

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591301

研究課題名（和文） 絨毛細胞の血管内皮様分化における細胞系列並びに分化誘導刺激の特異性に関する研究

研究課題名（英文） Investigation on cell specific mechanism in the tube-like differentiation in extra-villous trophoblast

研究代表者

福嶋恒太郎（FUKUSHIMA KOTARO）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：40304779

研究成果の概要（和文）：

本課題では絨毛細胞（EVT）の血管内皮様分化のメカニズムについて検討し、EVTと血管内皮はマトリゲルの刺激により同じ形態変化を示すがその機構は異なり、EVTでは正常酸素濃度においてもHIF1Aの発現および転写活性と分化能が相関していること、逆に活性酸素種のうちH₂O₂がEVTの細胞死や細胞分化に関わること、早発型妊娠高血圧症候群症例胎盤で活性酸素種が細胞障害をおこしていること、すなわち妊娠高血圧症候群の病態形成に単に酸素濃度のみならず虚血再灌流等により生じる活性酸素種も胎盤において関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated on cell specific mechanism in the tube-like differentiation in extra-villous trophoblast. As a result, the gene expression profile in EVT during tube formation is very different from that of endothelial cells despite these cells presented morphological change. HIF1A has a crucial role in regulating EVT behavior including matrigel-induced endovascular differentiation under normoxic condition. On the contrary, ROS produced by XO in hypoxia-reperfusion induced apoptosis and affected invasion ability and differentiation in EVT. M directly injures the placental syncytiotrophoblast in PIH patients and that elevated UA in PIH patients, at least partly, indicates placental damage induced by ROS. Moreover, the role and significance of ROS injury in the placenta may differ between early-onset and late-onset type PIH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：1) 絨毛細胞、2) 血管内皮様分化、3) 低酸素、4) 活性酸素種、5) 酸化ストレス、6) 妊娠高血圧症候群、7) 胎盤

1. 研究開始当初の背景

胎児由来の絨毛外トロフォブラスト(EVT)は、母体組織に分化・浸潤しながら母体血管内皮を置換し、免疫学的寛容と胎盤循環を確立する。この過程においてEVTに発現するHLA抗原やMMPが変化するとともにインテグリンサブユニットも $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ から $\alpha 1 \beta 1$ や $\alpha V \beta 3$ へと変化する。妊娠高血圧症候群や流産など妊娠維持機構が破綻した疾患で認められないことから、これらの分化マーカーの発現転換は正常な妊娠の成立と維持に重要な役割を有すると考えられている(Damsky, 1993; Genbacev, 1997; Zhou, 1997)。従ってEVTの細胞分化機構に関わる分子レベルで明らかにすることは、その妊娠成立維持に果たす生理的役割の解明に必須であるが、その制御機構は不明であった。

我々はヒト不死化EVT細胞TCL1を用いて、妊娠高血圧症候群患者血清には絨毛細胞障害因子が存在すること(Fukushima, 2001)、TNFがEVTのインテグリンの発現変化にかかわるとともに、細胞外マトリクス(ECM)との接着によるシグナルを介して、浸潤や細胞死などの分化調節に関与することを明らかにした(Fukushima, 2003)。TCL1は低酸素培養時や、マトリゲル上で血管内皮に特異的な形態変化(tube formation:右図)を示すが、この過程にも血管内皮細胞と同様に、VEGFやVEGF受容体と血管内皮特異的インテグリン $\alpha V \beta 3$ サブユニットが関わることを明らかにした(Fukushima, 2005)。妊娠高血圧症候群や流産での胎盤において、VEGFの発現調節に関わるHIF1Aの発現異常の報告(Zaumudio, 2007)があることから、EVTの血管内皮様分化にHIF1A遺伝子が関与していると考えられる。これらの遺伝子ならびに遺伝子産物の役割を検討していくことで、絨毛細胞の分化制御機構の詳細な解明が可能であり、妊娠現象や妊娠高血圧症候群等の病態解明につながる知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

そこで、本課題では

1) 絨毛細胞の血管内皮様分化である tube formation における、分化刺激(細胞外基質、低酸素) 特異性、細胞特異性を有する遺伝子の動的変化

2) 血管内皮様分化に重要なシグナル伝達経路、遺伝子機能

3) 臨床検体(疾患胎盤)での動態を明らかにすることで、絨毛細胞の分化なかでも血管内皮様分化のメカニズムとその調節およびその臨床的意義、血管内皮細胞との共通点や相違点を明確化すること、を目的とした。

3. 研究の方法

1) 絨毛細胞の血管内皮分化に重要な分子機構を明らかにするために、ヒト不死化絨毛細胞TCL1ならびにヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞HUV-EC-Cがともにマトリゲル上で示すtube-like formationにおける遺伝子変動についてマイクロアレイ法を用いて比較した。

2) 1)でEVTにおいて特異的に発現の変動を示したHIF1A遺伝子について、血管内皮様分化の過程におけるRNA、蛋白発現、転写活性とtube-like formationについて検討した。

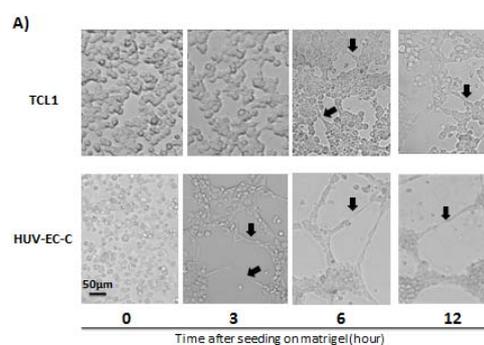


Figure 1

図1: TCL1、HUVECの示すTube-like Formationにおける形態変化の差 (Fukushimaら, Placenta 2008より引用)

3) 諸種の酸化ストレスがどのようにその表現形に影響を与えるか、細胞増殖、細胞浸潤、既知の絨毛細胞の分化に関わるタンパクの発現を指標として検討を行った。

4) 妊娠高血圧症候群胎盤におけるROSの関与を明らかにするために、活性酸素種による細胞障害で生じる8-OHdGについて、正常対照41例ならびにPIH患者27例において胎盤を染色し、その染色と臨床像を比較した。

4. 研究成果

1) マイクロアレイ法で、TCL1のtube formationにおいて有意な発現増幅・減少を示す遺伝子のうち血管内皮細胞において同様の変化を示す遺伝子は約10%とごく一部であることがわかった。すなわちEVTと血管内皮はマトリゲルの刺激により同じ形態変化を示すが細胞の種類によってその機構が異なっていることがわかった。

	Number of Up-regulated genes						Significant Up-regulation
	>3 fold			>5 fold			
	3hour	6 hour	both	3hour	6 hour	both	
TCL1	1415	1031	884	541	332	259	969
HUV-EC-C	91	348	39	8	51	3	86
Both	58	43	17	3	5	0	48*
(ratio to TCL1)	4.1%	4.2%	1.9%	0.6%	1.5%	0.0%	5.0%
	Number of Down-regulated genes						Significant Down-regulation
	<0.33 fold			<0.2 fold			
	3hour	6 hour	both	3hour	6 hour	both	
TCL1	1052	919	628	200	224	131	659
HUV-EC-C	258	121	36	35	5	1	85
Both	110	71	20	5	2	1	25**
(ratio to TCL1)	10.5%	7.7%	3.2%	2.5%	0.9%	0.8%	3.8%

Listed in Table 2A*, and 2B**

Table 1

表1: TCL1、HUVECの示すTube-like Formationにおける遺伝子変動の違い (Fukushimaら, Placenta 2008より引用)

Microarray	TCL1			HUV-EC-C	
	3hour	6hour	6hour	3hour	6hour
HIF1A	5.052	5.960		2.049	2.164
KRT8	5.531	5.164		1.222	1.556
HSP90	7.283	5.422		1.795	3.395
IL6	1.034	1.477		3.321	9.929
NFKBIA	1.617	2.138		6.327	5.761
CYR61	0.284	0.320		0.868	0.354

RT-PCR	TCL1			HUV-EC-C		
	0hour	3hour	6hour	0hour	3hour	6hour
GAPD						
HIF1A						
KRT8						
HSP90						
IL6						
NFKBIA						
CYR61						

Figure 2

図2: マイクロアレイ法で抽出された遺伝子変動のRT-PCR法による確認 (Fukushimaら, Placenta 2008より引用)

2) HIF1AはTCLの血管内皮様分化の過程でRNA、蛋白発現が上昇しており、その発現および転写活性とtube formation能が関連していることがわかった。このことから、絨毛の浸潤過程において寡能性EVTは細胞外基質や液性因子のみならず酸素濃度など周囲の環境を調節因子としてこれに適応するように分化していると考えられた。

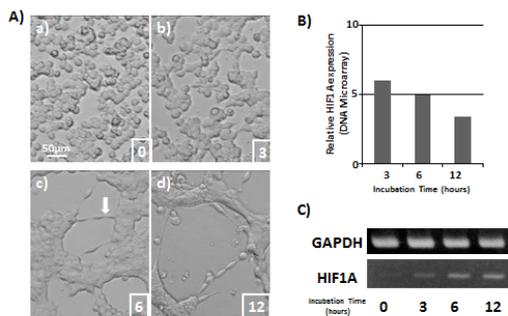


Figure 1

図3: TCLの示すTube-like Formationと

HIF1A遺伝子の、RNAならびにタンパク発現 (Fukushimaら, Placenta 2008より引用)

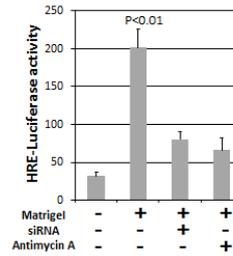


Figure 3

図3: HIF1A転写活性とTube-like Formationの相関 (Fukushimaら, Placenta 2008より引用)

3) Xanthine (X)、Xanthine oxidase (XO)、細胞数、細胞浸潤能、細胞分化に関連する遺伝子、遺伝子産物発現について検討した結果、X+XO添加時には容量依存的に培養上清中の尿酸値が上昇し、これに伴い接着細胞数が減少し、細胞浸潤能も低下した。タネル法ではこの細胞減少はアポトーシスによるものであった。阻害剤であるcatalase、アロプリノールを添加したところ、この細胞数減少ならびに細胞死はアロプリノールならびにcatalase添加で抑制されたがSOD添加では抑制されなかった。H2O2を培養上清中に加えたところ、X, XO添加時と同様にTCL1細胞にアポトーシスが誘導された。

以上のことから、XOが産生するROSはヒトEVT細胞株にアポトーシスを誘導し、細胞浸潤能や細胞分化を抑制すること、これらの影響は主としてH2O2により惹起されることが示された。このことは、妊娠高血圧症候群の病態形成においては胎盤局所でも単に酸素濃度のみならず虚血再灌流等によるROSが関与することを示唆すると考えられた。

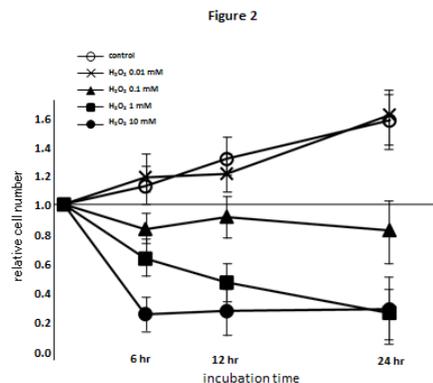


Figure 2

図4: X/XO添加による細胞増殖の抑制と阻害

剤の効果 (Murata, Fukushimaら, 投稿中より引用)

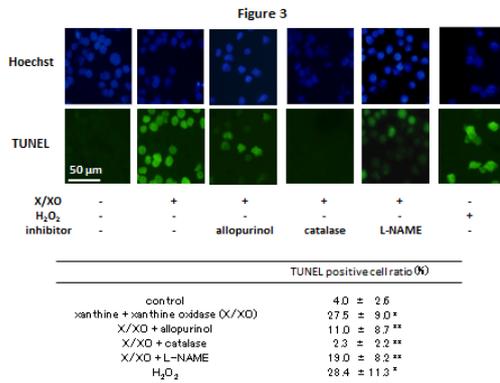


図5: X/XO添加によるアポトーシスと阻害剤の効果 (Murata, Fukushimaら, 投稿中より引用)

4) 8OHdGは、胎盤の合胞体絨毛細胞がPIH症例では年齢や妊娠背景の一致する対照例に比し有意に陽性に染色されていた。PIH症例のなかで、8OHdG陽性例は陰性例に対し、妊娠中の血中尿酸値が高値で分娩週数が早く早発型の割合が多かった。

Table 2: Comparison of clinical profiles between placental 8OHdG positive and negative preeclamptic patient

	Positive (n=9)	P-value	Negative (n=18)
Age	33 (26-43)	0.140	35 (31-45)
Parity	0 (0-2)	0.789	0 (0-4)
Primigravidity	3 (33.3%)	0.208	4 (22.2%)
Severe preeclampsia	6 (66.7%)	0.237	7 (38.9%)
superimposed	1 (11.1%)	>0.999	3 (16.7%)
Early onset	7 (77.8%)	0.012	4 (22.2%)
Gestational week at delivery	30.1 (25.3-35.7)	<0.001	35.6 (25.9-40.3)
Maternal Serum Uric acid (mg/dl)	7.0 ± 1.4	0.032	5.9 ± 1.1
BUN	13.8 ± 5.3	0.273	12.1 ± 2.8
creatinine	0.64 ± 0.11	0.269	0.60 ± 0.08
Deviation from mean birth weight	-2.76 ± 0.69	0.150	-2.08 ± 1.28
SGA	6 (66.7%)	0.208	10 (55.6%)
Cord blood pH	7.27 ± 0.07	0.784	7.28 ± 0.07
Acidosis (pH<7.2)	3 (33.3%)	0.093	1 (5.6%)

Data are presented median (range) or mean ± S.D.

表2: 8OHdG陽性、陰性のPIH症例の周産期予後の比較 (Fukushimaら, Am J Hypertens 印刷中より引用)

Figure 2: Maternal serum uric acid and gestational age at delivery in placental 8OHdG positive and negative preeclamptic patients

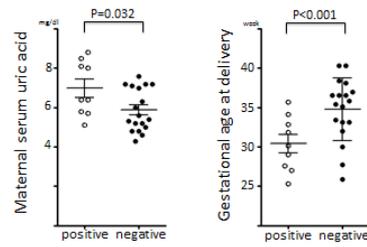


図6: 8OHdG陽性、陰性のPIH症例における分娩週数と血中尿酸値 (Fukushimaら, Am J Hypertens, 印刷中より引用)

つまり、in vitroで得られた解析の通り、臨床検体においても、胎盤において虚血再灌流障害は活性酸素種を介して直接絨毛細胞を障害する可能性があること、この障害は早発型の妊娠高血圧症候群の病態に関連する可能性があることを示すと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

Fukushima K, Murata M, Hachisuga M, Tsukimori K, Seki H, Takeda S, Asanoma K, Wake N. Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Regulates Matrigel-induced Endovascular Differentiation under Normoxia in a Human Extravillous Trophoblast Cell Line. Placenta. 2008;29(4):324-31.

Tsukimori K, Tsushima A, Fukushima K, Nakano H and Wake N Neutrophil-derived Reactive Oxygen Species Can Modulate Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells in Preeclampsia. Am J Hypertens 2008; 21:587-591

Fukushima K, Murata M, Hachisuga M, Tsukimori K, Seki H, Takeda S, Kato K, Wake N. Gene Expression Profiles by Microarray Analysis during Matrigel-induced Tube Formation in a Human Extravillous Trophoblast Cell line: Comparison with Endothelial Cells. Placenta 29 (2008) 898-904

Tsukimori K, Yoshitomi T, Morokuma S, Fukushima K, Wake N. Serum uric acid levels

correlate with plasma hydrogen peroxide and protein carbonyl levels in Preeclampsia. Am J Hypertens 2008;

Fukushima K, Murata M, Tsukimori K, Kaneki E, Wake N. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine staining in placenta is associated with maternal serum uric acid levels and gestational age at diagnosis in preeclampsia. Am J Hypertens, in press

村田将春、福嶋恒太郎、関博之、竹田省、和氣徳夫ほか

Xanthine oxidase が産生する活性酸素種はヒト不死化絨毛外絨毛細胞(EVT)由来細胞株のアポトーシスを誘導する 日本妊娠高血圧学会雑誌 なし 2009(17) 240-241

福嶋恒太郎, 村田将春, 月森清巳, 和氣徳夫 絨毛細胞の分化機構と妊娠高血圧症候群 産婦人科の実際 59 巻 7 号 Page1043-1050, 2010

〔学会発表〕(計5件)うち招待講演計(1)件

村田 将春、福嶋恒太郎 ほか マイクロアレイ法を用いた胎盤絨毛外トロフォブラストの分化に関わる遺伝子のスクリーニング第 60 回 日本産科婦人科学会学術講演会平成 20 年 4 月 12 日 横浜市

福嶋恒太郎ほか、絨毛外トロフォブラストの血管内皮様分化制御機構 第 16 回 日本胎盤学会シンポジウム 平成 20 年 11 月 13 日浜松市

村田将春, 福嶋恒太郎, 月森清巳, 関博之, 竹田省, 和氣徳夫 Xanthine oxidase が産生する活性酸素種はヒト不死化絨毛外絨毛細胞(EVT)由来細胞株のアポトーシスを誘導する 第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術集会平成 21 年 4 月 3 日京都市

村田将春, 福嶋恒太郎, 月森清巳, 関博之, 竹田省, 和氣徳夫 Xanthine oxidase が産生する活性酸素種はヒト不死化絨毛外絨毛細胞(EVT)由来細胞株のアポトーシスを誘導する 日本妊娠高血圧症候群学会 平成 21 年 8 月 29 日 岡山市

村田将春、福嶋恒太郎、関博之、竹田省、和氣徳夫 Xanthine oxidase が産生する活性酸素種はヒト不死化絨毛外絨毛細胞(EVT)由来細胞株のアポトーシスを誘導する 第 17 回日本胎盤学会学術集会 平成 22 年 10 月 17 日 東京都

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福嶋恒太郎 (FUKUSHIMA KOTARO)

研究者番号: 4024397

(2)研究分担者

月森 清巳

研究者番号: 4024397