

平成22年6月6日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008年度～2009年度  
 課題番号：20791160  
 研究課題名（和文） 絨毛内細胞内 Heme Oxygenase-1 制御系の解明並びに胎盤免疫染色法の解発  
 研究課題名（英文） Analysis for control systems of heme oxygenase-1 in human villus cells and development for immunohistochemical staining of heme oxygenase-1 in human placenta  
 研究代表者  
 鈴木 寛正（Suzuki Hirotsada）  
 自治医科大学・医学部・助教  
 研究者番号： 90406116

## 研究成果の概要（和文）：

胎盤を形成する絨毛細胞である primary human trophoblast と絨毛細胞癌の cell line である BeWo 細胞を用いて、HO-1 の合成抑制物質である ZnPP 投与下に培養し、soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) と soluble endoglin (sEng) の発現変化を RT-PCR を用いて確認したが、いずれも mRNA のレベルでは、変化を認めなかった。

また、ヒト胎盤組織を用いた HO-1 の蛍光免疫染色は、ヒト胎盤組織の収集中であり、現在検討中である。

## 研究成果の概要（英文）：

We cultured primary human trophoblast or BeWo cell with ZuPP (heme oxygenase-1 inhibitor) and analyzed the mRNA levels of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and soluble endoglin (sEng) by RT-PCR. These mRNA levels did not change.

We are now collecting human placenta tissues. In future, we will try immunohistochemical staining of heme oxygenase-1 in these placenta tissues.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：産科学

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症（preeclampsia:以下 PE）は血管内皮障害がこの病態を起こしている

主な因子と考えられており、2つの可溶性血管新生抑制因子 soluble fms-like tyrosine kinase-1(以下 sFlt-1) と soluble

endoglin(以下 sEng)が PE の発症前 (sFlt-1:5 週 (Levine et al., 2004 N Engl J Med), sEndoglin:8 から 12 週) より増加している、内皮障害を起こす原因物質と考えられている。ラットに recombinant sFlt-1 や VEGF 中和抗体を投与すると腎の糸球体内皮細胞傷害を起こし、蛋白尿を認めたり、妊娠ラットに sFlt1 発現アデノウイルスベクターを投与すると PE に似た症状を呈する (Maynard et al., 2003 J Clin Invest) ことも報告されている。また sEng 発現アデノウイルスベクターを sFlt-1 発現アデノウイルスベクター共に投与するとより重症の症状を呈することも報告されている。

一方これらの因子を抑制する物質として heme oxygenase-1 (以下 HO-1) が注目されつつある。これはニコチンアミドアデノシンジヌクレオチドフォスフェイト (NADPH) cytochrome p450 reductase を触媒する小胞体結合酵素であるが、抗炎症作用、抗酸化作用をもち、虚血再還流傷害に対する保護作用を持つ。

正常妊婦に比べ、PE 妊婦では胎盤での HO-1、-2 発現が低いことが報告されており、また内皮細胞に HO-1 発現アデノウイルスベクターを transfect すると sFlt-1, sEng の発現が抑制され、逆に HO-1 siRNA にて増加し、胎盤組織で HO 合成抑制物質を投与すると sFlt-1, sEng 分泌が増加したことも報告されており、PE の病態解明やその治療のターゲットとして大切な物質である可能性が非常に高い。

## 2. 研究の目的

PE では胎盤での HO-1 産生が低下している。一方、血管内皮細胞では、HO-1 の低下により 2 つの可溶性血管新生抑制因子 sFlt-1, sEng の産生が増加することが知られているが、in vitro での絨毛細胞を用いた検討はまだ行われていない。本研究では、in vitro において primary human villous trophoblast, HUVECs での HO-1 による sFlt-1/sEng 制御の存在、逆に sFlt-1/sEng による HO-1 制御の可能性を検討する。また、PE 胎盤での HO-1 の免疫染色はすでに報告があるが、蛍光免疫染色での検討が行われていない。本研究では、ヒト妊娠高血圧症候群症例における胎盤での蛍光免疫染色法を新たに開発し、HO-1 発現解析を行う。

## 3. 研究の方法

まず、primary human villous trophoblast はすでに当教室で購入してあり、これを使

用する。HUVECs を購入し、この 2 つの細胞をそれぞれ 80% から 90% コンフルエントまで培養後、HO-1 合成抑制物質 (SnPP) を、24 時間投与した時の sFlt-1, sEng の発現変化を cell lysate を用いて RT-PCR, real time PCR にて確認する。なお、primer は sFlt-1 が sense: 5'-CATCACTCAGCGCATGGCAA-3', antisense: 5'-CAGCCTTTTTGTTGCAGTGC-3' にて作成する。また sEng は sense: 5'-CACAGGATAAGGCCAGCGCAC-3', antisense: 5'-TCAGGCCTTTGCTTGTGCAACC-3' にて作成する。real-time PCR は Applied Biosystem 7300 real time PCR system を使用する。また各培養血清において sFlt-1, sEng の ELISA (R&D 社) を用いて濃度を比較検討する。

次にこの 2 つの細胞をそれぞれ 80% から 90% コンフルエントまで培養後、24 時間 starve し、recombinant HO-1 protein を投与し 12 時間後に cell lysate、培養上清を回収し上記と同様に sFlt-1, sEng の発現変化を PT-PCR, real time PCR, ELISA にて確認する。

また逆にこれら 2 つ細胞をそれぞれ 80% から 90% コンフルエントまで培養後、24 時間 starve し、recombinant sFlt-1 protein または recombinant Endoglin protein 12 時間投与した時の HO-1 の発現変化を cell lysate において PT-PCR, real time PCR, Western blotting を用いて比較検討する。なお HO-1 の primer は sense: 5'-TGGTGATGGCCTCCCTGTACCACATCT-3', antisense: 5'-AGAGCTGGATGTTGAGCAGGAACGCAGTCT-3' にて作成する。

自治医科大学附属病院での経膈分娩または帝王切開術にて分娩し、本研究に協力が得られた妊娠 25 週から 40 週までの正常妊婦症例または、妊娠高血圧腎症妊婦症例の胎盤を利用させていただき、凍結標本を作製する。抗 HO-1 抗体、抗 CD31 抗体 (内皮細胞染色)、抗 HLA-G 抗体 (trophoblast 染色) を使って二重蛍光免疫染色を行い、胎盤組織での HO-1 の蛍光免疫染色法を開発する。そして、HO-1 の発現部位の同定、量的変化の検討を行う。

## 4. 研究成果

胎盤を形成する絨毛細胞である primary human trophoblast を用いて、HO-1 の合成抑制物質である ZnPP 投与下に培養し、sFlt-1 と sEng の発現変化を RT-PCR を用いて確認したが、いずれも mRNA のレベルでは、変化を認めなかった。このため、絨毛細胞癌の cell line である BeWo 細胞を理化学研究所より購入し、同様な実験系を用いて行ったが、い

いずれもmRNAのレベルでは、変化を認めなかった。

また、ヒト胎盤組織を用いたHO-1の蛍光免疫染色については、当研究機関の倫理委員会の許可を得ており、現在協力を得られた患者からのヒト胎盤組織の収集中である。採取後検討する予定である。

#### 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)

なし

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 寛正 (Suzuki Hirotada)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90406116

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: