

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580407

研究課題名(和文)胎盤形成期におけるadipsin/ASP脂質取り込み経路の生殖生理学的役割

研究課題名(英文)Reproductive roles of the adipsin/ASP pathway mediated by immunological and lipid metabolic effects

研究代表者

日下部 健(Ken Takeshi, Kusakabe)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：20319536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：Adipsin/ASP経路は補体活性化と、血中遊離脂肪酸の細胞内取り込みを交差させる複合的な生理システムである。流産の発症要因に補体系が関係することから、本経路の生殖学的な意義について検討した。流産を起こした胎盤では脂質成分の有意な上昇と血管への脂肪滴の蓄積が認められた。妊娠マウスへadipsinタンパクを投与すると流産率が増加し、胎盤に変性所見が認められた。投与によって脂質代謝関連因子と妊娠に重要なサイトカインの変動が認められた。妊娠期の主なadipsin産生部位は乳腺であることが判明し、本経路が過剰に活性化した場合、胎盤局所の傷害作用と全身性の代謝変動により流産が誘導される可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The adipsin/ASP system has a crosstalk effect in the processes of complement activation and cellular lipid uptake. Involvement of adipsin/ASP system was examined in the reproductive physiology and abortion onset. In the abortion placenta, triglyceride and the related factors were elevated, and lipid droplets were increased in the vascular wall. Administration of recombinant adipsin to pregnant mice elevated abortion rate and promoted histological degeneration of the placenta. Lipid metabolic factors and pregnancy-associated cytokines were changed following the adipsin treatment. Adipsin was produced mainly in the mammary gland during pregnancy periods. It was suggested that adipsin/ASP system basically regulate lipid metabolism during pregnancy and abnormal activation could disturb normal pregnancy by systemic variation of metabolic factors and cytokines, and by local toxic effects on the placental formation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：胎盤 補体 脂質 免疫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者が見出した補体関連タンパク adipsin の流産胎盤での発現亢進については、生殖生理学的な機能や意義が不明であった。Adipsin は補体タンパクを活性化させ、流産の発症機序に関与することが考えられたが、その上流で補体抑制因子である crry が発現して抑制機序が機能していることが確認され、流産誘導における adipsin の因果関係は単純な系でないことが分かった。

(2) 一方、adipsin は活性型補体 C3a の形成に関与するが、その誘導体 C3adesArg は受容体 C5L2 を介し、acylation stimulating protein (ASP) として細胞内への脂質取り込み作用を発揮する。胎盤における脂質代謝は、胎盤の形成、あるいは胎児への栄養供給に関与する可能性があり、その制御メカニズムは妊娠生理に密接に関与することが考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) Adipsin/ASP 経路と脂質代謝系の胎盤形成における役割を調べ、流産発症との関わりについて検討する。

(2) Adipsin が関与する補体の活性化と流産発症について、抑制因子 crry の発現動態を含めた総合的な考察を行い、妊娠期間における補体系の制御メカニズムについて理解する。

## 3. 研究の方法

(1) マウス胎盤における adipsin、crry および補体関連因子、C5L2 および脂質代謝関連因子の発現動態を調べる。

(2) 複数の流産マウスモデルにおける、上記(1)で確認された各因子の発現動態の変動性について調べる。

(3) 胎盤を構成する栄養膜細胞の培養細胞を利用し、分化の過程と adipsin/ASP 系との関連性について調べる。

(4) 妊娠マウスに adipsin を投与、または外部からの遺伝子導入を行い、妊娠生理への影響を調べる。

## 4. 研究成果

(1) Adipsin は正常胎盤において既に存在し、脂質代謝関連因子も発現していた。流産胎盤では adipsin の発現量は亢進していたが、それに相関した脂質代謝関連因子の胎盤内発現増加は認められなかった。一方で、流産胎盤ではトリグリセリドの含有量が増加し、血管に脂肪滴の蓄積が認められた。

(2) 流産後の脂質代謝系の経時的な変化を調べるため、マウスの胎子除去術を行った。

施術後、胎盤に脂肪滴をもつ遊走細胞が現れたが、adipsin や C5L2 の発現動態と関連性は認められなかった。

(3) 栄養膜細胞の幹細胞である TS 細胞において、adipsin と C5L2 の明確な発現が認められた。一方、分化型の栄養膜細胞である TG 細胞では両者の発現は低下しており、Adipsin/ASP 系が栄養膜細胞の分化に関与することが分かった。

(4) 流産モデルである CBAXDBA マウスでは、コントロールマウスに比べ、adipsin の発現量が有意に高かった。Adipsin は循環血中に含まれており、流産モデルで増加していることが分かった。主要な臓器を調べると、乳腺が adipsin の主な産生部位であった。また、CBAXDBA で一部正常に発達している胎盤では、補体抑制因子 crry の発現レベルが増加しており、crry の制御機序が、adipsin が関与する補体系の流産誘導の防御性を決定する可能性が示された。

(5) 正常な妊娠マウスに adipsin リコンビナント蛋白を投与した。対照群と比べ、投与群の流産率は有意に増加し、胎盤のサイズが減少した。胎盤では膠原線維の増生や血栓などの変性所見が認められた。一方で、脂質代謝因子の亢進が認められた。妊娠の維持に必要な Th2 タイプサイトカインが減少し、Th1 タイプサイトカインが増加した。

(6) Adipsin は乳腺で産生され、妊娠期における全身性の脂質代謝に関連する可能性がある。一方で、adipsin は補体の活性作用を有し、胎盤ではその毒性作用に対抗するため、補体抑制因子 crry を局所的に産生していると考えられる。脂質代謝系は栄養膜細胞の分化に関わり、胎盤の正常な形成に影響を与えることが予測される。また、メカニズムは不明だが、adipsin/ASP 経路は免疫細胞に働き、妊娠期におけるサイトカイン動態にも影響し、正常な妊娠に対して負に働く可能性がある。

## 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 5件)

Hayashi K, Kusakabe KT, Khan H, Kuniyoshi N, Takeshita A, Hiyama M, Kano K, Kiso K. Characteristic patterns of maternal and fetal arterial construction in the rabbit placenta. Med Mol Morphol, in press. DOI: 10.1007/s00795-013-0044-x. 査読有

Hayashi K, Kusakabe KT, Sugimoto A, Wakitani S, Sugi S, Kuniyoshi N,

Hiyama M, Takeshita A, Kano K, Kiso Y. Influence of atopic dermatitis on reproduction and uterine natural killer cells. *J Vet Med Sci*, 76:913-916, 2014. DOI: 10.1292/jvms.13-0547. 査読有

Takeshita A, Kusakabe KT, Hiyama M, Kuniyoshi N, Kondo T, Kano K, Kiso Y, Okada T. Dynamics and reproductive effects of complement factors in the spontaneous abortion model of CBA/J x DBA/2 mice. *Immunobiology*, 219 (5): 385-391, 2014. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.01.001. 査読有

Khan H, Kusakabe KT, Wakitani S, Hiyama M, Takeshita A, Kiso Y. Expression and localization of NO synthase isoenzymes (iNOS and eNOS) in development of the rabbit placenta. *J Reprod Dev* 58 (2): 231-236, 2012. DOI: 10.1262/jrd.11-128T. 査読有

Khan H, Kusakabe KT, Wakitani S, Hiyama M, Kiso Y. Quantitative expression and immunohistochemical detection of glucose transporters, GLUT1 and GLUT3 in the rabbit placenta during successful pregnancy. *J Vet Med Sci*. 73 (9): 1177-1183, 2011. DOI: 10.1262/jrd.11-128T. 査読有

〔学会発表〕(計 13件)

鳥海早紀、日下部 健、武下愛、加納聖、木曾康郎 自然流産モデルマウスの母子境界領域における母体血管構築と関連サイトカイン 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20-22 岐阜大学(岐阜市)

Ai Takeshita, Tomohiro Kondo, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso, Toshiya Okada, Ken Takeshi Kusakabe. Upregulation of complement alternative pathway in the mouse model of spontaneous abortion. 46th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction Meeting. 2013.7.22-26 Montreal, Canada

武下愛、近藤友宏、加納聖、木曾康郎、岡田利也、日下部 健 妊娠高血圧症候群における胎盤内および血清中の補体第二経路活性 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013.3.28-30 サポートホール高松・かがわ国際会議場(高松市)

武下愛、鳥海早紀、吉田優司、近藤友宏、加納聖、木曾康郎、岡田利也、日下部 健 自然流産モデルの母子境界領域における補体第二経路活性 第27回日本生殖免疫学会 2012.12.9-10. 大阪医科大学(高槻市)

Ai Takeshita Saki Toriumi, Yuji Yoshida, Kiyoshi Kano, Tomohiro Kondo,

Yasuo Kiso, Toshiya Okada, Ken Takeshi Kusakabe. Complement activation at the feto-maternal interface in a mouse model of preeclampsia. The 4th Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomist. Oct 24-26, 2012. Phuket, Thailand.

日下部 健、林一彦、國吉信恵、加納聖、木曾康郎 ウサギ胎盤で見られた特徴的な血管構造 日本解剖学会第67回中国・四国支部学術集会 2012.10.20-21. 山口大学医学部(宇部市)

武下愛、鳥海早紀、吉田優司、近藤友宏、加納聖、木曾康郎、岡田利也、日下部 健 Allogenic 交配の胎盤内における補体第二経路活性 日本解剖学会第67回中国・四国支部学術集会 2012.10.20-21. 山口大学医学部(宇部市)

Ken Kusakabe Vascular structure of the placenta in the rabbit placenta. Workshop: Comparative Placentation and Animal Models. International Federation of Placenta Association Meeting 2012. 2012.9.18-21, International Conference Center Hiroshima.

武下愛、鳥海早紀、吉田優司、近藤友宏、木曾康郎、岡田利也、日下部 健 CBA/J x DBA/2 自然流産モデルにおける補体第二経路の関与 第154回日本獣医学会学術集会 2012.9.14-16. 岩手大学(盛岡市)

日下部 健 マウス自然流産胎盤における変動因子の探索と機能解析 第4回性差生物医学研究会 2011.11.21 山口大学医学部霜仁会館(宇部市)

Hamayun Khan, Ken Takeshi Kusakabe, Yasuo Kiso. Assessment of NO synthase isoenzymes (eNOS and iNOS) in the rabbit placenta during successful pregnancy. 第152回日本獣医学会学術集会 2011.9.19-21 大阪府立大学(堺市)

武下愛、永石翔太、近藤友宏、岡田利也、日下部 健 Adipsin のマウス胎盤内発現と脂質代謝への影響 第152回日本獣医学会学術集会 2011.9.19-21 大阪府立大学(堺市)

日下部 健、林一彦、奥原由子、清時啓史、寺井恵子、檜山雅人、脇谷晶一、木曾康郎 ウサギ胎盤における血管構築 第43回日本臨床分子形態学会学術集会 2011.9.9-10 大阪医科大学(高槻市)

〔図書〕(計 1件)

Kusakabe K, Takeshita A, Abe H, Kondo T, Okada T. DNA microarray analysis on the murine models for endometriosis and spontaneous abortion. Marissa J.

Campbell (ed) In: DNA microarrays, Synthesis and Synthetic DNA. Nova Science Publishers, NY, USA. 2011 May. pp. 347-362.

研究者番号 : 50733557

〔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

[https://www.researchgate.net/profile/Ken\\_Kusakabe?ev=hdr\\_xprf](https://www.researchgate.net/profile/Ken_Kusakabe?ev=hdr_xprf)

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~kusakabe/>

<http://www.vet.yamaguchi-u.ac.jp/member/kusakabe/kusakabe-p.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下部 健 (KUSAKABE, Takeshi)  
山口大学・共同獣医学部・准教授  
研究者番号 : 20319536

(2) 研究分担者

岡田 利也 (OKADA, Toshiya)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号 : 00169111

(3) 連携研究者

柴田 雅朗 (SHIBATA, Masaaki)  
大阪保健医療大学大学院・保健医療学研究科・教授  
研究者番号 : 10319543

研究協力者

武下 愛  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・大学院生および日本学術振興会特別研究員 (DC1)