

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16809

研究課題名（和文）胎盤形成不全における小胞体シャペロン - カルレティキュリンの発現と病態意義の解明

研究課題名（英文）The functional role of of calreticulin, a molecular chaperone, in dysfunctional placentation

研究代表者

山本 円 (YAMAMOTO, MADOKA)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70596973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小胞体シャペロンであるカルレティキュリン（CRT）が胎盤形成の元となるシンシチウム化に果たす機能的役割について解明することを目的とした。BeWo細胞においてCRT発現抑制がE-カドヘリンの発現変化を介してシンシチウム化能を低下させていた。また小胞体ストレスによりCRTの細胞外分泌が誘導され、過剰に分泌されたCRTが -hCG分泌抑制を引き起こした。以上より、CRTは胎盤形成におけるシンシチウム化に影響を及ぼし、妊娠高血圧腎症の病態に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧腎症は高血圧・蛋白尿・浮腫を主徴とする妊娠合併症である。確実な治療は妊娠の終了しかなく、母体や児の予後に大きな影響を与える。胎盤形成不全が関連しているといわれているが、確立された病態メカニズムはない。本研究により、CRTが妊娠初期胎盤形成におけるシンシチウム化に促進的な役割を果たしていると考えられた。またシンシチウム化不全を基盤とする妊娠高血圧腎症の病態にCRTが関与している可能性が示唆された。本研究が妊娠高血圧腎症の新たな治療法確立の基盤となることを期待する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the functional role of calreticulin (CRT), a molecular chaperone, in trophoblast syncytialization during placental development. The knockdown of CRT suppressed syncytialization by affecting the expression of E-cadherin in BeWo cells. The release of CRT is upregulated by ER stress and reduced -hCG secretion in BeWo cells. Collectively, our data indicate that CRT regulates trophoblast syncytialization in placental development, suggesting that CRT may have a functional role in pathophysiology of preeclampsia.

研究分野：産婦人科

キーワード：カルレティキュリン 分子シャペロン 胎盤 妊娠高血圧腎症

### 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。胎盤絨毛形成の過程において、細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast; CTB) から合胞体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast; STB) への細胞融合・多核化 (シンシチウム化) が非常に重要な役割を果たす。妊娠初期のシンシチウム化が不十分であると胎盤形成不全となり、妊娠高血圧症候群や胎児発育不全などの疾患をきたすと言われている。近年、ヒト妊娠において、小胞体の分子シャペロンであるカルレチキュリン (CRT) が、妊婦の胎盤や血液中で高発現し、妊娠高血圧症候群の妊婦の血液中でレベルの上昇する分子として報告されている。CRT は小胞体における Ca<sup>2+</sup> イオンの貯蔵と糖タンパク質のフォールディング・品質管理に関わり、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。

### 2. 研究の目的

小胞体シャペロンである CRT が胎盤形成の元となるシンシチウム化に果たす機能的役割とそのメカニズムについて解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト絨毛癌細胞株である BeWo 細胞を用い、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。CRT の発現抑制の影響について、cAMP 誘導剤である forskolin 誘導性のシンシチウム化能や β-hCG の合成・分泌能、E-カドヘリンの合成能や局在、細胞間の接着能の変化について比較検討した。

(2) 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や血清を用いて、CRT の発現を Western blotting 法もしくは免疫組織化学染色を用いて検討した。

(3) BeWo 細胞に小胞体ストレスを誘導し、CRT の培養上清への細胞外分泌量を測定した。また高 CRT が絨毛形成に与える影響について、BeWo 細胞を用いて forskolin 誘導性のシンシチウム化能や β-hCG の合成・分泌能について評価した。

### 4. 研究成果

(1) BeWo 細胞を用い、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 (図 1)。

(2) CRT 発現抑制株において、免疫蛍光染色法により forskolin 誘導性のシンシチウム化の有意な抑制を認めた (図 2A)。同時に、CRT 発現抑制により細胞内の β-hCG の発現 (real-time RT-PCR 法) および細胞上清中の β-hCG 分泌 (ELISA 法) が有意に低下した (図 2B, C)。

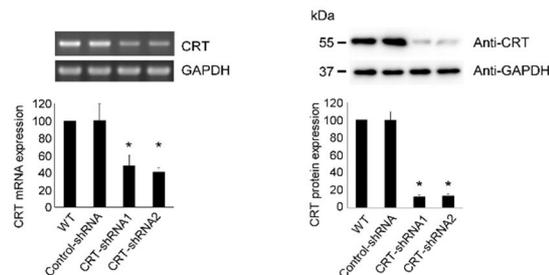


図 1 BeWo 細胞における CRT 発現抑制株

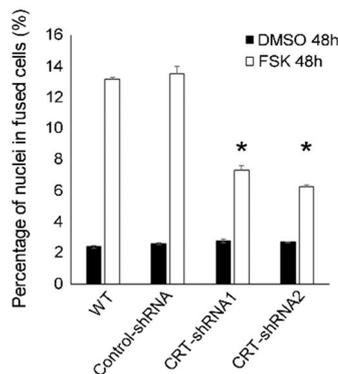


図 2A CRT 発現抑制株におけるシンシチウム化能

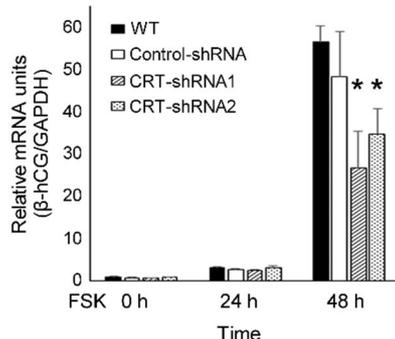


図 2B CRT 発現抑制株における細胞内 β-hCG 発現

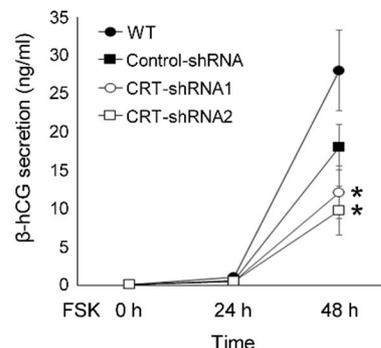


図 2C CRT 発現抑制株における β-hCG 分泌

(3) CRT 発現抑制株において、免疫蛍光染色および免疫沈降法により E-カドヘリンの細胞内での集積および細胞表面の発現低下を認めた (図 3A, B)。

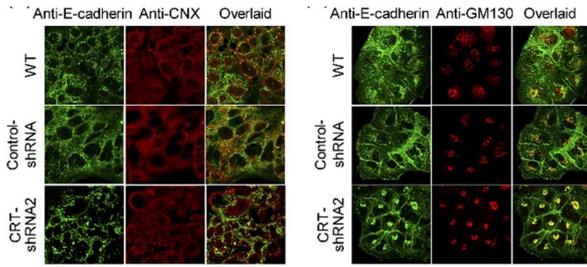


図 3A CRT 発現抑制株における E-カドヘリンの局在変化

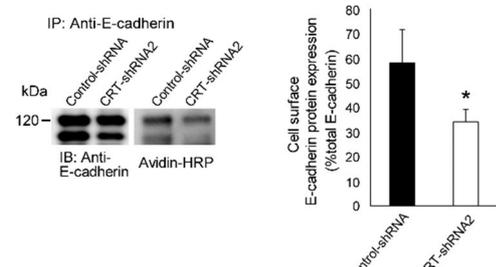
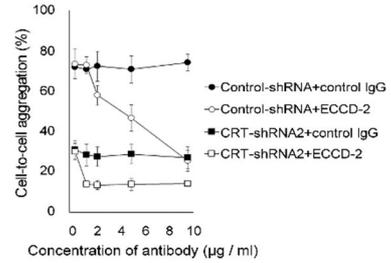


図 3B 細胞表面の E-カドヘリン発現の変化

(4) 細胞表面の E-カドヘリンの阻害抗体である ECCD-2 を添加し、凝集アッセイにより細胞間接着能の変化を検討した。Control 細胞株では ECCD-2 の濃度依存的に細胞間接着が阻害されたが、CRT 発現抑制株では細胞間接着能が定常状態でも低く、ECCD-2 の影響は受けなかった(図 4)。



小括：BeWo 細胞において CRT 発現抑制が E-カドヘリンの発現変化を介してシンシチウム化能を低下させていたことより、CRT が妊娠初期胎盤形成におけるシンシチウム化に促進的な役割を果たしていると考えられた。

図 4 ECCD-2 による細胞間接着の変化

(5) ヒト胎盤組織で栄養膜細胞に CRT が強発現していた。胎盤組織の CRT 発現は正常妊娠と PE とで差を認めなかったが(図 5A)、母体血の CRT 濃度は正常妊娠 に比べ PE で高かった(図 5B)。

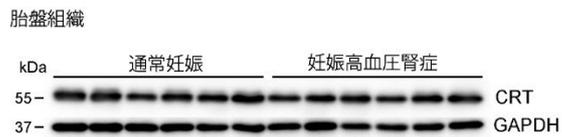


図 5A ヒト胎盤組織における CRT (WB)

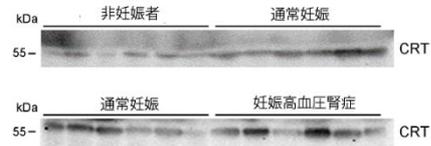


図 5B ヒト血清における CRT (WB)

(6) BeWo 細胞に小胞体ストレス誘導剤 thapsigargin (Tg) を添加したところ、培養上清中の CRT 濃度が上昇しており、CRT の細胞外分泌が確認された(図 6)。

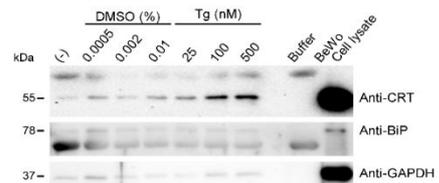


図 6 BeWo 細胞における Tg 処理による CRT 発現

(7) BeWo 細胞において、Tg 処理後培養上清の添加により forskolin 誘導性のシンシチウム化能および細胞外  $\beta$ -hCG 分泌が抑制された(図 7)。

(8) BeWo 細胞において、Tg 処理後培養上清から CRT を除去することにより、細胞外  $\beta$ -hCG 分泌が回復した(図 8)。

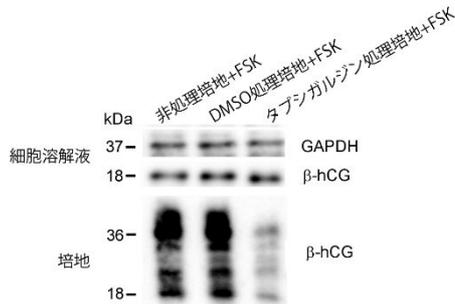


図 7 Tg 処理培養上清添加における forskolin 誘導性の細胞外  $\beta$ -hCG 分泌

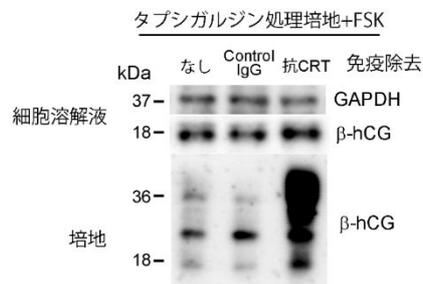


図 8 CRT 除去 Tg 処理培養上清添加における forskolin 誘導性の細胞外  $\beta$ -hCG 分泌

総括：BeWo 細胞において、小胞体ストレスにより CRT の細胞外分泌が誘導され、高 CRT が  $\beta$ -hCG 分泌抑制を引き起こした。以上より、CRT はシンシチウム化に影響し、妊娠高血圧腎症の病態に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Naoyuki Iwahashi, Midori Ikezaki, Ibu Matsuzaki, Madoka Yamamoto, Saori Toujima, Shin-ichi Murata, Yoshito Ihara, and Kazuhiko Ino	4. 巻 160
2. 論文標題 Calreticulin regulates syncytialization through control of the synthesis and transportation of E-cadherin in BeWo cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 359-374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2018-00868	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 Iwahashi Naoyuki, Ikezaki Midori, Nishitsuji Kazuchika, Yamamoto Madoka, Matsuzaki Ibu, Kato Naoki, Takaoka Naoyuki, Taniguchi Mana, Murata Shin-ichi, Ino Kazuhiko, Ihara Yoshito	4. 巻 10
2. 論文標題 Extracellularly Released Calreticulin Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Impairs Syncytialization of Cytotrophoblast Model BeWo Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1305 ~ 1305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10061305	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 串上遥香、岩橋尚幸、池崎みどり、山本円、井籠一彦、井原義人
2. 発表標題 細胞性栄養膜細胞（BeWo細胞）における小胞体ストレスとカルレティキュリンの影響
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池崎みどり、串上遥香、岩橋尚幸、山本円、西辻和親、井籠一彦、井原義人
2. 発表標題 細胞外カルレティキュリンによる胎盤関連細胞の機能障害
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩橋尚幸、山本円、池崎みどり、松川仁登美、井原義人、井籠一彦
2. 発表標題 妊娠高血圧腎症における母体血液中 Calreticulin の上昇の病態意義の検討
3. 学会等名 第40回日本妊娠高血圧学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoyuki Iwahashi, Madoka Yamamoto, Yoshito Ihara, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 Endoplasmic reticulum chaperone calreticulin plays a key role in human placental development.
3. 学会等名 70th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology International Session Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoyuki Iwahashi, Midori Ikezaki, Madoka Yamamoto, Yoshito Ihara, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 Endoplasmic reticulum molecular chaperone calreticulin plays a key role in human placentation.
3. 学会等名 International Federation of Placenta Associations (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩橋尚幸、池崎みどり、山本円、井籠一彦、井原義人
2. 発表標題 カルレティキュリンはヒト絨毛癌細胞株においてフォルスコリン誘導性のシンシチウム化に関与する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩橋尚幸、池崎みどり、山本円、井篁一彦、井原義人
2. 発表標題 カルレティキュリンはヒト絨毛癌細胞株(BeWo)においてE-カドヘリンの細胞表面への輸送に関与する
3. 学会等名 第65回近畿支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------