

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791825

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の病態における分子標的因子の解析と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) A new therapeutic approach of preeclampsia with lysophospholipids

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：EVT浸潤において、生理活性物質であるリゾリン脂質LPA、S1Pの受容体サブタイプの発現パターンを明らかにした。また、受容体サブタイプにより浸潤や遊走に促進的および抑制的に作用すること、シグナル伝達系やMMP-9の発現変化を介していることが判明した。受容体発現パターンには、細胞密度の関与を示唆する結果を得た。S1P2拮抗薬投与によるEVT浸潤促進作用が確認されたが、動物実験では有意な変化を認めなかった。一方S1P1,3拮抗薬投与により胎盤低形成、胎児発育不全のモデルを作成することができた。以上より、リゾリン脂質の受容体拮抗薬や作動薬が、胎盤低形成や胎児発育不全の新規治療への可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The subtypes of receptors of lysophosphatidic acid (LPA) and sphingosine-1-phosphate (S1P) were expressed in EVT at early gestation. LPA3, S1P1 and S1P3 promoted migration of EVT, but S1P2 suppressed that in EVT cell lines. LPA induced invasion of EVT via activation of ERK, STAT-3, and Akt. S1P1 and S1P3 induced the expression of MMP-9, but S1P2 reduced it. The expression pattern of S1PR subtypes was dependent on cell density. In high cell concentration, S1P2 was mainly expressed, but S1P1 and S1P3 were dominantly expressed in low cell concentration. The antagonist of S1P2 (JTE-013) significantly induced migration of EVT. In pregnant ICR mouse, peritoneal injection of JTE-013 had no effect on the development of placenta and fetus, but injection of FTY720 (S1P1 and 3 antagonist) significantly reduced the weight of placenta and fetus, compared with control. Thus, antagonists or agonists of LPA or S1P could be a new therapeutic drug for fetal growth retardation, and preeclampsia.

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：胎児発育不全 絨毛浸潤 S1P LPA

1. 研究開始当初の背景

これまで、妊娠高血圧症候群は、「学説の病」といわれるほど多くの病因論が展開されてきた。現在では、絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) の母体脱落膜への浸潤不全という第1段階を経て、形成不全の胎盤における血管形成因子と抗血管形成因子の産生バランスの破綻という第2段階に進行することで、高血圧、尿蛋白などの症状を発症するという説が最有力である。新規生理活性物質であるリゾリン脂質が妊娠高血圧症候群では低下している可能性を示唆する報告や、癌研究分野において細胞浸潤機能に関与する報告があることに着目し、我々はこれまでに、リゾリン脂質が胎盤形成の重要なステップであるEVTの母体子宮内膜への浸潤における役割を検討したところ、EVT浸潤機能を調節していることを見出した。最近では、妊娠高血圧症候群におけるカルシウム拮抗薬の投与による母体の血圧管理が可能となり、今後は適切な投与により脳血管障害などの重篤な母体合併症はある程度回避できる可能性がでてきた。しかし、児の予後に対し大きな影響を与える胎児発育不全に関しては、未だ有効な治療もなく、その原因ともなる第1段階の病態に関しては、未だ不明な点が多い。したがって、児の神経学的後遺症は依然として問題となっているのが現状である。こうした背景のなかで、われわれは妊娠高血圧症候群の病態の第1段階となる胎児発育不全の原因とされる胎盤低形成について解明し、EVT浸潤への調節作用を有するリゾリン脂質に着目し、新規治療法の開発を試みようと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、EVT浸潤への調節作用を有するリゾリン脂質に着目し、リゾリン脂質の受容体作動薬や拮抗薬を用いて、その効果を検討し、胎盤低形成の新規治療法を開発することである。本研究では、期間内に、LPAのEVT浸潤促進作用のメカニズムを分子生物学的に解明し、S1PとLPAが協調的に作用しEVT浸潤調節をおこなっていることを証明し、またその分子生物学的メカニズムも解明していくこと、最終的には、LPAによるEVT浸潤促進作用に対するS1Pの阻害効果に関与する受容体サブタイプを同定し、その受容体拮抗薬でEVT浸潤不全(胎盤形成不全)を改善できるかを *in vitro* で証明することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) リゾリン脂質の受容体サブタイプおよび合成酵素の局在：

患者からのインフォームドコンセントを得て集積した妊娠初期子宮筋一脱落膜一胎盤組織でLPAおよびS1Pの受容体の各サブタイプおよびAutotaxinの発現パターンについて、EVTを脱落膜細胞より区別して認識するため

に、抗サイトケラチン抗体を用いて蛍光二重染色法にて検討した。また、正常妊娠初期に人工妊娠中絶を施行した患者からインフォームドコンセントを得た上で採取した絨毛検体および脱落膜検体を細切しそれぞれ初代EVT培養および脱落膜培養を行い、それらにおいても同様に発現パターンをRT-PCRで検討した。

(2) リゾリン脂質の受容体サブタイプの中でEVT浸潤調節作用に関与しているサブタイプの同定：

(1)で同定した受容体の各サブタイプについて、それぞれのsiRNAを作成しEVT細胞株HTR-8/SVneo, HchEpC1b, Swan77に遺伝子導入し、浸潤能の変化をボイデンチャンパー法などで比較検討することにより、S1PのEVT浸潤調節作用に関与する受容体のサブタイプを検討した。

(3) リゾリン脂質によるEVT浸潤調節作用の解明：

細胞浸潤に関与することがすでに知られているメタロプロテアーゼや細胞内シグナル伝達物質などがLPAおよびS1P刺激によって変化しているかを検討した

(4) リゾリン脂質受容体サブタイプの各種作動薬や拮抗薬の絨毛浸潤への効果 (*in vitro*での検討)：

EVT細胞株HTR-8/SVneo, HchEpC1b, Swan77に各種受容体作動薬および拮抗薬を投与し、遊走能について検討した。

(5) EVTにおいてS1P受容体サブタイプ発現パターンが変化する機構の解明：

実験期間中に細胞密度によって受容体サブタイプの発現パターンが変化することに着目し検討した。

(6) S1PおよびLPA産生酵素であるSpHk1およびAutotaxinの発現量の比較検討：

リゾリン脂質の定量は難しいため、胎盤脱落膜組織中SpHk1とAutotaxin発現量を免疫組織染色法により、妊娠高血圧腎症発症例および分娩週数を合わせたコントロール群で比較検討することで、それぞれS1PとLPAの発現量に差があるかどうかを検討した。

(7) リゾリン脂質受容体サブタイプの各種作動薬や拮抗薬の胎盤形成や胎児発育への効果 (*in vivo*での検討)：

ICRマウスに胎盤形成が完成する前のE7からS1P受容体拮抗薬JTE-013(0.2mg/kg)、FTY720(2mg/kg)を腹腔内に隔日投与を行い、E14に胎盤および胎児の重量を検討した。また、胎盤形成についても検討した。

4. 研究成果

(1) リゾリン脂質の受容体サブタイプおよび合成酵素の局在：

①絨毛細胞のマーカーであるCK7との共染色で検討したところ、LPA3受容体が脱落膜細胞のみならず、妊娠初期のEVTに局在していることを確認した(図1)。LPA1, LPA2の発現は弱かった。他方、Western blot法において、

Autotaxin の発現は EVT や絨毛組織にはほとんど認められず、脱落膜での発現が多かった。初代 EVT 培養の検討では、LPA3 と LPA6 の発現が有意に認められた。

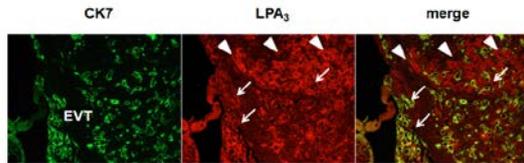


図 1: 妊娠初期における LPA3 の局在

②S1P1, 2, 3 が EVT 細胞株では発現を認めたが、S1P1, 3 のみが妊娠初期の EVT に発現を認めた。

(2) リゾリン脂質の受容体サブタイプの中で EVT 浸潤調節作用に関与しているサブタイプの同定 :

①LPA1 と LPA3 の受容体拮抗薬である Ki16425 の投与により、HTR-8/SVneo 細胞の浸潤が抑制されたことにより、LPA1 および LPA3 が浸潤促進に関与していることが示唆された。しかし、(1)の結果も考慮すると、主に LPA3 が浸潤促進に関与していることが示唆された。

②S1P においては、S1P2 のノックダウンにより細胞遊走抑制に S1P1 および S1P3 が遊走促進に作用していることが示唆された。(図 2)

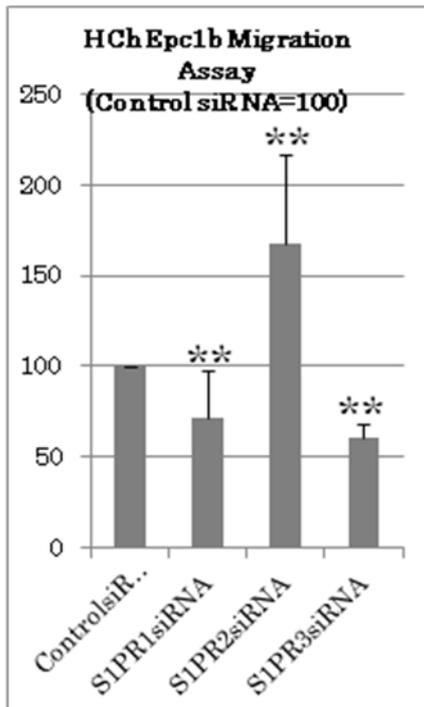


図 2 各種受容体サブタイプをノックダウンした際の遊走能への影響

なお、増殖能に関しては、受容体サブタイプのノックダウンにより有意な変化は認められなかった。

(3) リゾリン脂質による EVT 浸潤調節作用の解明 :

①LPA 投与により細胞シグナル伝達を検討したところ、ERK, Stat-3, Akt のリン酸化の充

進をみとめ、これらの阻害剤投与により LPA の浸潤促進作用を検討したところ、LPA の浸潤促進作用は一部および完全に抑制された。したがって、ERK, Stat-3, Akt のリン酸化が LPA の浸潤促進作用に関与していることが示唆された。(図 3)

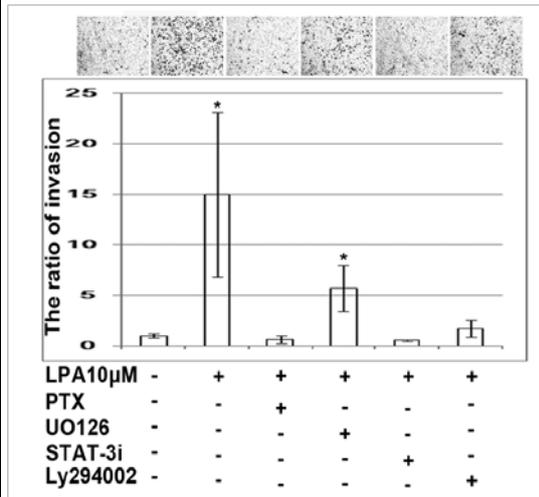


図 3 ERK リン酸化阻害剤(UO126), Stat-3 リン酸化阻害剤(Stat-3i), Akt リン酸化阻害剤(Ly294002) 添加時の浸潤作用への影響

②S1P 受容体サブタイプのノックダウンにより MMP-2 の発現変化は認められなかったが、S1P2 のノックダウンにより、MMP-9 は約 3 倍の有意な発現増加を認めた。したがって、S1P2 は MMP-9 の発現抑制することで、遊走能を低下させている可能性が示唆された。

(4) リゾリン脂質受容体サブタイプの各種作動薬や拮抗薬の絨毛浸潤への効果 (in vitro での検討) :

LPA の結果は(2)に上述したとおりである。S1P に関しては、siRNA の検討と同様に、S1P1 および S1P1/3 受容体拮抗薬投与で有意に細胞遊走能は低下し、S1P2 受容体拮抗薬投与で遊走能は亢進していた。以上の結果より、S1P2 受容体拮抗薬投与 (JTE-013) が、胎盤形成を改善する可能性が示唆された。

(5) EVT において S1P 受容体サブタイプ発現パターンが変化する機構の解明 :

HTR-8/SVneo 細胞での遊走能の結果が安定しないため、S1P 受容体サブタイプの発現パターンを検討した。その結果、細胞密度が高い培養条件では遊走能に抑制的に作用する S1P2 が強く発現し、S1P1, 3 は EVT のように細胞密度が低い条件下で高発現している結果が得られた (図 4)。これは、半定量 RT-PCR でも同様の結果が得られた。

以上の結果は EVT が細胞密度の高い cell column に存在している時期と脱落膜内に浸潤していく時期で S1P 受容体の発現パターンが異なっていることが遊走に関与している可能性が示唆された。細胞接着分子と S1P 受容体サブタイプの発現との可能性も示唆された。

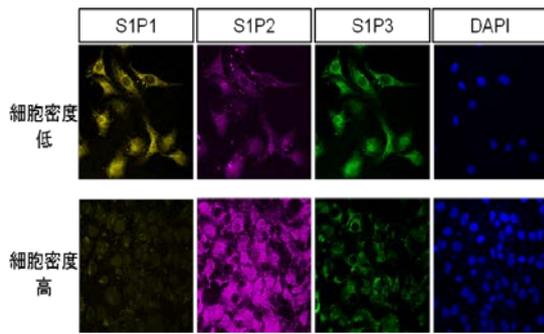


図4：S1P受容体サブタイプと細胞密度との関係

(6) S1P および LPA 産生酵素である SpHk1 および Autotaxin の発現量の比較検討：

いずれも脱落膜組織における発現量で免疫組織染色法では有意な変化が得られなかった。なお、分娩前後で卵膜における SpHk1 の発現は変化していることが判明し、陣痛発来機構にも関与していることがわかってきた。したがって、妊娠初期の胎盤形成期においては、これらの酵素の発現量が正常群と妊娠高血圧症候群などの胎盤低形成群では差がある可能性があるが、娩出後のサンプリングでは、他の影響もうけているために、以上のような結果となったのではないかと推測される。

(7) リゾリン脂質受容体サブタイプの各種作動薬や拮抗薬の胎盤形成や胎児発育への効果 (in vivo での検討)：

S1P2 拮抗薬 (JTE-013) では胎児重量の増加は認められなかったが、S1P1,3 拮抗薬 (FTY720) 投与により、胎児重量は有意に減少した。同様の結果が胎盤重量についても認められた。胎盤形成不全モデルとして FTY720 投与モデルが使用できる可能性が示唆された。

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 6 件)

1. Kotani T, Iwase A, Tsuda H, et al. (他 8 名、1 番目) Altered expression of enzymes regulating the activity of endothelin-1 in the lower segment of the human amnion during labor. *Biol Reprod.* 2013 Sep 5;89(3):52. 査読あり
2. Erkhembaatar LO, Kotani T, Sumigama S, et al. (他 9 名、2 番目) Increased expression of sphingosine kinase in the amnion during labor. *Placenta.* 2013 Apr;34(4):353-9. 査読あり
3. 小谷友美 炭竈誠二 津田弘之ら (他 3 名、1 番目) 胎児発育不全と胎盤産婦人科の実際 Vol.62 (8) 2013 p1065-1072 査読なし

4. Niimi K, Yamamoto E, Kotani T, et al. (他 7 名、5 番目) High expression of N-acetylglucosaminyltransferase IVA promotes invasion of choriocarcinoma. *Br J Cancer.* 2012 Dec 4;107(12):1969-77. 査読あり
5. Kotani T, Sumigama S, Tsuda H, et al. (他 9 名、1 番目) A case report of placental mesenchymal dysplasia with an increased VEGF-D expression. *Placenta.* 2012 Oct;33(10):888-91. 査読あり
6. Mano Y, Kotani T, Shibata K, et al. (他 7 名、2 番目) The loss of endoglin promotes the invasion of extravillous trophoblasts. *Endocrinology.* 2011 Nov;152(11):4386-94. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. 小谷友美ら(他 10 名 1 番目)：“炎症に起因する早産におけるエンドセリン(ET)-1 を制御する酵素の発現バランスについて” 第 66 回日本産婦人科学会学術講演会. (2014 年 4 月 20 日)東京国際フォーラム (東京都千代田区)
2. Tomomi Kotani et al. (他 7 名 1 番目)：“The new insights of preterm labor with chorioamnionitis(CAM).2014 SGI 61st Annual Scientific meeting (2014 年 3 月 28 日)。イタリア、フィレンツェ
3. 小谷友美ら(他 7 名 1 番目)：“絨毛浸潤の調節について” 第 19 回日本胎盤学会学術集会. (2011 年 10 月 1 日). 東京ステーションコンファレンス (東京都千代田区)
4. 小谷友美ら(他 10 名 1 番目)：“リゾリン脂質による絨毛浸潤機能の調節作用” 第 63 回日本産婦人科学会学術講演会. (2011 年 8 月 29 日). 大阪国際会議場 (大阪市)

[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