓止血学会学術集会 平成30年6月29日 於：札幌市  
演題名：学術推進委員会シンポジウム2「Beyond-clotting role of platelets in early placentation」  
発表者：佐藤幸保、藤原浩
13. 学会名：日本受精着床学会 2018年7月26-27日 於 千葉幕張メッセ  
演題名：「二次卵胞の比較トランスクリプトーム解析に基づいた小児卵胞体外培養系における必要分子の考察」  
発表者：奥宮明日香、寒河江悠介、上田 匡、谷 洋彦、堀江昭史、佐藤幸保、杉本実紀、Brown, J.B.、万代昌紀
14. 学会名：平成30年度 香川県医学会 平成30年10月21日 於：善通寺市  
演題名：「総合病院でおこなう不妊治療について」  
発表者：佐藤幸保、岸本尚也、原田由里子、森 陽子、原田龍介、小泉倫子、後藤真樹

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：堀江 昭史

ローマ字氏名：HORIE, Akihito

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号 (8桁): 30535836

研究分担者氏名: 谷 洋彦

ローマ字氏名: TANI, hirohiko

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 医学研究科

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 70615252

研究分担者氏名: 伊藤 美幸

ローマ字氏名: ITO, miyuki

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 医学研究科

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 00760951

研究分担者氏名: 鶴山 竜昭

ローマ字氏名: TSURUYAMA, tatsuaki

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 医学研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8桁): 00303842

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。