

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860396

研究課題名(和文) エズリンをシード遺伝子とする胎盤機能制御遺伝子ネットワーク解析

研究課題名(英文) Gene network analysis of placental function regulators and a seed gene, ezrin

## 研究代表者

西村 友宏 (NISHIMURA, Tomohiro)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：40453518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠時における胎児発育不全を回避するためには胎盤機能の解明が重要である。エズリンは胎盤に発現する細胞膜タンパク質の調節因子であり、エズリンの機能不全は胎児発育不全に繋がる。本研究はエズリンの機能不全が胎児発育不全を惹起する機構を解明するため、エズリンが作用する標的遺伝子と胎児発育不全関連遺伝子群との関連を情報学的および実験的に情報収集し、胎児発育不全関連遺伝子ネットワークを構築することを目的とした。エズリンは既知の胎児発育不全関連遺伝子との直接的な関係性は得られず、新規の機構により胎児発育不全を呈する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Placental function plays important roles in the fetal growth. Ezrin is a regulatory gene for plasma membrane proteins in the placenta, and deficiency of ezrin induces fetal growth retardation (FGR). This study aimed to clarify a gene network between ezrin and the other genes responsible for FGR by means of informatics and experiments in order to understand the molecular mechanism of the ezrin-mediated FGR. Network analysis showed no direct relationship between ezrin and the known FGR-related genes, indicating that ezrin-mediated FGR includes the novel molecular mechanism. We further analyzed protein interaction between Ezrin and a hypotaurine transporter, SLC6A13 in the placenta, since Ezrin knockout fetal mice showed deficiency of hypotaurine. Ezrin and SLC6A13 are co-localized on the plasma membrane in the labyrinth zone of mouse placenta. These results indicate that a novel interaction between Ezrin and SLC6A13 is important for fetal growth.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：胎児発育不全 血液胎盤関門 遺伝子ネットワーク

### 1. 研究開始当初の背景

胎児発育不全は胎児の 10%近くが示す状態であり、重度の発育不全は生命の危機がある。母体から胎児への栄養供給を司る胎盤には、栄養物を供給し、また胎児中の老廃物を排出する選択的方向性輸送が存在する。この選択的方向性輸送はトランスポーター遺伝子によって担われている。エズリンはトランスポーターの制御因子であり、細胞内での局在発現や輸送機能を調節する遺伝子ファミリー ERM タンパクのひとつである。我々はこれまでに胎盤においてはエズリンが ERM タンパクのうち発現量が高いことを見出し、さらにエズリン遺伝子欠損マウスにより、エズリン欠損胎児マウスは胎児発育不全を呈することを発見した。エズリン欠損胎児マウスの代謝物網羅的解析により、タウリンの前駆体であるヒポタウリンを欠乏すること、胎盤におけるヒポタウリン選択的方向性輸送には Na<sup>+</sup>および Cl<sup>-</sup>を駆動力とする Slc6a13 遺伝子ファミリーのサブタイプが関与することを示唆してきた。しかし、エズリン遺伝子欠損マウス胎児が胎児発育不全症状を呈する分子機構を不明であった。

一般に胎児発育に関係する胎盤因子には、IGF などの成長因子が重要とされ、エズリンの欠損が既知の胎児成長因子と関連するかを直接的に推定するのは文献情報のみからでは困難であった。そこで我々は文献情報に加えて、遺伝子相互の関係性が蓄積された遺伝子相互作用データベースを利用し、遺伝子同士の関係性を、エズリンを起点(シードジーン)とする遺伝子ネットワーク解析により解析することが必要であるとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

胎児発育不全の原因は不明であることが多いため、文献のみからでは予測不可能な新規の胎児成長機構の解明が必要である。我々はエズリンが原因となる胎児発育不全の分子機構を解明することにより、胎児発育不全に重要な遺伝子群を見出すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

遺伝子データベースを利用することにより、遺伝子同士の相互作用を抽出し、エズリンと相互作用し得る分子群の候補と(中継遺伝

子) 中継遺伝子と胎児発育不全関連遺伝子を連結し、遺伝子ネットワークとして構築することで胎児発育不全に関与する遺伝子を推定する。さらにエズリンとこれらの中継遺伝子群のそれぞれの役割と相互作用を実験的に検証する。

エズリン欠損において観察されているヒポタウリン欠乏の生理的意義を解明するため、胎盤細胞におけるヒポタウリンの細胞膜輸送および抗酸化効果、細胞保護効果を検討する。

### 4. 研究成果

遺伝子ネットワーク解析を行ったところ、既知の胎児発育不全関連遺伝子群は互いに相互作用し、ネットワークを形成することが示された。この遺伝子ネットワークにエズリンを起点として加えたところ、エズリンは胎児発育不全遺伝子ネットワーク外に存在し、エズリンの胎児発育不全関連遺伝子との直接的な関連は示されなかった(図1)。これは、遺伝子相互作用のデータには、細胞内タンパクなどの可溶性タンパクのデータが豊富であるのに対し、トランスポーターなどの不溶性タンパクの情報が少ないことが原因であることが推定された。そこで胎盤においてエズリンと相互作用する分子群を実験的に解析することにした。

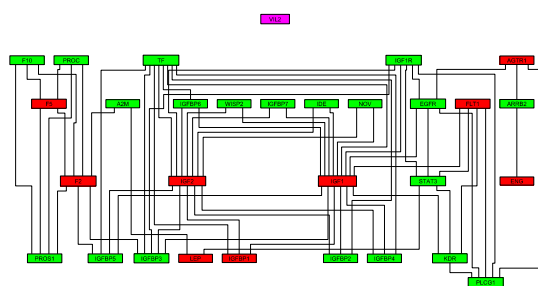


図1 推定された胎児発育不全関連遺伝子ネットワーク

紫: エズリン(遺伝子名 Vil2)

赤: 胎児発育不全関連遺伝子

緑: データベースから抽出された中継遺伝子

エズリンと相互作用する可能性の最も高い分子のひとつが Slc6a13 である。我々は胎盤組織を用いた免疫沈降においてエズリンと

Slc6a13 が相互作用することを見出した。さらに *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA)により、少なくともげっ歯類の胎盤においてはエズリンと Slc6a13 は特に妊娠中期に近接して存在することが示された。これらにより、エズリンは Slc6a13 と相互作用することが示唆された。エズリンの部分配列のうち、一般に N 末端側の FERM ドメインが標的タンパクとの相互作用に参与すると知られ、また、Slc6a13 の C 末端には ERM 相互作用モチーフ配列が存在することが認められるが、両者の部分配列同士のプルダウンアッセイにおいては相互作用するとの明確なデータは得られず、予測とは異なる箇所エズリンと Slc6a13 が相互作用する可能性が考えられた。さらにエズリンの FERM ドメインと胎盤細胞内のタンパクとの相互作用解析を検討中である。また、Slc6a13 の胎児発育不全関連遺伝子ネットワーク上の位置を明らかにすることはできなかった。これは、Slc6a13 のエズリンを含む他のタンパク質との相互作用情報が不足していることが原因と考えられた。また、エズリンおよび Slc6a13 の関与する胎児発育不全の分子機構は既知の文献で説明できない新規の機構である可能性が考えられた。

一方で、エズリン欠損胎児において欠乏が観察されたヒポタウリンの胎盤細胞に置ける生理的役割を検討した。ヒポタウリンは血漿中濃度が 10  $\mu$ M 程度であり、数百  $\mu$ M 存在するタウリンと比べると低濃度である。しかし、ヒポタウリンは化学構造上酸化されやすい構造をしており、抗酸化物質として機能しやすい。胎盤細胞を用いて、ヒポタウリンの細胞内動態および抗酸化物質としての機能を検討したところ、ヒポタウリンは胎盤細胞において細胞内での生合成より、細胞外からの取込み輸送が優位であり、主にトランスポーター機能により細胞内濃度が維持されていることが示された。さらに細胞内のヒドロキシラジカルおよびペルオキシラジカル捕集活性を示し、酸化ストレス負荷時において抗アポトーシス作用を示した (図 2)。

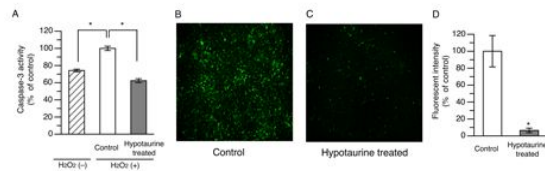


図 2 ヒポタウリンによる細胞保護および抗酸化作用

A, 過酸化水素による細胞毒性に対するヒポタウリンの抗アポトーシス作用

B, C, 過酸化水素による細胞内酸化ストレスに対するヒポタウリンの抗酸化作用

D, B および C の結果の定量的解析結果

以上により、エズリンを起点とする遺伝子ネットワーク解析は、トランスポーターなど不溶性タンパクを標的とするため、データベース解析にも限界があり、実験的データ解析の必要性が示された。エズリンが機能を調節する一部の遺伝子について、胎盤内における相互作用が示され、ヒポタウリン動態がエズリンによって調節される可能性が補完された。またヒポタウリンの胎盤細胞における抗酸化物質としての役割が示された。

## 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 8 件)

Tomi M, Eguchi H, Ozaki M, Tawara T, Nishimura S, Higuchi K, Maruyama T, Nishimura T, Nakashima E. Role of OAT4 in uptake of estriol precursor 16 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate into human placental syncytiotrophoblasts from fetus. *Endocrinol*, *accepted* (査読有り)  
 Noguchi S, Nishimura T, Fujibayashi A, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. OAT4-Mediated Transport of Olmesartan at Basal Plasma Membrane of Human Placental Barrier. *J Pharm Sci*, *in press* doi: 10.1002/jps.24434 (査読有り)

Nishimura T, Duereh M, Sugita Y, Yoshida Y, Higuchi K, Tomi M, Nakashima E. Protective effect of hypotaurine against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat placental trophoblasts. *Placenta*, 36: 693-698 (2015) doi: 10.1016/j.placenta.2015.02.014 ( 査読有り )

Nishimura T, Higuchi K, Sai Y, Sugita Y, Yoshida Y, Tomi M, Wada M, Wakayama T, Tamura A, Tsukita S, Soga T, Nakashima E. Fetal growth retardation and lack of hypotaurine in ezrin knockout mice. *PLoS One*, 9(8): e105423 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0105423 ( 査読有り )

Tomi M, Miyata Y, Noguchi S, Nishimura S, Nishimura T, Nakashima E. Role of protein kinase A in regulating steroid sulfate uptake for estrogen production in human placental choriocarcinoma cells. *Placenta*, 35: 658-660 (2014) doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.003 ( 査読有り )

Nishimura T, Yagi R, Usuda M, Oda K, Yamazaki M, Suda S, Takahashi Y, Okazaki F, Sai Y, Higuchi K, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. System A amino acid transporter SNAT2 shows subtype-specific affinity for betaine and hyperosmotic inducibility in placental trophoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1838(5): 1306-12 (2014) doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.004( 査読有り )

Nishimura T, Takanohashi T, Tomi M, Horikoshi M, Higuchi K, Sai Y, Nakashima E. Evaluation of rat in vivo fetal-to-maternal transfer clearances of various xenobiotics by umbilical perfusion. *J Pharm Sci*. 102(9):3356-63 (2013) doi: 10.1002/jps.23551 ( 査読有り )

Oda K, Nishimura T, Higuchi K, Ishido N, Ochi K, Iizasa H, Sai Y, Tomi M, Nakashima E. Estrogen receptor  $\alpha$  induction by mitoxantrone increases Abcg2 expression in placental trophoblast cells. *J Pharm Sci*. 102(9):3364-72 (2013) doi: 10.1002/jps.23549 ( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

Nishimura T, Araki H, Takaki Y, Tomi M, Nakashima E. Distribution of hypotaurine transporter, SLC6A13, in placental trophoblasts during mid to late pregnancy. International Society for the Study of Xenobiotics, 29<sup>th</sup> JSSX /19<sup>th</sup> North-American ISSX Meeting (2014.10.19-10.23, San Francisco, USA)

西村友宏、小島和晃、高木良也、荒木光、登美斉俊、中島恵美. Slc6a13 の胎盤における発現分布とヒポタウリン取込み輸送による酸化ストレスからの細胞保護第 9 回トランスポーター研究会年会、名古屋、平成 26 年 6 月

西村友宏、荒木光、小島和晃、登美斉俊、中島恵美. ヒポタウリントランスポーター Slc6a13 の胎盤における発現と細胞保護作用日本薬剤学会第 29 年会、大宮、平成 26 年 5 月

Nishimura T, Tomi M, Nakashima E. Hypotaurine transporter contributes to cytoprotection in placental trophoblasts from oxidative stress. 5<sup>th</sup> Asia Pacific ISSX Meeting 2014 (2014.5.9-12, Tianjin, China)

Nishimura T, Tomi M, Nakashima E. Rat in vivo fetal-to-maternal transfer clearances of various xenobiotics classified by biopharmaceutical drug disposition classification system (BDDCS). Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013 (2013.11.20-22, Jeju, Republic of Korea)

Nishimura T, Tomi M, Nakashima E. Rat in vivo fetal-to-maternal transfer

clearances of various xenobiotics by  
umbilical perfusion. 10<sup>th</sup>  
International ISSX Meeting  
(2013.9.29-10.3, Toronto, Canada)

西村友宏、杉田友紀、Mariam Duereh、  
登美齊俊、中島恵美. ヒポタウリンの胎  
盤での生理的濃度維持における細胞膜  
輸送の寄与および活性酸素除去作用.  
日本薬剤学会第 28 年会、名古屋、平成  
25 年 5 月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

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

西村 友宏 (NISHIMURA, Tomohiro)

慶應義塾大学・薬学部・専任講師

研究者番号：40453518