

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11096

研究課題名（和文）オートファジーを介した妊娠高血圧症候群のメタボローム解析と予知因子の同定

研究課題名（英文）Metabolomic analysis and identification of the predictor of hypertensive disorder of pregnancy.

研究代表者

西田 欣広（Nishida, Yoshihiro）

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10336274

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）：妊娠高血圧症候群は妊娠中の高血圧、蛋白尿をきたす最大の周産期合併症であるにもかかわらず、その病態も複雑かつ要因も多岐にわたりいまだに全貌が明らかになっていない。妊娠高血圧症候群の胎盤では低酸素、低栄養、老化が進んでいると仮説を立て、ほとんど研究報告のない胎盤におけるオートファジーとそのメタボローム解析に焦点をあてた。これまでに行ってきた胎盤や培養細胞での研究成果をもとに、シャペロン介在性オートファジー機構とメタボローム解析による胎盤の細胞内一次代謝産物の変動を詳細にかつ包括的に多変量分析した。その結果これまで未知の病態の一部と予知因子候補を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群におけるオートファジーの関与と胎盤組織の一次代謝産物からみたペントースリン酸経路の活性化をリンクさせることができた興味深い結果を報告した。特にペントースリン酸回路を介した中心代謝経路の関与の発見は今後の複雑な胎盤機能を解明していく上で、有意義な結果が得られたと考えられる。今後は今回明らかにしたシャペロン介在性オートファジー・Keap1-Nrf2 system・ペントースリン酸経路のクロストークとその関連因子の解明が妊娠高血圧症候群そのものの病態解明や病態予知因子の探索に重要なカギを握る可能性が高く学術的にも意義深い研究と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Hypertensive disorder of pregnancy is the most famous perinatal complication to result hypertension and proteinuria during pregnancy. However, the total picture does not yet become clear because the condition of a patient is complicated. We hypothesized that abnormal placentas are under hypoxia, malnutrition and aging. So, we focused on the placental autophagy and the metabolomic analysis. Based on the results of our research, multivariate analysis elucidated the change of the primary metabolites in the placenta tissues via chaperon-mediated autophagy, comprehensively. As a result, We were able to clarify an unknown pathologic part and several predictor candidates.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠高血圧症候群 メタボローム解析 オートファジー 低酸素 ヒト胎盤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内における異常タンパク質の分解経路には現在のところ、ユビキチン・プロテアソームによる選択的分解系とオートファジー (自食作用) による bulk 分解系 (非選択的) の2つが知られている。細胞内ではそれぞれの系が独立して、もしくは時に協調的に働くことにより、細胞内のホメオスタシスを維持、監視していると考えられている。最近の10年間でオートファジー研究は基礎的研究では飛躍的に発展、解明されてきたが、まだ臨床応用はほとんどなされていない。胎盤研究では妊娠高血圧症候群 (以下 HDP) の胎盤での LC3 蛋白の発現や正常胎盤での部位別 LC3 による免疫染色による報告があるがそのメカニズムに関しては全く不明である。その後の review においても胎盤のオートファジー研究は他の組織での研究にくらべてはるかに遅れていると指摘されている。最近では BCL2 調節性オートファジーが筋肉の恒常性に必要であることやオートファジーを免れたミトコンドリア DNA が心不全を引き起こすことなど臨床的にも topic となっている。我々はこれまでの初期段階の研究で、HDP の胎盤におけるシャペロン介在性オートファジー (以下 CMA) に BAG3-HSPB8 chaperone complex (BAG3:Bcl-2-associated athanogene, HSPB8:heat shock 22kDa protein 8) が関与している可能性を見出している。

2. 研究の目的

HDP は妊娠中の高血圧、蛋白尿をきたす最大の周産期合併症であるにもかかわらず、その病態も複雑かつ要因も多岐にわたりいまだに全貌が明らかになっていない。その胎盤では低酸素、低栄養、老化が促進しているとの仮説を立てた。今回の研究では、ほとんど研究報告のない胎盤におけるオートファジーとそのメタボローム解析に焦点をあてた。これまでに行ってきた胎盤や培養細胞での研究成果をもとに、主としてシャペロン介在性オートファジー機構を細胞生物学的手法、免疫染色法を駆使し解明する。また mRNA array より autophagy pathway からみた胎盤の細胞内における蛋白の変動と、その一次代謝物をメタボローム解析でより詳細にかつ包括的に細胞内動態をダイナミックに分析し、病態の本体に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

HDP の胎盤オートファジーのメカニズムを解明するため、特にシャペロンが介在している系を重点的に明らかにし、その一次代謝物をメタボローム解析する。まずヒト胎盤よりシャペロン関連タンパクの発現を生化学的手法、免疫組織学的手法を用いて解析する。また HUVEC (臍帯静脈血管内皮細胞) 等の関連培養細胞を用いて低酸素、低栄養状態におけるオートファジーをモデル化する。また細胞免疫組織学的にシャペロンの免疫染色を行い、細胞内での発現の推移と低酸素、低栄養の与える影響について検討する。また同時に HDP 胎盤より mRNA を抽出し、mRNA のマイクロアレイ解析を行い、オートファジーにおける mRNA の変動遺伝子を同定する。さらに一次代謝産物を網羅的にメタボローム解析 [トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 (GS-MS/MS QT8040, SHIMADZU) を使用] したものと比較、多変量解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト胎盤における BAG3-HSPB8 シャペロン複合体 (BAG3-HSPB8 chaperone complex)

ここに我々が行った western blotting の結果 (一部) を示す (図 1 A, B)。HDP では過剰な BAG3-HSPB8 chaperone complex が誘導され、また最終段階の LC3-II の発現がみられ、PIH の胎盤では

CMA が誘導されていることを初めて確認した。実際にオートファジーが誘導されている現象の電子顕微鏡所見を示す (図 1 C)。また、HUVEC や初代胎盤絨毛細胞を用いた低酸素誘導実験における western blotting、組織免疫染色でも BAG3、HSPB8 の発現を確認した (図 1 D)。初代胎盤絨毛細胞についても同様の結果であった (data not shown)。これらのことより HDP において BAG3-HSPB8 chaperone complex が誘導されることが判明した。通常レベルの異常タンパクは polyUb 化タンパクとなりプロテアソームによって分解されている。今回の研究より、HDP の胎盤では低栄養、低酸素等による環境ストレスのためプロテアソームによる分解能を超え、HSPB8-BAG3 chaperone complex の発現が増強したと考えられた。その結果、BAG3 を介した細胞の CMA 機能が強く誘導され、異常タンパクのクリアランスが行われていることが示唆された。

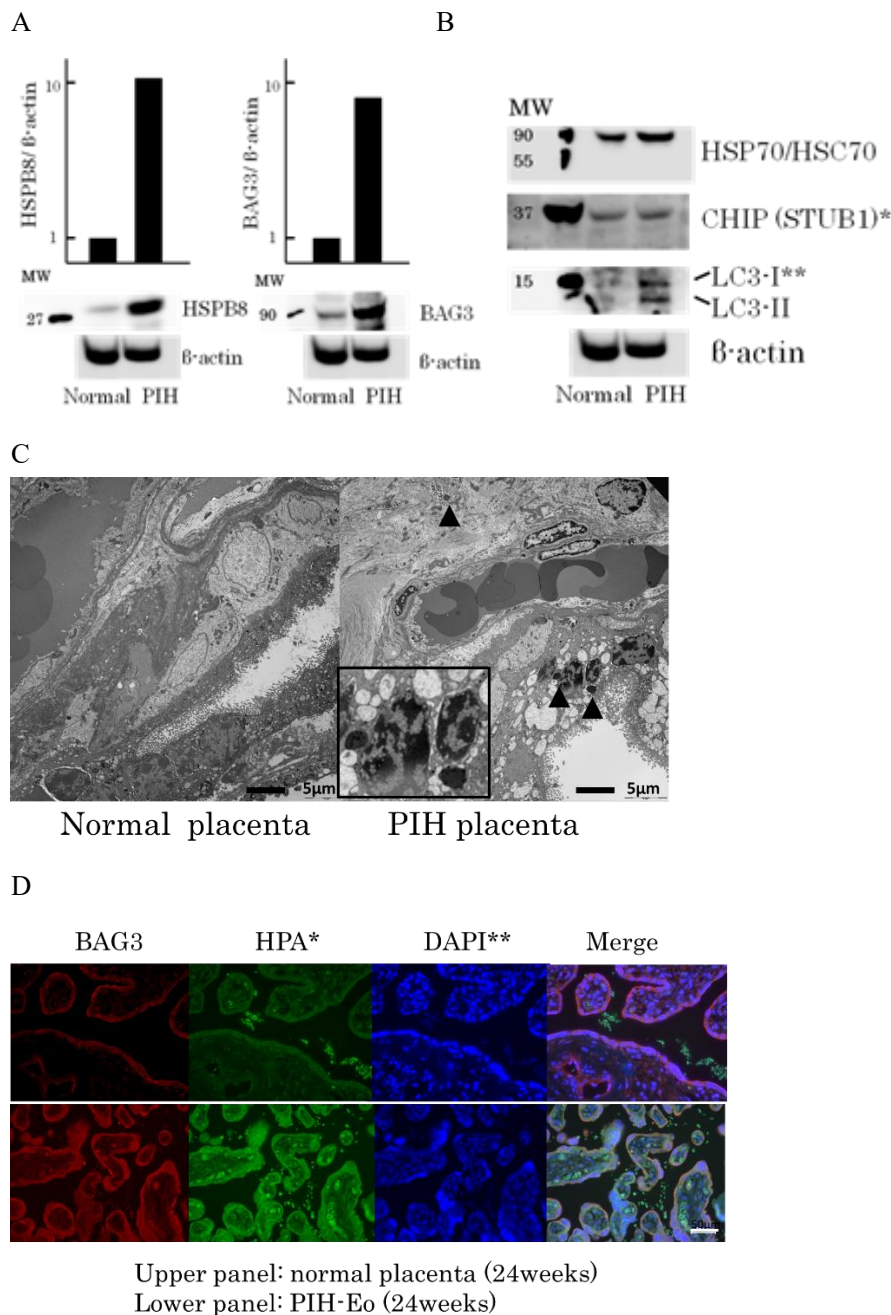


図 1 A, B : 正常胎盤と HDP 胎盤の western blotting。HSPB8 および BAG3 の著明な発現増加 (約 10 倍) が認められる (A)。HSP70/HSC70 および CHIP の発現は変化を認めないが LC3-II の明らかな発現を認める (B)。C : HUVEC における電子顕微鏡所見。HDP で autophagy が確認される (▲)。D : 免疫組織染色所見。HDP で BAG3 の発現が認められる。(* HPA: Helix pomatia agglutinin, ** DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole)

(2) 胎盤のメタボローム解析

ヒト胎盤におけるメタボローム解析を行い、正常胎盤と HDP の胎盤の差異を検討し、我々の手法で組織を 2 群に判別することが可能であった (図 2 A)。結果としてこの 2 つの胎盤の質的変化を一次代謝物の変化として捉え、475 代謝物中 372 代謝物 (78%) が解析可能であった。結果の一部であるが、メタボローム解析により特にペントースリン酸経路の Ribulose 5-Phosphate, Ribose 5-phosphate が HDP の胎盤で有意に増加していた (図 2 B)。HDP ではエネルギー代謝経路の中でペントースリン酸経路を活性化させる、すなわち解糖系を迂回することが明らかになった。胎盤におけるペントースリン酸経路は核酸産生とともに Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) を生成し、抗酸化作用を増強することで酸化ストレスに耐性化に関与していることが示唆されている。

(3) 胎盤の mRNA アレイ解析

まず、我々は正常胎盤と HDP の胎盤を調整し、mRNA array 解析を行ったところ、PIH の胎盤で G6PD mRNA が 5.26 倍 ($p=0.002$) と有意に上昇していることが確認できた (図 2 C)。前述のようにこれまでに明らかになっていたペントースリン酸経路の Ribulose 5-Phosphate, Ribose 5-phosphate の生成酵素であることから、次に glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) を制御していると想定される Keap1-Nrf2 system を検討した。

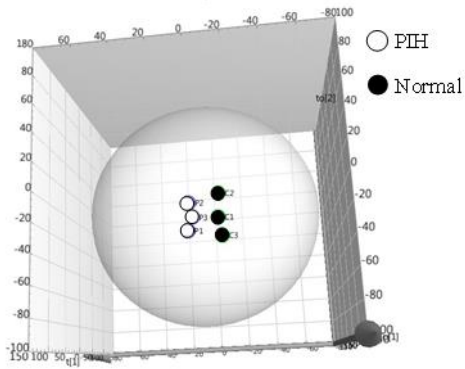
(4) 胎盤の Keap1-Nrf2 system (Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, Nrf2: NF-E2-related factor-2) の検討

胎盤組織よりタンパクを抽出し、western blotting を行った。詳細は紙面の関係で省略するが、PIH の胎盤では早発型 (妊娠 33 週未満)、遅発型 (妊娠 33 週以降) に拘わらず、Keap1, Nrf2 のタンパクの発現増加および低酸素マーカーである HIF1 α の発現増加が認められた (図 2 D)。このことは免疫組織学的にも検討し、Nrf2 の発現は核内に移行して発現していることが確認された (data not shown)。対照として胃がん (AGS)、子宮頸がん (HeLa) 組織の発現も確認したが、ほぼがん組織と同等の発現量であった。また、ミトコンドリア量 (ATP5) の発現には変化が見られなかった。これらの事実から HDP の胎盤でのメタボローム解析でペントースリン酸経路が活性化していることが判明した。さらに分子生物学的、免疫組織学的な検討で、G6PD を介した Keap1-Nrf2 system により経路が制御されている可能性を示すことができた。さらに Keap1-Nrf2 system を活性化するその他のストレス関連因子 (低酸素、低栄養、薬物) による酸化ストレス下の誘導についても *in vitro* の系で確認している (data not shown)。

(5) 今後の展望

胎盤におけるオートファジーの 1 つとして CMA を介するシステムが HDP の胎盤で活性化しているという非常にユニークな結果を得た。今後はその意義とメカニズムについてさらなる解明が必要である。一方で、mRNA アレイ解析とメタボローム解析により別角度から胎盤の代謝物を一括解析した結果、ペントースリン酸回路を介した中心代謝経路の動態の解明は今後の複雑な胎盤機能を解明していく上で、有意義な結果が得られたと考えられる。さらにシャペロン介在性オートファジー・Keap1-Nrf2 system・ペントースリン酸経路のクロストークと関連経路の詳細なメカニズムの解明が HDP そのものの病態解明や病態予知因子の探索に重要なカギを握る可能性が高い。今後の臨床応用に不可欠なメカニズム解明と考えている。

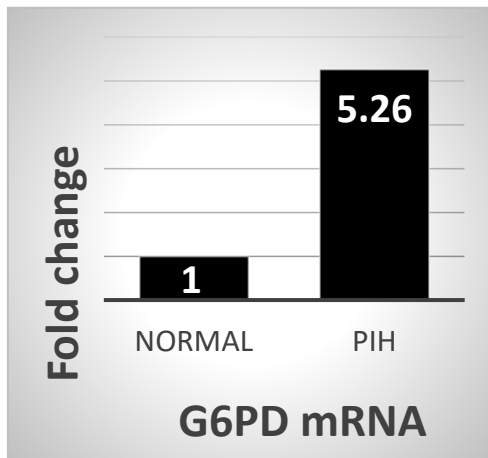
A



B

Up-regulate	p-Value
3-Aminoisobutyric acid	0.042
3-Aminoglutaric acid	0.035
Gluconic acid	0.017
Glucaric acid	0.015
Ribulose 5-phosphate	0.002
Ribose 5-phosphate	0.002
Elaidic acid	0.036
Docosahexaenoic acid	0.003
Inosine	0.016
Down-regulate	p-Value
2-Ketoglutaric acid	0.012

C



D

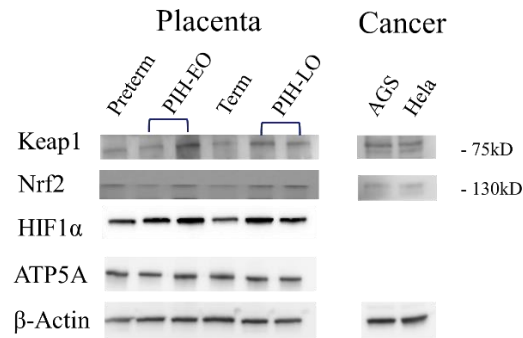


図2 A: Scatter 3D Plot (OPLS-DA, 判別分析法)による2群の判別。明確に2群に判別可能である。B: メタボローム解析による正常胎盤とHDP胎盤の一次代謝物の変動 ($p < 0.05$ のみ)。C: mRNAアレイによる網羅的解析。G6PD mRNAが5.26倍有意に増加している。D: 正常胎盤とHDPの胎盤のwestern blotting。Keap1およびNrf2がPIHの胎盤で発現が増加している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 西田欣広	4. 巻 33
2. 論文標題 妊娠高血圧症候群に關与するオートファジーとメタボローム解析からみた胎盤一次代謝産物の変動	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO clinica	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Y, Yamaguchi N, Nishida Y et al	4. 巻 22
2. 論文標題 Detection of DNA double-strand breaks by pulsed-field gel electrophoresis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gene to Cells	6. 最初と最後の頁 84-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Masanori, Hada Kazumasa, Shiraishi Hiroshi, Yatsuka Hiroyuki, Fujinami Hiroyuki, Morisaki Ikuko, Nishida Yoshihiro, Matsubara Etsuro, Ishitani Tohru, Hanada Reiko, Matsumoto Masaki, Penninger Josef M., Ihara Kenji, Hanada Toshikatsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Tyrosine pre-transfer RNA fragments are linked to p53-dependent neuronal cell death via PKM2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.02.157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田欣広、井上尚実、石井照和、櫛原久司
2. 発表標題 妊娠高血圧症腎症における酸化ストレスはSIRT1-NDRG1-p53 systemの活性化が關与している
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田欣広、小山尚子、岡本真実子、宮本侑子、榎原久司
2. 発表標題 妊娠高血圧症腎症における胎盤の酸化ストレスはKeap1-Nrf2 systemにより制御されている
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西田欣広、石井照和、井上尚実、榎原久司
2. 発表標題 メタボローム解析からアプローチした胎盤の酸化ストレスとKeap1-Nrf2 system
3. 学会等名 第17回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西田欣広、小山尚子、岡本真実子、宮本侑子、榎原久司
2. 発表標題 妊娠高血圧症候群の胎盤における胎盤ではペントースリン酸経路が亢進している
3. 学会等名 第68回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西田欣広、石井照和、酒井久美子、古屋マミ、松本重清、足立佐和子、徳丸治、北野敬明、榎原久司
2. 発表標題 ヒト胎盤における酸化ストレスはKeap1-Nrf2 systemにより制御されている
3. 学会等名 第69回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西田欣広、石井照和、佐藤初美、榎原久司
2. 発表標題 ヒト胎盤メタボローム解析と妊娠高血圧症候群における病的意義
3. 学会等名 第37回日本妊娠高血圧学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西田欣広
2. 発表標題 メタボローム解析を応用したヒト胎盤の病態解明
3. 学会等名 第10回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西田欣広、石井照和、足立佐和子、酒井久美子、古屋マミ、松本重清、北野敬明、花田俊勝、榎原久司
2. 発表標題 一次代謝物からアプローチした胎盤酸化ストレスの新規代謝経路の解明
3. 学会等名 第7回CIA研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Naomi Inoue, Hisashi Narahara, Yoshihiro Nishida, and Katsuhiko Hanada	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 228
3. 書名 DNA Electrophoresis: Methods and Protocols	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 胚の評価方法	発明者 西田欣広	権利者 大分大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-06168	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	花田 俊勝 (HANADA TOSHIKATU) (10363350)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	酒井 久美子 (SAKAI KUMIKO) (60225753)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	花田 克浩 (HANADA KATSUHIRO) (90581009)	大分大学・医学部・助教 (17501)	