

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 21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592095

研究課題名（和文） 母体血小板と絨毛細胞の相互作用：PIH、IUGRの病因解明をめざして

研究課題名（英文） Interaction between platelet and trophoblast -Toward the elucidation of pathophysiology of PIH and IUGR -

研究代表者

佐藤 幸保（SATO YUKIYASU）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00508236

研究成果の概要（和文）：

胎盤の組織培養より分離した extravillous trophoblast（分離 EVT）を血小板と共培養することで母体血管を浸潤する endovascular EVT 様の細胞への形態変化を誘導することに成功した。通常培養した分離 EVT と血小板と共培養した分離 EVT との間のマイクロアレイ解析と胎盤組織の免疫染色により、MCAM（CD146）が endovascular EVT に強発現していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Using extravillous trophoblast (EVT) isolated from chorionic villous explant cultures, we successfully reproduced EVT transformation towards endovascular phenotype by co-culturing with platelets. Microarray analysis revealed that platelet co-culture up-regulates several molecules, which we regarded as candidates for endovascular EVT markers. Immunohistochemistry of human placental tissues showed that one of such candidates, MCAM (CD146), is highly expressed on endovascular trophoblast. Now, we are planning to perform functional analysis for MCAM using isolated EVT.

In addition, we demonstrated that sphingosine-1-phosphate, one of platelet-derived factors, promotes invasion of the isolated EVT. This supports our hypothesis that interaction between maternal platelets and EVT plays an important role in maternal vascular remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：絨毛外トロホブラスト、血小板、浸潤、血管リモデリング、妊娠高血圧症候群、子宮内胎児発育遅延

1. 研究開始当初の背景

ヒト胎盤には villous trophoblast と extravillous trophoblast (EVT) という 2 種類の絨毛細胞が存在する。EVT は母体脱落膜および母体血管へと浸潤する。脱落膜へ浸潤する EVT は interstitial EVT、母体血管を浸潤する EVT は endovascular EVT と呼ばれる。妊娠初期および中期のヒト胎盤において、endovascular EVT は母体血管壁を浸潤し、母体血管の再構築(リモデリング)を引き起こす。これにより母体血管径は増大し、種々の血管作動物質への反応性を失う。この endovascular EVT による母体血管リモデリングは、正常な胎児発育に必要な絨毛間腔への血流の確保に不可欠であるとされている。

本研究代表者は、母児境界面において母体血管内の endovascular EVT 周囲に血小板が付着して活性化されていることを発見した。さらに初期胎盤の組織培養より分離した EVT (分離 EVT) を血小板と共培養することにより分離 EVT の浸潤能が亢進し、また endovascular EVT 様細胞への形態変化が誘導されることが明らかとなった。以上の知見より、母体血小板と胎児由来 EVT との相互作用が母体血管のリモデリングに重要な役割を果たしているという新しい概念を提唱するに至った。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では EVT と母体血小板の相互作用に着目して、EVT による血管リモデリングの機構について新しい知見を得ることを第一の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 血小板との共培養で誘導される分離 EVT の形態変化の分子生物学的解析

分離 EVT はその形態学的特徴および発現マーカーよりそのほとんどが interstitial EVT であるが、血小板と共培養すると endovascular EVT 様細胞への形態変化が誘導される。この endovascular EVT 様細胞と分離 EVT 細胞との間で発現差のある分子群をマイクロアレイ法によりスクリーニングし、RT-PCR 法により確認する。発現差が確認された分子については、ヒト胎盤組織を用いた免疫組織染色法により同様の発現差があるかどうかを調べる。以上により endovascular EVT に特異的に発現する分子 (eEVT マーカー) を同定することを目指す。

(2) 母体血管リモデリング機構の解析

Interstitial EVT が母体脱落膜内で浸潤能を失いアポトーシスに落ちる一方、

endovascular EVT は浸潤能が保持されアポトーシス誘導を免れている。この endovascular EVT の特徴が母体血管リモデリングに有利に働いていることが想定されている。そこで、eEVT マーカーとして同定された分子について、分離 EVT での発現 siRNA を用いて抑制し、1) invasion assay により浸潤能の変化をみる 2) アポトーシスに陥った上皮細胞を特異的に認識する抗 M30 抗体を用いた免疫細胞染色でアポトーシスに陥った細胞数の変化をみる。これらの実験で分離 EVT の浸潤やアポトーシスに関与する endovascular EVT の分化マーカーを同定することを目指す。

(3) 妊娠高血圧症候群 (PIH) / 胎児発育不全 (FGR) 胎盤と正常対照胎盤における endovascular EVT の比較

PIH/FGR の胎盤では EVT による母体血管リモデリングが十分におこらず、絨毛間腔への血流が減少することが想定されている。eEVT マーカーについて PIH/FGR 胎盤と正常対照胎盤の EVT における発現に差がないかを検討する。以上により PIH/FGR 胎盤にみられるとされる母体血管リモデリング不全の責任分子を明らかにすることを目指す。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析の結果、種々の分子が血小板共培養群で発現が増強していることが判明したが、まずは、解析が比較的容易と考えられる細胞表面分子に着目することにした。melanoma cell adhesion molecule (MCAM)、CSF-2 receptor、endothelin receptor type B、integrin、 αV 、TGF- β receptor、oncostatin M receptor、CD164、E-cadherin、CD73 などの細胞様面分子の発現が結晶板との共培養により発現が増強していた。このうち、melanoma cell adhesion molecule (MCAM) については、実際の胎盤組織においても脱落膜を浸潤する interstitial EVT に比べ、endovascular EVT で発現が高いことを免疫組織染色で確認できたため、eEVT マーカーの一つと考えられた。

(2) MCAM の機能を解析するために、MCAM 特異的 siRNA を分離 EVT に導入したが、思うような発現減弱を得ることができなかった。現在レンチウイルスによる shRNA 導入システムを試みている

(3) 現在、PIH/FGR 胎盤のサンプルを収集中である。

(4) 計画とは別に、血小板より放出される液性因子の一つである sphingosine-1-phosphate (S1P)が、分離 EVT の浸潤を促進することを明らかにした。S1P 受容体が分離 EVT に発現していることも確認された。S1P が endovascular EVT 表面に付着し活性化された血小板から放出され、血管内に EVT を呼び込むことにより母体血管リモデリングに重要な働きをしている可能性が推察された。これに関しては現在、論文を作成中である。

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)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Fujii H, Fujiwara H, Horie A, Sato Y and Konishi I. Ephrin A1 induces intercellular dissociation in Ishikawa cells: possible implication of the Eph-ephrin A system in human embryo implantation. Hum Reprod. 2011;26(2):299-306. 10.1093/humrep/deq340 [doi] 査読有
- ② Fujii H, Fujiwara H, Horie A, Suginami K, Sato Y and Konishi I. EphrinA1 stimulates cell attachment and inhibits cell aggregation through the EphA receptor pathway in human endometrial carcinoma-derived Ishikawa cells. Hum Reprod. 2011;26(5):1163-70. 10.1093/humrep/der034 [doi] 査読有
- ③ Hosono K, Matsumura N, Matsuda N, Fujiwara H, Sato Y and Konishi I. Successful recovery from delayed amniotic fluid embolism with prolonged cardiac resuscitation. J Obstet Gynaecol Res. 2011;37(8):1122-5. 10.1111/j.1447-0756.2010.01470.x [doi] 査読有
- ④ Izumi Y, Sato Y, Kakui K, Tatsumi K, Fujiwara H and Konishi I. Prenatal treatment of meconium peritonitis with urinary trypsin inhibitor. Ultrasound Obstet Gynecol.

2011;37(3):366-8. 10.1002/uog.8843 [doi] 査読有

⑤ Kitahara T, Sato Y, Kakui K, Tatsumi K, Fujiwara H and Konishi I. Management of retained products of conception with marked vascularity. J Obstet Gynaecol Res. 2011;37(5):458-64.

10.1111/j.1447-0756.2010.01363.x [doi] 査読有

⑥ Okitsu O, Kiyokawa M, Oda T, Miyake K, Sato Y and Fujiwara H. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. J Reprod Immunol. 2011;92(1-2):82-7.

10.1016/j.jri.2011.07.001 [doi] 査読有

⑦ Sato Y, Fujiwara H and Konishi I. Response to 'Retained products of conception with marked vascularity: Pseudoaneurysm hidden behind it'. J Obstet Gynaecol Res. 2011;37(7):966.

10.1111/j.1447-0756.2011.01667.x [doi] 査読有

⑧ Sato Y, Heimeier RA, Li C, Deng C and Shi YB. Extracellular domain of CD98hc is required for early murine development. Cell Biosci. 2011;1(1):7-18. 10.1186/2045-3701-1-7 [doi] 査読有

⑨ Sato Y, Izumi Y, Minegishi K, Komada M, Yamada S, Kakui K, Tatsumi K, Mikami Y, Fujiwara H and Konishi I. Prenatal findings in congenital leukemia: a case report. Fetal Diagn Ther. 2011;29(4):325-30. 10.1159/000323582 [doi] 査読有

⑩ Sumi A, Sato Y, Kakui K, Tatsumi K, Fujiwara H and Konishi I. Prenatal diagnosis of anterior sacral meningocele. Ultrasound Obstet Gynecol. 2011;37(4):493-6. 10.1002/uog.8852 [doi] 査読有

⑪ Takai H, Kondoh E, Sato Y, Kakui K, Tatsumi K and Konishi I. Disseminated intravascular coagulation as the presenting sign of gastric cancer during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37(11):1717-9.
10.1111/j.1447-0756.2011.01561.x [doi] 査読有

⑫ Taki M, Sato Y, Kakui K, Tatsumi K, Fujiwara H and Konishi I. Management of fetal death with placenta previa. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;25(2):196-9.
10.3109/14767058.2011.560624 [doi] 査読有

⑬ Satake Y, Sato Y, Matsumura N, Tatsumi K, Fujiwara H and Konishi I. Middle cerebral artery-peak systolic velocity in dizygotic twins with anti-E alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010;36(6):1236-9.
10.1111/j.1447-0756.2010.01314.x [doi] 査読有

⑭ Sato Y, Fujiwara H and Konishi I. Role of platelets in placentation. *Med Mol Morphol.* 2010;43(3):129-33. 10.1007/s00795-010-0508-1 [doi] 査読有

⑮ Katsuya S, Yamada S, Ukita M, Nishimura H, Matsumura N, Fukuhara K, Sato Y, Shiota K and Konishi I. Isolated levocardia: Prenatal diagnosis and management. *Congenit Anom (Kyoto).* 2009;49(2):56-60.
10.1111/j.1741-4520.2009.00223.x [doi] 査読有

⑯ Sato Y, Ding A, Heimeier RA, Yousef AF, Mymryk JS, Walfish PG and Shi YB. The adenoviral E1A protein displaces corepressors and relieves gene repression by unliganded thyroid hormone receptors in vivo. *Cell Res.* 2009;19(6):783-92.
10.1111/j.1741-4520.2009.00223.x [doi] 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 佐藤 幸保
「不妊治療の基礎的知識」
第 123 回近畿産科婦人科学会 教育講演

2010 年 11 月 7 日 京都

② 佐藤 幸保
「乳がん女性の妊娠について」
市民公開講座 2010 年 10 月 2 日 京都

③ 佐藤 幸保
「ウリナスタチンの胎児腹腔内投与を行った胎便性腹膜炎の一例」
第 46 回日本周産期新生児医学会
2010 年 7 月 12 日 神戸

④ 佐藤 幸保
「産科重症症例からのフィードバック」
京都産婦人科研究会 特別講演
2010 年 5 月 29 日 京都

⑤ Yukiyasu Sato
“Maternal platelets and placental vascular remodeling.” 14th World Congress of Gynecological Endocrinology. March 6, 2010. Firenze.

[図書] (計 1 件)

① Fujiwara H, Sato Y, Ideta A, Aoyagi Y, Araki Y and Imakawa K. Immune regulation of human embryo implantation by circulating blood cells 2011: 61-72. InTech Open Access Publisher.

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐藤 幸保 (SATO YUKIYASU)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：00508236

(2) 研究分担者
藤原 浩 (FUJIWARA HOROSHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30252456

松村 謙臣 (MATUMURA NORIOMI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：20452336