

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591423

研究課題名（和文） 胎児羊膜系が関与する妊娠維持機構の解明

研究課題名（英文） Roles for components of the feto-amniotic unit in maintaining pregnancy

研究代表者

石本 人士 (ISHIMOTO HITOSHI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10212937

研究成果の概要（和文）：

本研究により、糖質・鉱質ステロイド産生に関与する因子の ontogenic な層別の発現挙動等から、これらの因子がヒト胎児副腎外層のステロイド産生開始に関与していることが強く示唆された。また羊水-羊膜系では、ヘパリン結合成長因子であるミッドカインが胎児肺由来の「胎児シグナル」として羊膜に作用し、COX2 発現抑制を介してプロスタグランディン E2 産生を制御し妊娠中期の妊娠維持に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Our results demonstrate that factors that mediate the steroid-producing machinery in the outer zone of the human fetal adrenal gland (HFA), show zonal and/or ontogenic expression patterns relevant to the *in vivo* occurrence of cortisol and aldosterone synthesis at the periphery of the HFA in late gestation. Results also show that midkine, a heparin-binding growth factor, is likely secreted from the fetal lung into the amniotic fluid, and can suppress amniotic production of prostaglandin E2 via COX2 down-regulation, indicative of its role as a fetal signal for maintaining pregnancy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：羊膜、胎児、副腎、羊水、コルチゾール

1. 研究開始当初の背景

あらゆる胎生動物において在胎期間は種特異的に正確に決まっているが、これはその種において母体が分娩を安全に遂行することができ、かつ児が胎外生活を開始する上での最良のタイミングが決まっているということを意味する。「胎児由来のシグナル」によ

り胎期間、言い換えれば分娩のタイミングが決定されるとする「胎児シグナル説」は、胎児の成熟の終了が分娩のタイミングを決めるという点で極めて合理的であり、ヒトのように少ない数の同胞が一回の分娩で産まれる場合には、個々の児の生存にとって有利となる。羊においては、コルチゾールが胎児

諸臓器の成熟と分娩発来をシンクロナイズさせる重要な胎児シグナルであることが Liggins らの精力的な研究以来明らかとなった。つまり妊娠末期に胎仔視床下部下垂体副腎系の成熟により胎児血中で増加したコルチゾールが、胎盤のプロゲステロン産生減少とエストロゲン産生増加をもたらし、これが trigger となって陣痛が発来する。ヒトにおいても胎児副腎由来のコルチゾールは分娩末期に増加する。コルチゾールは視床下部においては CRH の産生を negative-feedback 機構により抑制するが、ヒト胎盤においては逆にコルチゾール産生を増加させる。CRH は胎児血中に入り下垂体において ACTH 産生を促進し副腎に作用する。我々の海外共同研究者である Jaffe 教授のグループは、CRH が胎児下垂体を介してではなく直接副腎に働き、副腎性アンドロゲン DHEAS やコルチゾール産生を促進することを示した。すなわち胎盤 CRH 産生と胎児副腎コルチゾール産生の直接的、間接的な positive-feedback 機構が成立することとなり、これが分娩発来機構のエンジンとなり得る (Smith R, *N Engl J Med*, 2007)。

コルチゾールは妊娠中期以降に胎児副腎で主に産生される。我々はこれまでに海外共同研究者と共に、ヘパリン結合性成長分化因子に属する midkine (MK) がヒト妊娠中期胎児副腎に高発現しており、前駆細胞のプールと考えられる外層由来の細胞のみに増殖活性を示すことを明らかにした (Ishimoto H et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006)。コルチゾールは妊娠中期まで胎児副腎においてその産生が抑制されているが、これは主に key enzyme である HSD3B2 の発現が抑制されていることによる。当研究室と海外共同研究者のデータから、MK はヒト胎児副腎細胞において胎児副腎の主要調節因子である ACTH の受容体 (ACTHR) や HSD3B2 の発現を量依存的に抑制することが判明した (2006, 2007 年米国内分泌学会にて発表)。この機序については十分に明らかではないが、近年の研究で HSD3B2 発現調節に核内受容体蛋白である NGFI-B ファミリーの関与が明らかとなってきており、本研究ではこの観点から海外共同研究者と共に MK による HSD3B2 発現抑制機構、言い換えれば、MK のコルチゾール産生抑制を介した妊娠維持機構にアプローチする。

また近年の研究において羊膜には糖質コルチコイド活性化酵素である HSD11B1 が存在しており、これによってコルチゾールが不活性型のコルチゾンから産生されることが明らかとなってきた (Alfaidy N et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003)。興味深いことに羊膜 HSD11B1 は妊娠経過とともに発現が増加するので、妊娠末期に羊膜局所におけるコルチゾールの産生を促し、分娩発来機構の中に

あって促進因子として働いている可能性も示唆される。

一方、羊水・羊膜が母体と胎児の接点として妊娠維持、裏返して言えば分娩発来のシグナルの行き交うコミュニケーションの場になっていることが次第に明らかになりつつある。本邦ではすでに佐川らにより (日本産科婦人科学会雑誌, 1994) 羊水中の胎児由来物質が妊娠維持に関与している成績が示されているが、近年 Condon らにより、成熟したマウス胎仔肺由来のサーファクタント蛋白 A が羊水中のマクロファージを刺激し羊膜を経て子宮へと遊走し IL-1 β を産生、直接分娩発来のシグナルとなることが示された (PNAS, 2004)。我々は、前述の MK が羊膜には発現・局在していないものの、western blot では羊水中には存在し、妊娠中期の方が後期より高濃度である可能性を明らかとしてきた (日本産科婦人科学会, 2008 および米国 SGI 学会, 2008 にて発表)。さらに興味深いことに、予備実験で MK は羊膜上皮培養細胞において COX2 発現を量依存的に抑制する可能性があることが判明した。また胎児における各組織の MK 発現・局在の程度から羊水中 MK の由来として、胎児尿中への分泌等が推定されるがこの点は未証明である。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでに得られた成果を発展させ、ヒト胎児羊膜系の構成因子が如何に妊娠維持機構や分娩発来機構に関わっているのかを明らかにする。具体的には羊水中 MK の役割と由来、またヒト胎児副腎発育や機能 (ステロイド産生) の制御機構に関して検討する。

3. 研究の方法

海外共同研究者との共同研究により以下について検討を加えた。また使用した臨床検体については、商業ベースで入手可能なもの、および関連施設の臨床研究委員会等での研究計画等の承認後、患者からの承諾を得て入手した。

(1) 羊水中の Midkine (MK) に関する研究

ヒト羊水中の MK 濃度の変化と、その産生源に関する検討

① ヒト羊水中の MK 濃度

羊水中の MK 蛋白量を ELISA 法により測定

② 羊水中の MK 産生源の検討

羊膜 (妊娠中期、後期)、妊娠中期の胎児諸臓器 (肺、腎臓など) について MK mRNA 定量をリアルタイム RT-PCR 法、MK 蛋白の局在は免疫組織化学により検討

③ MK の羊膜上皮細胞のプロスタグランディン (PG) E2 産生系への影響

選択的帝王切開時に得られた羊膜より上皮細胞の培養を行い、妊娠が進行するにつれ増

加する cyclooxygenase type 2 (COX2) 発現への MK の影響を添加実験により検討

(2) 胎児副腎に関する研究

① Ovary-specific acidic protein (OSAP) の発現と機能について

a) ヒト成人副腎と胎児副腎における OSAP 発現の比較検討: リアルタイム RT-PCR 法

b) 層別発現の検討: ヒト胎児副腎の各細胞層から laser-capture microdissection 法により得られた RNA を用いリアルタイム RT-PCR 法で検討

c) 胎児副腎皮質モデル細胞株 NCI-H295A 細胞で OSAP 蛋白を siRNA で knock down しステロイド産生への影響を検討

② MK による細胞増殖促進作用と HSD3B2 発現抑制作用について

a) NCI-H295A 細胞を用いた上記作用の検討: MTS 法および薬理的阻害実験、リアルタイム RT-PCR 法

b) 受容体候補蛋白の発現に関する検討: RT-PCR 法

③ 組織レニン-アンジオテンシン系の主要構成要素であるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) およびコルチゾールやアルドステロン産生に関与する因子の ontogenic な層別発現について: laser-capture microdissection 法およびリアルタイム RT-PCR 法で検討

4. 研究成果

(1) 羊水中の Midkine (MK) に関する研究

羊水中の midkine (MK) 濃度の多寡を知るため Midkine ELISA 系を構築した。ヒト羊水中の MK 濃度は妊娠中期で MK はより高濃度に羊水中に存在していることが確認された。羊水中の MK 産生源候補としては胎児腎臓が挙げられたが、早産児を含めた出生直後の児の尿中には ELISA 感度以上の MK 蛋白が存在しないことが明らかとなり、この可能性は否定的と考えられた。

一方、妊娠中期胎児肺 MK mRNA は腎臓より高発現し、また妊娠末期 mRNA は中期よりも減少していた。この胎児肺における MK 発現パターンは免疫組織学的検討でも同様であり、妊娠中期胎児肺では肺胞液に接する肺胞上皮細胞に MK 蛋白の局在がみとめられたが、末期胎児肺では MK 蛋白は陰性であった。また羊膜では MK の発現が見られなかった。

羊膜上皮細胞培養における検討では、MK 蛋白の羊水中に匹敵する濃度での添加により、子宮収縮促進物質である Prostaglandin E2 産生量、羊膜の cyclooxygenase-2 (COX2) mRNA 発現量が MK 量依存性に抑制された。

以上より、羊水中に存在する MK は妊娠中期には COX2 の発現抑制を介して妊娠維持に働いているが、妊娠末期には羊水中濃度が減少し COX2 発現抑制効果が減弱することにより、分娩・陣痛発来機序に関与している可能

性が示唆された。また羊水中 MK の少なくとも一部は胎児肺に由来することが強く示唆され、胎児肺由来 MK が妊娠維持シグナルとして働いている可能性が考えられた。

(2) 胎児副腎に関する研究

① OSAP はステロイド産生臓器、特に副腎に多く発現するミトコンドリア蛋白であるが、OSAP はヒト成人副腎より胎児副腎でより多く発現し胎児副腎の機能層である内層 (fetal zone) により選択的に発現することが明らかとなった。また胎児副腎皮質モデル細胞株である NCI-H295A 細胞で OSAP 蛋白を一時的に knock down すると、培養液中のコルチゾールや dehydroepiandrosterone sulfate 産生量が低下した。以上より、OSAP が FZ 細胞を含めた分化した副腎皮質細胞においてステロイド産生に関与していることが示唆された。

② NCI-H295A 細胞における recombinant human MK 添加実験では、初代培養細胞と同様の濃度依存的 (1-100 ng/ml) な細胞増殖促進作用が示され、さらに薬理的阻害実験から PI-3 kinase 系の関与が示唆された。しかし初代培養細胞で認められた HSD3B2 mRNA の発現抑制作用は示されなかった。RT-PCR による検討では、ヒト胎児副腎で発現していた MK 受容体候補蛋白のうち versican と $\alpha 4$ -integrin の発現は NCI-H295A 細胞では認められなかった。以上より、NCI-H295A 細胞は、少なくとも MK の増殖促進作用機序を検討するのに有用なモデル系と考えられ、また NCI-H295A と初代培養細胞の MK に対する反応性や受容体発現の差異は、生体内での MK 作用機序を推察する端緒となるものと思われた。

③ ACE mRNA 発現量は、妊娠中期ヒト胎児副腎の外層 DZ では内層 FZ に比較して高く、18 週から 24 週にかけて 2-3 倍に増加した。また CYP11B2 の発現量も同様な発現パターンを示した。この結果は転写因子 NGF-IB と Nurrl1、ステロイド産生酵素 HSD3B2 と CYP11B2 の発現パターンとも一致しており、コルチゾールやアルドステロン産生に関与する因子がほぼ一致した時間的・空間的発現挙動を示すことが判明した。また海外共同研究者との検討において、培養ヒト胎児副腎皮質細胞 (DZ 細胞) ではアンジオテンシン-II 添加により ACE が発現増強することが判明し、ACE がヒト胎児副腎外層 (DZ) においてアンジオテンシン-II 局所産生を amplify していることが示唆された。

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 3 件)

① Ishimoto H, Jaffe RB: Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: a Key Component in the Feto-Placental Unit. *Endocrine Reviews* 32(3):317-355, 2011 (査読あり)

② Asai S, Ishimoto H, Yabuno A, Asada H, Seki M, Iwata S 2011 Laparoscopic cystectomy of ovarian teratoma in anti-NMDAR encephalitis: two case reports. *J Minim Invasive Gynecol* 18(1):135-137, 2011 (査読有り)

③ Matsumoto T, Minegishi K, Ishimoto H, Tanaka M, Hennebold JD, Teranishi T, Hattori Y, Furuya M, Higuchi T, Asai S, Kim SH, Miyakoshi K, Yoshimura Y: Expression of ovary-specific acidic protein in steroidogenic tissues: a possible role in steroidogenesis. *Endocrinology* 150(7) : 3353-3359, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

① Doguchi K, Ishimoto H, Matsumoto T, Kondo A, Sato S, Miyazawa M, Minegishi K, Izumi S, Mikami M, Jaffe RB: Ontogenic Expression of Angiotensin-Converting Enzyme in the Human Fetal Adrenal Gland: Implication in Angiotensin II-Mediated Aldosterone Synthesis. 93th Annual Meeting of the Endocrine Society (2011. 6. 4 発表), Boston (The Boston Convention & Exhibition Center), USA

② 道口健翔、石本 人士、宮澤昌樹、和泉俊一郎、Jaffe RB: Midkineのヒト胎児副腎皮質における役割: 初代培養細胞とモデル細胞株の比較検討. 第 84 回日本内分泌学会 (2011. 4. 22 発表)、神戸 (神戸国際展示場)

③ Ishimoto H: The Human Fetal Adrenal Gland: A Key Component of the Feto-Maternal Unit. 第 23 回韓国周産期学会 (The Korean Perinatal Society) (2010. 11. 20 発表)、ソウル(Asan Medical Center)、韓国

④ Ishimoto H: Invitation to Fetal Endocrinology: Signals from the Fetus. 第 23 回韓国周産期学会 (The Korean Perinatal Society) プレカンファレンスミーティング (2010. 11. 19 発表)、ソウル(Samsung Medical Center)、韓国

⑤ Ishimoto H, Minegishi K, Matsumoto T, Kondo A, Doguchi K, Miyazawa M, Tanaka M, Jaffe RB. Abundant Expression of Ovary - Specific Acidic Protein in the Midgestation Human Fetal Adrenal Gland: Implications for Fetal Adrenal Androgen Biosynthesis. 92th Annual Meeting of the Endocrine Society (2010. 6. 20 発表), San Diego (The San Diego Convention Center), USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 人士 (ISHIMOTO HITOSHI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号 : 10212937

(2) 研究分担者

近藤 朱音 (KONDO AKANE)

東海大学・医学部・講師

研究者番号 : 00384884

(3) 研究協力者 (海外共同研究者)

Robert B. Jaffe

カリフォルニア大学サンフランシスコ校・医学部・教授

Marcus O. Muench

カリフォルニア大学サンフランシスコ校・医学部・客員准教授