

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20599006

研究課題名(和文)

妊娠高血圧症候群の病態機序へのスフィンゴシン1リン酸の関与の解明と治療への応用

研究課題名(英文)

Involvement of sphingosine-1-phosphate (S1P) in the pathogenesis of preeclampsia

研究代表者

小谷 友美 (KOTANI TOMOMI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70359751

研究成果の概要(和文)：

妊娠高血圧症候群の病態の第1段階は、絨毛外栄養膜細胞(extravillous trophoblast, EVT)の浸潤障害であると考えられている。これにより胎盤低形成がおこり、子宮内胎児発育遅延が起きるとされる。しかし、その分子学的機序は未解明なところが多い。本研究では、細胞増殖や浸潤に関与する生理活性物質として知られるリゾリン脂質の2つの主要物質スフィンゴシン1リン酸(S1P)およびLysophosphatidic acid(LPA)に着目し、EVTの浸潤に相反する作用を持っていることを証明した。これらをターゲットとして妊娠高血圧症候群の新たな治療法の開発の可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

The first step of the pathogenesis of preeclampsia is thought to be the failure of fetus extravillous trophoblasts (EVT) invasion into maternal decidua. It is suggested to be resulted in shallow placentaion, followed by intrauterine growth retardation. However, the molecular mechanisms remain unclear. In this study, we found that shingosine-1-phosphate (S1P) and lysophosphatidic acid (LPA), which are main lysophospholipids known as a chemical mediator of cell proliferation and motility, would be involved in the invasion of EVT. These would be targets for the new therapy of preeclampsia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	0	1,400,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

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：EVT、脱落膜、SphK、細胞浸潤、LPA

1. 研究開始当初の背景

現在では、妊娠高血圧症候群は絨毛外栄養膜細胞(extravillous trophoblast, EVT)の母体脱落膜への浸潤不全によって発症すると

いう説が有力であるがそのメカニズムは未だ明らかではない。また、妊娠高血圧症候群は未だに妊娠終結以外確実な効果の得られる治療法はなく、母児ともに重篤な転帰がと

ることも多く、病態解明および妊娠継続可能な新規治療法の確立が急がれる重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究においては、妊娠高血圧症候群の病態へのリズリン脂質のひとつ、スフィンゴシン1リン酸(S1P)の関与を証明し、S1P受容体をターゲットとした新しい治療法を提示することを目的としている。本研究では、EVT浸潤機構におけるS1Pの直接作用についてその分子機構まで解明する。また、S1Pの主な供給源は血球系であるとされているが、本研究では、脱落膜のスフィンゴシンキナーゼ(SphK)により合成されたS1PがEVTをパラクラインに刺激しその浸潤を調節しているという仮説を証明する。

3. 研究の方法

(1) S1Pの正常胎盤形成における生理的役割の検討；

以下の項目につき検討した。

- ・妊娠初期子宮筋—脱落膜—胎盤組織切片の免疫組織染色。
- ・当院倫理委員会の承認のもと、正常妊娠初期に人工妊娠中絶を施行した患者からのインフォームドコンセント得た上で得られた絨毛を使用した初代EVT培養をもちいて、発現するS1P受容体のサブタイプの同定。
- ・初代EVT培養において、S1P刺激によるoutgrowthの変化(EVT発育)の検討。
- ・EVT細胞株HTR-8/SVneo細胞を用いて、S1Pをchemoattractantとして刺激してtranswellを使用したmigrationおよびinvasion assay。
- ・HTR-8/SVneo細胞をS1P刺激し、MTS assayによる増殖能。
- ・妊娠初期脱落膜の初代細胞培養を施行し、低酸素培養下でSphKの発現の検討。

(2) Lysophosphatidic acid (LPA)のEVT浸潤への効果；生理活性物質として機能するもうひとつのリズリン脂質にも注目し、以下の項目につき検討した。

- ・初代EVT培養、および、HTR-8/SVneo細胞に発現するLPA受容体サブタイプの同定。
- ・EVT細胞株HTR-8/SVneo細胞を用いて、LPAをchemoattractantとして刺激してtranswellを使用したmigrationおよびinvasion assay。Gi抑制剤(百日咳毒素のつ使用)。
- ・HTR-8/SVneo細胞をLPA刺激し、MTS assayによる増殖能。
- ・初代EVT培養、および、HTR-8/SVneo細胞にLPA刺激し、Akt, ERK, PLCなどのシグナル伝達系の解明。

- ・HTR-8/SVneo細胞をLPA刺激し、IL-6、IL-8分泌の証明。

(3) LPAとS1PのEVT浸潤および胎盤形成への役割；LPAとS1PをEVTに同時に作用した際の効果につき以下の項目につき検討した。

- ・S1P作用とLPA作用とS1P+LPA併用した場合の初代EVT細胞のoutgrowthへの効果。
- ・S1P作用とLPA作用とS1P+LPA併用した場合のHTR-8/SVneo細胞の浸潤能への効果。
- ・S1P作用とLPA作用とS1P+LPA併用した場合のHTR-8/SVneo細胞のEVT浸潤のkey factorであるMMP、uPAの発現。

4. 研究成果

(1) S1Pの正常胎盤形成における生理的役割の検討；

- ・妊娠初期子宮筋—脱落膜—胎盤組織において、脱落膜にSphKの局在を認めた。
 - ・EVTにはS1P受容体1, 2, 3, 4, 5の発現を認めた。
 - ・HTR-8/SVneo細胞の、S1Pをchemoattractantとした遊走能、浸潤能には抑制効果を認めたが、大きな効果ではなかった。また、増殖能には変化を認めなかった。
 - ・1%低酸素培養下で20%酸素培養下に比べSphKの発現が亢進していた。
- これらの発見は低酸素環境で脱落膜でのSphK発現増加、S1Pの発現亢進が、EVT浸潤に関与していることを示唆している。

HTR-8/SVneo細胞における亢進を認めたuPA, MMP-2, 9は、S1P添加により、コントロールレベルにまで抑制された。

(2) Lysophosphatidic acid (LPA)のEVT浸潤への効果；

- ・EVTはLPA受容体サブタイプ1-6の発現を認めた。
 - ・LPAはEVTの遊走能、浸潤能を亢進したが、増殖能には影響を与えなかった。
 - ・LPAのEVTの遊走能、浸潤能の亢進効果は、Gi抑制剤の使用により解除されたことから、Giを介する系が関与していることが示唆された。
 - ・LPAのGi蛋白の下流のAkt, ERK, PLCのリン酸化は亢進しており、これらの阻害剤により、有意に浸潤能は抑制された。
 - ・Gi蛋白を介さない系で、STAT-3のリン酸化の亢進も認めた。
 - ・LPA刺激により、Gi蛋白を介する系でのIL-6の亢進を認めた。IL-8は変化しなかった。
- 以上の結果より、LPAはGi蛋白を介し、各種シグナル伝達系を活性化し、EVTの浸潤能を亢進していることが明らかになった。

(3) LPAとS1PのEVT浸潤および胎盤形成への役割；

- ・S1PはLPAのEVT浸潤促進作用および

outgrowth 促進作用を抑制した。

・S1P は LPA の uPA, MMP-2, 9 の活性型の発現の亢進を抑制した。

(4) まとめ

ヒト EVT 浸潤機構において、同じリゾリン脂質である S1P は LPA の浸潤亢進効果を抑制する作用を有していた。これは、EVT 浸潤不全に始まるとされる妊娠高血圧症候群の病態形成にこれらの物質が関与している可能性を示唆している。

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 6 件)

- ① Tsuda H, Takahashi Y, Iwagaki S, Uchida Y, Kawabata I, Hayakawa M, Sumigama S, Hayakawa H, Kotani T, Kikkawa F. Amniotic lamellar body counts can predict the occurrence of respiratory distress syndrome as well as transient tachypnea of the newborn (TTN). *J Perinat Med*. 査読有、2011、[Epub ahead of print]
- ② Iwase A, Goto M, Manabe S, Hirokawa W, Kobayashi H, Nakahara T, Takikawa S, Kotani T, Sumigama S, Tsuda H, Nakayama T, Suzuki N, Matsushita T, Kikkawa F. Successful fertility management of a patient with factor V deficiency: planned transfusion of fresh frozen plasma under infertility treatment. *Fertil Steril*. 査読有、2011、[Epub ahead of print]
- ③ Kotani T, Sumigama S, Hayakawa H, Mano Y, Tsuda H, Sugiyama C, Kawachi F, Hironaka M, Kato T, Kaneko K, Hayakawa M, Kikkawa F. Elevated levels of aldosterone in the amniotic fluid in two cases of congenital mesoblastic nephroma. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 査読有、2010、36(2):256-8.
- ④ Tsuda H, Takahashi Y, Iwagaki S, Kawabata I, Hayakawa H, Kotani T, Shibata K, Kikkawa F. Intra-amniotic infection increases amniotic lamellar body count before 34 weeks of gestation. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 査読有、2010、23(10):1230-6.

- ⑤ Morimitsu A, Sumigama S, Kotani T, Mano Y, Suzuki K, Araki-Taguchi M, Yamamoto E, Hayakawa H, Okada M, Itakura A, Kikkawa F. Histamine stimulates interleukin-6 production through histamine H1 receptors in human amnion cells. *Gynecol Obstet Invest*. 査読有、2010、69(1)、67-72.

- ⑥ Kotani T, Iwase A, Ino K, Sumigama S, Yamamoto E, Hayakawa H, Nagasaka T, Itakura A, Nomura S, Kikkawa F. Activator protein-2 impairs the invasion of a human extravillous trophoblast cell line. *Endocrinology*. 査読有、2009、150(9)、4376-85.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 小谷友美ら、第 16 回日本胎盤学会学術集会ならびに第 26 回日本絨毛性疾患研究会、スフィンゴシン 1 リン酸キナーゼの妊娠初期絨毛脱落膜系での発現について、平成 20 年 11 月 14 日、浜松 (アクトシティ浜松コンgresセンター)
- ② 小谷友美ら、第 61 回日本産婦人科学会学術講演会、重篤な経過をたどった子宮内膜症合併妊娠の 2 例、平成 21 年 4 月 5 日、京都 (国立京都国際会館)
- ③ 小谷友美ら、第 45 回日本周産期・新生児医学会学術集会、羊水過多、胎児心不全を呈した Congenital Mesoblastic Nephroma の 2 症例、平成 21 年 7 月 14 日、名古屋 (名古屋国際会議場)
- ④ 小谷友美ら、転写因子 AP-2 は絨毛膜外絨毛細胞の浸潤は抑制する、第 30 回日本妊娠高血圧学会学術集会、平成 21 年 8 月 29 日、岡山 (岡山コンベンションセンター)
- ⑤ Tomomi Kotani et al, 15th IFPA Conference, workshop, Lysophosphatidic acid regulated the migration of EVT cell line, HTR-8/SVneo, 平成 21 年 10 月 7 日、Australia, Adelaide
- ⑥ 小谷友美ら、第 17 回日本胎盤学会学術集会ならびに第 27 回日本絨毛性疾患研究会、HTR-8/SVneo 細胞機能における LPA の役割、平成 21 年 10 月 17 日、東京 (東京ミッドタウン・カンファレンス)
- ⑦ 小谷友美ら、Lysophosphatidic acid による絨毛細胞の遊走作用、第 62 回日本産

婦人科学会学術講演会、平成 22 年 4 月 25 日、東京（東京国際フォーラム）

- ⑧ 小谷友美ら、妊娠経過中に発見された腰骨骨肉腫の 1 例、第 46 回日本周産期・新生児医学会学術集会、平成 22 年 7 月 12 日、神戸（神戸国際会議場）
- ⑨ 小谷友美ら、Marfan 症候群合併妊娠で妊娠中に Stanford B 型急性大動脈解離をきたした 1 例、第 33 回日本母体胎児医学会学術集会、平成 22 年 8 月 29 日、東京（京王プラザホテル）
- ⑩ 小谷友美、リンパ管の異常形成を伴う Placental Mesenchymaldysplasia (PMD) により IUGR に至ったと考えられた 1 例、第 18 回日本胎盤学会学術集会ならびに第 28 回日本絨毛性疾患研究会、平成 22 年 10 月 1 日、熊本（ホテル日航熊本）
- ⑪ 小谷友美ら、第 31 回日本妊娠高血圧学会学術集会、妊婦における CAVI の検討、平成 22 年 10 月 16 日、市ヶ谷（日本大学生会館）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/research/obstetrics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 友美 (KOTANI TOMOMI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70359751

(2) 研究分担者 なし

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

研究者番号：