

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450445

研究課題名(和文) 栄養膜細胞のダイナミズムにおける膜結合型メタロプロテアーゼの細胞機能的関与

研究課題名(英文) Distribution and function of ADAMDEC-1 in the mouse placenta

研究代表者

日下部 健 (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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ADAM-like decysin(ADAMDEC)-1はマウスの胎盤で発現していることが報告されているが、具体的な妊娠生理学的役割・意義は不明である。本研究では、マウス胎盤におけるADAMDEC-1の発現動態を調べ、血管内皮細胞および胎盤内血管系に着目した機能解析を行った。ADAMDEC-1は胎盤において、主に子宮NK細胞で産生・分泌され、血行性に子宮ラセン動脈、胎子毛細血管へ移行し、管腔の拡張または血管新生に関与していると考えられた。ADAMDEC-1は胎盤の物質交換領域での血流路増加、血流量上昇作用を有し、妊娠の成立・胎子の成長に寄与すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Existence of a disintegrin and metalloprotease-like decysin (ADAMDEC-1) has been confirmed in the mouse placenta, but their reproductive function is unclear. We examined ADAMDEC-1 regarding the distribution and appearance patterns in the normal mouse placenta and effects on the placental capillaries and epithelial cells. This study showed the possibilities that ADAMDEC-1 is produced from the uterine NK cells in mouse placentas. Uterine NK cells seemed to release ADAMDEC-1 to maternal blood circulation and transit to fetal side of placenta. ADAMDEC-1 may help placental vasodilation and angiogenesis, and promote nutritional exchanges and fetal growth in placenta.

研究分野：細胞生物学

キーワード：metalloprotease ADAM uterine NK cells placenta vasodilation angiogenesis

### 1. 研究開始当初の背景

メタロプロテアーゼに属する A disintegrin and metalloproteinase-like decysin (ADAMDEC)-1 は、以前からマウス胎盤内での発現が確認されていた (引用文献①)。ADAMDEC-1 はタンパク分解機能以外に、様々な機能を潜在的に有し、インテグリンの機能干渉による細胞接着阻害、”regulated intramembrane proteolysis (RIP)作用”による生理活性因子の作用調節、細胞内シグナルの増強作用、細胞骨格因子の形成に関与する可能性を持つ (引用文献②)。研究代表者らの先行研究から、ADAMDEC-1 が流産誘導時に胎盤内で発現増加していることが分かり、流産誘導メカニズム、または妊娠生理機序において、ADAMDEC-1 が重要な役割を担っている可能性を示唆していた (引用文献③)。

### 2. 研究の目的

ADAMDEC-1 のマウス胎盤での動態変化、胎盤形成期における生理機能を調べ、正常な妊娠の成立・維持に関わる役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 正常妊娠過程のマウス妊娠子宮における、ADAMDEC-1 の発現動態を調べた。

(2) CBA/J メスマウスと DBA/2 オスマウスを交配すると、免疫寛容性の消失に依存する自然流産が発症する。この流産モデルマウス (CBAxDBA) の妊娠子宮における、ADAMDEC-1 の発現動態を調べた。

(3) ADAMDEC-1 の遺伝子情報はマウスとヒトのみ確認されているが、他の哺乳動物にも相同性タンパクの存在が示唆されている (引用文献④)。家畜や野生動物の胎盤からタンパクを抽出し、生化学的解析によって、マウス ADAMDEC-1 相同性タンパクの家畜および野生動物胎盤での分布状況を確認した。

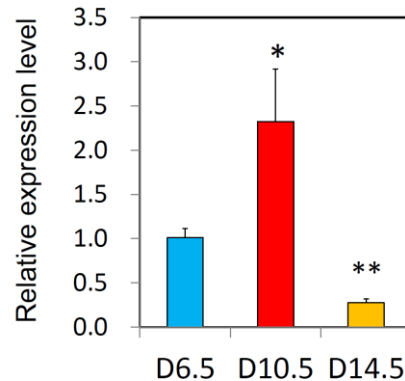
(4) ADAMDEC-1 と胎盤内血管の拡張または新生との関係性を調べるため、ヒト臍静脈内皮細胞株 (HUEhT-1) を用いた。HUEhT-1 は同じく臍静脈株 HUVEC のテロメラーゼを欠損させ、増殖率を高めた細胞株である。HUVEC と同じく、マトリゲルをコートしたディッシュにおいて管腔様構造を形成し、血管形成作用の評価に用いられる。培養液内にリコンビナント ADAMDEC-1 タンパクを 10、100、1000ng/mL で添加し、管腔様構造と細胞増殖能を調べた。

(5) マウスの腋窩にマトリゲルを注入し、血管の新規形成、浸潤性、拡張作用について評価を行った。マトリゲルには VEGF を 5ng/mL 添加し、実験群にはさらに ADAMDEC-1 タンパクを 100ng/mL を加えた。注入して 10 日後にマトリゲルを採材し、クリオスタット切片を作成して新規血管および周辺組織の既存血管を観察した。

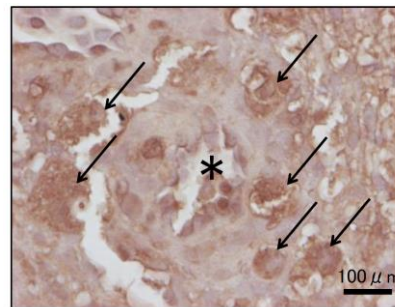
(6) 妊娠 11.5 日、12.5 日、13.5 日において、マウスにリコンビナント ADAMDEC-1 タンパクを腹腔内投与し、妊娠 14.5 日に胎盤を採取した。抗 ADAMDEC-1 抗体、および血管内皮に反応する Isolectin-B4 を用いた免疫組織化学染色、形態解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) リアルタイム PCR の結果、ADAMDEC-1 はマウス正常妊娠過程の 10.5 日目にピークを示すことが分かった (下図)。



胎盤での ADAMDEC-1 の局在を免疫染色で調べると、間膜腺領域における子宮 NK 細胞に強い陽性反応が認められた (下図、矢印)。そ

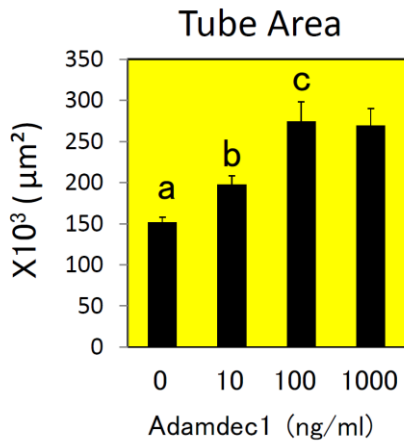


の他、胎盤迷路部において、栄養膜合体細胞、および胎児血管内皮細胞に ADAMDEC-1 の陽性反応が確認された。子宮 NK 細胞は、胎盤形成期に子宮ラセン動脈 (上図\*) のリモデリングに関わり、胎盤の血流路形成に関わるとされている。胎児血管内皮細胞での陽性反応と合わせて、ADAMDEC-1 は、胎盤の血管経路再構成に何らかの働きをもつと示唆された。

(2) 流産モデル CBAxDBA マウスの胎盤における ADAMDEC-1 の発現量を調べた。対照群の妊娠マウスと異なり、CBAxDBA マウスは妊娠の経過に伴う ADAMDEC-1 の発現低下が観察できず、妊娠後期においても ADAMDEC-1 の高発現が維持されていた。子宮ラセン動脈の管腔長を測定すると、妊娠後期のラセン動脈は、CBAxDBA の方が対照マウスより有意に大きいことが分かった。ADAMDEC-1 は子宮ラセン動脈の拡張を誘導し、CBAxDBA マウスでは、流産発症に対抗する救助反応に関与している可能性が考えられた。

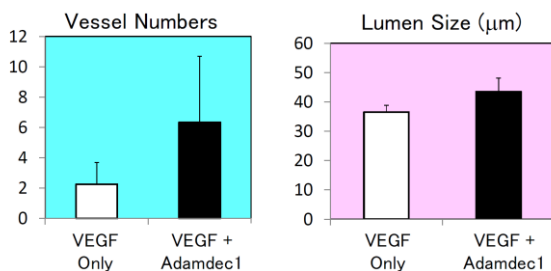
(3) ブタ、ウマ、キリン、バンドウイルカ、イヌ、ニホンザル、チンパンジーの胎盤を用い、ADAMDEC-1 のホモロジータンパクの存在を確認した。抗マウス ADAMDEC-1 抗体によるウェスタンブロット解析の結果、ブタ、ニホンザル、チンパンジーに可能性のあるバンドが検出された。血絨毛膜型胎盤を有する動物からの検出率が高く、栄養膜細胞の浸潤と ADAMDEC-1 との関りが示唆された。他の胎盤組織型を示す動物でも検出されており、哺乳動物の胎盤に比較的安定して、ADAMDEC-1 ホモロジータンパクが保存されている可能性が示唆された。

(4) ヒト臍静脈内皮細胞株 HUEhT-1 は、ADAMDEC-1 の添加濃度に依存して、管腔様構造の面積を拡大させた (下図、異なるアルファベット間は有意差ありを示す)。NAD 脱水素酵素測定色素 CCK8 を用いて調べたところ、ADAMDEC-1 添加により、HUEhT-1 の細胞増殖能はむしろ低下した。ADAMDEC-1 による管腔



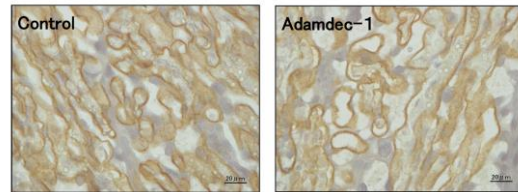
様構造の拡張は細胞増殖に依存せず、細胞の伸長に関連する可能性が示唆された。

(5) マウスの腋窩に埋入した VEGF 含有マトリゲルプラグには、10 日後に毛細血管の新規浸潤が観察されたが、ADAMDEC-1 の追加添加によりその数は増加傾向を示した (下左図)。マトリゲルプラグ周囲の脂肪組織に含まれる既存血管を観察すると、ADAMDEC-1 の追加添加により、その管腔直径が増大した (下右図)。

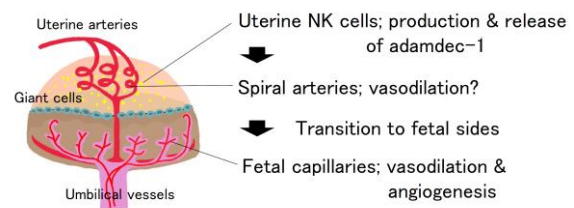


(6) ADAMDEC-1 による胎盤内血管系への影響を調べた。ADAMDEC-1 投与により、胎盤内の抗 ADAMDEC-1 抗体の反応性は投与群で 5%

程度増加した。投与群の胎盤では、胎盤迷路部における胎子側毛細血管のサイズが増加した (下図)。形態計測の結果、対照群と比較して、ADAMDEC-1 投与群の毛細血管の直径が 10~25% 程度増加した。



以上の成果より、ADAMDEC-1 は主に子宮 NK 細胞で産生・分泌され、血行性に子宮ラセン動脈、胎子毛細血管へ移行し、管腔の拡張または血管新生作用を介して胎子発生・発育促進に関与していると考えられる (下図)。



一方で、ADAMDEC-1 の血管伸長作用に関し、詳細なメカニズムは不明である。栄養膜細胞の浸潤機能、子宮 NK 細胞の接着作用などへの関与も十分予測され、今後の継続的な研究の取り組みが必要である。

#### <引用文献>

- ① Baran, et al., Biol. Reprod. 68: 1787, 2003
- ② Edwards, et al., Mol. Aspects of Med. 29:258, 2008
- ③ Kusakabe et al. Fertil. Steril. 90 (Suppl 2): 1451, 2008.
- ④ UniProt: <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=adamdec-1&sort=score>

#### 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 Tachibana T, Kusakabe KT, Osaki S, Kuraishi T, Hattori S, Yoshizawa M, Kai C, Kiso Y. Histochemical specificities of adrenal cortex in the New World Monkeys, Aotus lemurinus and Saimiri boliviensis. J Vet Med Sci, 78(1): 161-165, 2016. DOI:10.1292/jvms.15-0290. 査読有
- ② Bui TTN, Luziga C, Yamamoto M, Kusakabe KT, Yamamoto Y. Identification and characterization of the interactive proteins with cytotoxic T-lymphocyte antigen-2α.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79 (4), 587-597, 2015. DOI: 10.1080/09168451.2014.991686. 査読有

- ③ Hiyama M, Kusakabe KT, Takeshita A, Sugi S, Kuniyoshi N, Imai H, Kano K, Kiso Y. Nutrient starvation affects expression of LC3 family at the fetomaternal interface during murine placentation. J Vet Med Sci, 査読有, 77 (3): 305-311, 2015. DOI: 10.1292/jvms.14-0490. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 永岡織江、日下部健、国吉信恵、武下愛、加納聖、木曾康郎. メタロプロテアーゼ ADAMDEC-1 の胎盤における分布動態と血管への作用. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017. 3. 28-30. 長崎大学坂本キャンパス、長崎県長崎市.
- ② Ken Kusakabe, Yuji Yoshida, Yoshiki Itoh, Takeshi Kuraishi, Shin-Ichi Yokota, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Yasuo Kiso. Retinal specificities in Aotus monkeys. 9th International Meeting of Conference on Conservation Medicine in Taipei, Taiwan. October 21-24, 2016
- ③ 永岡織江、日下部健、国吉信恵、武下愛、加納聖、木曾康郎. マウス胎盤における adamdec-1 の局在と機能. 第 159 回日本獣医学会. 2016. 9. 6-9. 日本大学生物資源科学部、神奈川県、藤沢市.
- ④ 花田 紗季、日下部 健、武下 愛、加納 聖、木曾 康郎 マウス胎盤における補体制御因子 Crry の発現 2015. 10. 24-25 日本解剖学会中国・四国支部学術集会 愛媛大学医学部、愛媛県東温市.
- ⑤ Saki Hanada, Ken Takeshi Kusakabe, Ai Takeshita, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso. Expression of the complement regulator Crry in the mouse placenta. 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2015. 2. 12-13. Bali, Indonesia.

[図書] (計 0 件)

[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

- ① ResearchGate：  
[https://www.researchgate.net/profile/Ken\\_Kusakabe](https://www.researchgate.net/profile/Ken_Kusakabe)
- ② 山口大学共同獣医学部・教員紹介：  
<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

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

木曾 康郎 (KISO, Yasuo)  
山口大学・共同獣医学部・教授

加納 聖 (KANO, Kiyoshi)  
山口大学・共同獣医学部・准教授

武下 愛 (TAKESHITA, Ai)  
和歌山医大・医学部・任期付研究員