

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791139

研究課題名 (和文)

環境ストレス—胎盤形成—胎児 オートファジーとアポトーシスによる細胞死の視点から

研究課題名 (英文)

Clarification of relationship among Environmental stress, Placental construction and fetal growth, by analysis of autophagic cell death and apoptosis

研究代表者

中島 彰俊 (Nakashima Akitoshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：00436792

研究成果の概要:胎盤形成に重要な役割を果たす絨毛外栄養膜細胞が低酸素状態において母体への浸潤能が増加するが、その機能にオートファジーが大きく寄与することを世界に先駆けて初めて明らかにすることができた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジー (以下 AtP) とは、真核細胞に備わる大規模な細胞内分解系であり、飢餓応答や細胞の恒常性維持に重要な役割を担っていることが知られているが、昨今、AtP は細胞内環境の恒常性維持という細胞の生存面に関与する報告がある一方、細胞死にも関与するという幅広い役割を持つことが判明し、再度注目を浴びている。一方、妊娠とは胚の子宮内膜への着床に始まり、その後の胎盤形成と共に胎児を育む現象であるが、それらの発育の異常が流産、子宮内胎児発育遅延 (IUGR)、妊娠高血圧症候群 (PIH) に深く関与している事が知られている。アポトーシスが

生物の発生過程において重要であることは言うまでもないが、妊娠現象とオートファジーの関与を示す報告はこれまでほとんどなかった。

本研究におけるメインテーマである胎盤形成過程において、絨毛外栄養膜細胞 (以下 EVT 細胞) は母体面に浸潤する細胞であり、その浸潤の深さが他の哺乳類より深く母体面に浸潤するという特徴を持つ。また先述の IUGR や PIH では、EVT 細胞の不十分な浸潤が観察される。EVT の大きな機能的特徴であるこの浸潤能は、興味深いことに細胞生存に不利となる低栄養・低酸素環境という妊娠初期脱落膜において、積極的に母体面に浸潤して行く。それでは、なぜ死なずに浸潤できるの

か？この現象はヒトに特異的な点も興味深いものであるが、その機構は全くのブラックボックスであった。そこで、細胞生存に不利な環境でも細胞の恒常性維持する機構が必要なのではないか？と考えられた。

## 2. 研究の目的

オートファジーが妊娠現象に如何に関与するのか？EVT を中心として、細胞生存（あるいは細胞死）の制御に関与するのかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) 細胞：絨毛外栄養膜細胞の Cell line である HTR8/SV40-neo (以下 HTR8) および HC h E p C 1 b 細胞を譲渡され、使用した。また、絨毛外栄養膜細胞の Primary 細胞 (以下 Primary EVT) を分離した (同意を得た流産検体より)。  
 2) AtP の発生モニタリングおよびその抑制系：AtP の発生の確認には、局在パターンを変化させる分子 LC3 を使用した。具体的には、GFP を結合した GFP-LC3 発現アデノウイルスを用いることで高効率に LC3 を細胞導入可能となり、AtP を蛍光顕微鏡下に容易に可視化できる実験系を用いた。また、形態学的な確認として電子顕微鏡を用いた。AtP 抑制剤として、3-MA (methyladenine) および Wortomanin を投与し AtP 抑制できることを確認した。  
 3) セルラインの確立：薬剤による抑制系より特異的に AtP を抑制するため、AtP 発生に必須の Atg 4 B 分子の Dominant negative 分子を発現するレトロウイルスを用いて、恒常的に AtP を抑制する HTR8/4B-1 細胞を作成した。  
 4) 各種ストレスおよびサイトカイン刺激：低栄養は Hanks solution (アミノ酸枯渇) または低 Glucose 刺激を行い、低酸素は酸素 2% 濃度と同等となる CoCl<sub>2</sub> 濃度を用いた細胞刺激を行った。D) 細胞ストレス下における絨毛外栄養膜細胞の浸潤メカニズム：マトリゲルを用いてストレス下における細胞浸潤能を評価した。また、浸潤に重要な MMP の発現量を real time RT-PCR にて確認した。また、死細胞の増加は Propidium Iodide および Annexin V 染色にて Flow cytometry にて評価した。

## 4. 研究成果

① HTR8/SV40-neo 細胞および Primary EVT 細胞において AP が観察される：これまで低栄養状態 (Hanks solution: HS) 刺激が AtP 誘導することは知られていた。今回 HTR8 および Primary EVT 細胞共に低酸素 (以下 Hyx) および Glucose-free (以下 GF) 刺激においてそれぞれ AtP の発生が観察された。AtP の発生はタンパク発現でも LC3-II/LC3-I 比の増加

により確認できた (図 1)。

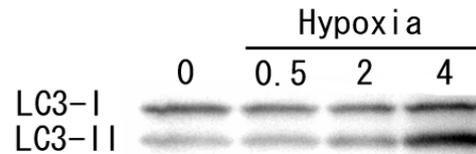


図 1 LC3 タンパク発現

さらに、HS 処理を行った HTR8 細胞を電子顕微鏡で観察したところ、AtP に特異的な構造物であるオートファゴソームおよびオートリソソームが観察された (図 2, 星)。

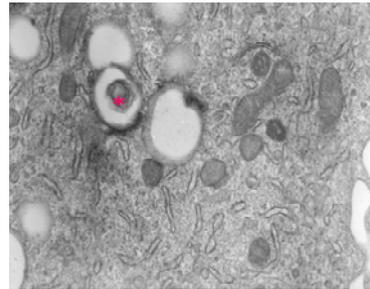


図 2 HTR8 の電子顕微鏡写真

これらの結果は、絨毛細胞で AtP が起こることを証明するものである。  
 ② AP 抑制剤 3-MA によって AtP の発生は有意に抑制される：低酸素および GF 刺激は、時間依存性に AP が増加し刺激後 24 時間で最も AtP の発生率が増加した。また、3-MA 処理により AtP の発生は有意に減少した。

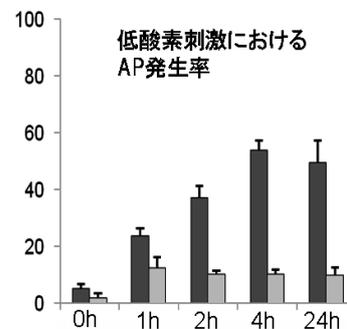


図 3 低酸素における AtP の発生細胞率

上図の如く、AtP は時間経過と共に増加する (黒棒)、3-MA 処理 (灰棒) により有意に AtP の発生が低下する (X 軸：低酸素処理時間、Y 軸：AP 発生細胞率)。3-MA による AtP 発生抑制は Hyx だけでなく HS 刺激および GF 刺激による AtP 発生も同様に抑制した。また、3-MA による毒性の検討において、24 時間の Hyx 処理では細胞増殖率の有意な抑制を認めなかった (図 3)。

③ オートファジーの抑制により絨毛細胞の浸潤能は抑制される：絨毛細胞は初期胎盤形成過程において、低酸素下で浸潤能が上昇す

ることが知られており, HTR8 細胞もその形質を持った細胞である (図 4) .

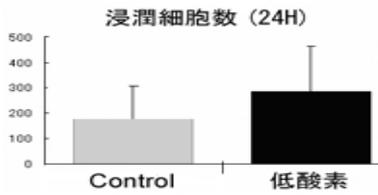


図 4 低酸素刺激による浸潤細胞数  
上記の如く, Hyx により浸潤細胞数が 1.63 倍に増加する. そこで, 結果②に用いた 3-MA を用いて AtP を抑制し同様の実験を行った.

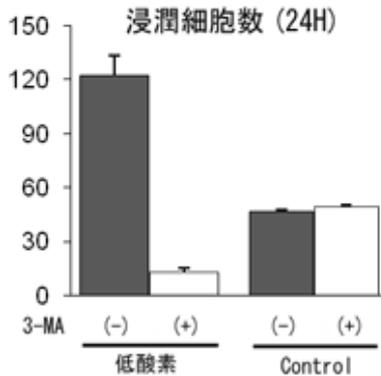


図 5 低酸素刺激時の浸潤細胞数 2 (3-MA 処理)  
上記の如く, 3-MA 処理により低酸素下での EVT の浸潤は有意に低下した. 一方, Control (non-stress) では, 3-MA による EVT 浸潤能への影響は認められなかった. 3-MA の毒性による EVT 細胞の浸潤能への影響が否定できないため, 恒常的に AtP を抑制する HTR8/4B-1 細胞を作成して同様の実験を行った (図 5).

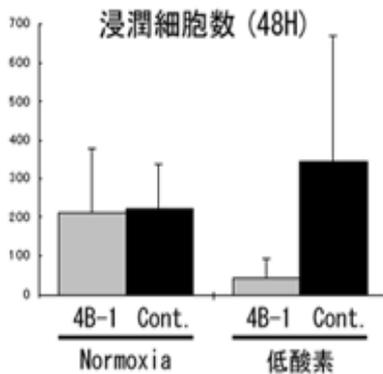


図 6 AtP 不応細胞の浸潤細胞数  
上記の如く正常酸素濃度 (左棒 2 本) では, AP 不応細胞 (4B-1: 灰棒) と対照細胞 (Cont.: 黒棒) の浸潤能に差を認めなかったが, 低酸素刺激 (右棒 2 本) により対照細胞の浸潤能が 1.53 倍に増加するのに対し, AtP 不応細胞では 0.19 と有意な低下を示した (図 6). また, 4B-1 およびそのコントロール細胞に低酸素刺激を加えたときの死細胞率には明らかな

差を認めなかった. この結果は, EVT 細胞の浸潤能は AtP によって支持されていることを示すものである.

④ 低酸素下において, AtP 不応細胞の MMP-2/MMP-9 発現は低下する: 浸潤能に関する因子として, マトリックス分解酵素に注目した. これまで低酸素下に MMP-2/MMP-9 の発現が上昇することは知られていたが, トロホブラストにおける AtP と MMP の関連の報告はない.

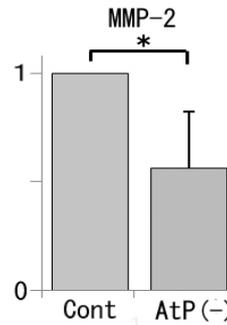


図 7 AtP 不応細胞における MMP 発現  
MMP-2 の mRNA 量を real time RT-PCR にて検討したところ, 上記の如く, 浸潤能の低下した AtP 不応細胞において有意に低下していた. また, MMP-9 および uPA の mRNA 量も有意に AtP 不応細胞で減少していた.

## 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 8 件)

① Nakashima A, Shiozaki A, Myojo S and Saito S, et. al. “Granulysin Produced by Uterine Natural Killer Cells Induces Apoptosis of Extravillous Trophoblasts in Spontaneous Abortion.” Am J Pathol. 173:653-664. 2008 査読: 有

② Hashimoto I, Koizumi K, Tatematsu M, Nakashima A, Saito S and Saiki I. et. al. “Blocking on the CXCR4/mTOR signalling pathway induces the anti-metastatic properties and autophagic cell death in peritoneal disseminated gastric cancer cells.” Eur J Cancer 44:1022-29 2008 査読: 有

③ Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A. “The balance

between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy.” J Reprod Immunol. 77:14-22. 2008 査読：有

④ Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Nakashima A, Shiozaki A. “Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia.” J Reprod Immunol. 76::30-9. 2007. 査読：有

⑤ Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. “The role of the immune system in preeclampsia.” Mol Aspects Med. 28:192-209. 2007. 査読：有

⑥ Saito S, Shiozaki A, Sakai M, Nakashima A, Shima T, Ito M. “Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in fetomaternal tolerance.” Semin Immunopathol. 29:115-22. 2007. 査読：有

⑦ Saito S, Shima T, Nakashima A, Shiozaki A, Ito M, Sasaki Y. “What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy?” J Assist Reprod Genet. 2007 Sep;24(9):379-86. 査読：有

⑧ Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Saito S, et. al. “Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer.” Cancer Sci. 98(6):874-81. 2007. 査読：有

[学会発表] (計4件)

① Tatematsu M, Nakashima A, Saito S. “Autophagy, bulk degradation system, promotes extravillous trophoblast invasion in low nutrient, hypoxia or hypoglycemic condition” 13th IFPA meeting 2008, 2008/9/10-13, Seggau Castle, Austria

② 立松美樹子, 中島彰俊, 齋藤滋 “オートファジーにより低酸素下、低栄養下の絨

毛外栄養細胞の浸潤能は亢進する” 第60回日本産科婦人科学会 2008/4/12-15 横浜 ” Good presentation賞”

③ Tatematsu M, Nakashima A, Saito S. “Autophagy, bulk degradation system, promotes extravillous trophoblast invasion in low nutrient, hypoxia or hypoglycemic condition” IFPA meeting 2007, 2007/8/17-22, Kingston, Canada

④ Nakashima A, Tatematsu M, Saito S. “Autophagy, bulk degradation system, promotes extravillous trophoblast invasion in low nutrient, hypoxia or hypoglycemic condition” 第14回世界絨毛性疾患会議 2007/11/11-14 Fukuoka, Japan “相馬賞”

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 彰俊 (Nakashima Akitoshi)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教  
研究者番号：00436792