

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26462483
 研究課題名(和文) プロテアーゼ活性化受容体 細胞内シグナル伝達系を介した絨毛細胞障害修復機構の検討

 研究課題名(英文) The injury and repair system in trophoblast cells through protease-activated receptor and signal transduction.

 研究代表者
 杉村 基 (Sugimura, Motoi)

 浜松医科大学・医学部・教授

 研究者番号：30273189

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳性麻痺の原因の一つである胎児発育不全には過凝固 高サイトカイン血症が病態の一部にある。この病態は妊娠初期の胎盤形成に重要な役割を演じていると考えられ、最終的に胎盤形成機能不全となる。ただ、過凝固 高サイトカイン 炎症系ネットワークがどのように初期絨毛細胞の胎盤形成に関与するのかはこれまで明確でなかった。本研究ではTNF- α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインにより、HTR-8SVneo(絨毛外絨毛細胞株)で生理的に発現しているPAR-2発現が抑制されたことより、胎盤初期絨毛の胎盤構築の抑制に炎症性サイトカインが直接関与していることを一部示し、胎盤形成機能不全の病態解明つながるものである。

研究成果の概要(英文)：Fetal growth restriction (FGR) is one of the causes of cerebral palsy. Previous research on the pathophysiology of FGR has suggested that the maternal hypercoagulability-systemic inflammatory cytokinemia is one of the key players in the placentation in the early phase of pregnancy. This disturbed process of placentation could lead to the placental dysfunction in FGR. However, it has remained unclear how the hypercoagulability- systemic inflammatory cytokinemia-inflammation network modulates the early placentation. In this project, we have shown that the down-regulation of PAR (protease-activated receptor)-2 expression in both TCL-1 cells and HTR-8/SVneo cells (placenta-derived immortalized human trophoblast) is TNF-alpha dependent. The data presented in the reports may indicate that, in early phase of placentation, the suppressed expression of PAR-2 by inflammatory cytokine, plays roles in pathogenesis of dysfunctional placentation leading to preeclampsia.

研究分野：産科学

キーワード：PAR-2 sFLT1 trophoblast preeclampsia

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎児発育不全 (FGR:fetal growth restriction) と脳性麻痺の原因としての意義

抗リン脂質抗体症候群 (APS) 合併妊娠では高頻度に妊娠高血圧症候群 (PIH) を合併し過凝固 高サイトカイン血症を伴い、多くの例で FGR を合併する。過凝固 高サイトカイン血症を示す FGR モデルの検討はそのまま新生児医療における児の予後改善に結びつく可能性がある。

APS の胎盤病理所見は主として梗塞像と合体体栄養膜細胞周囲にフィブリン沈着を示し、PIH 合併例では絨毛壊死、合体体結節の増加を示す虚血性病変といった特徴を示す。臨床的にはヘパリンを妊娠初期から投与導入することで、FGR の改善と生児獲得率の大幅な改善が報告されており、血栓形成抑制による絨毛細胞障害の改善が理由と考えられてきている。

(2) ヘパリン硫酸/ヘパリンと VEGF、HGF、EGF-like EGF などの増殖因子 - 受容体 - シグナル伝達系ネットワークの増殖、分化、浸潤、移動への関与

胎盤由来ヒト不死化絨毛細胞を用いて、ヘパリン硫酸/ヘパリンの受容体である CD44 splice variant isoform-3 を介し、増殖因子を介さず直接 PAK 1 リン酸化を惹起、細胞遊走、創傷修復を促進する現象はトロンピン抑制とは異なる機序による絨毛細胞障害修復調節機構が存在することを示す興味深い観察がある。

過凝固惹起 FGR マウスモデルでヘパリンによる病態改善を示す観察がある。

絨毛細胞障害を惹起した SOCS-knockout mouse モデルにおいてマウス絨毛細胞幹細胞により機能を再生した実験がある。

(3) 過凝固 高サイトカイン 炎症系ネットワークに曝され障害を受けた絨毛細胞の、細胞周囲微小環境における病態を形成と細胞組織障害の修復

細胞周囲に存在する増殖因子、サイトカイン、受容体、酵素は不活化前駆体として存在しており、タンパク分解酵素によるペプチド結合切断によって活性化型への変換がなされる。活性化には chymotrypsin 型セリンプロテアーゼといった分泌型酵素、urokinase-type plasminogen activator 型といった膜受容体結合型酵素、膜架橋型メタロプロテアーゼ、膜架橋型セリンプロテアーゼなどの多様なタンパク分解酵素が細胞膜周囲微小環境で重要な役割を演じている。

プロテアーゼ活性化受容体群 (protease-activated receptors; PARs) は 7 回膜貫通構造を有し細胞外シグナルを細胞内へと伝達する G タンパク質共役受容体に属す。セリンプロテアーゼによりペプチド鎖が切断され、新たに形成された N 末端構造が "tethered ligand" として細胞外第 2 ループに結合し細胞内への情報伝達が行われる特

異な形式をとっている。PAR は 1 から 4 までのサブタイプが存在し、PAR-1 は血小板活性化時のトロンピン受容体として当初クローニングされ、その後トロンピン、トリプシン、カセプシン G により活性化される PAR-3、PAR-4 がクローニングされている。

トロンピンでは活性化されず、chymotrypsin 型セリンプロテアーゼにより活性化される PAR-2 は炎症系メディーエータにより発現が増強し、炎症に極めて密接に関連する。循環器系、神経系のみならず、がん細胞など全身多彩な細胞組織に発現し、活性化に伴うシグナル伝達により、細胞の移動、接着、増殖など多様な生理活性を示す。こうした点から PAR-2 は凝固現象と炎症過程を直接結び付ける重要な受容体と位置付けられる。

過凝固 高サイトカイン 炎症系ネットワークにさらされ障害を受けた絨毛細胞におけるセリンプロテアーゼ PAR-2 - 炎症系ネットワーク解明による絨毛細胞組織修復と FGR の病態改善。

2. 研究の目的

胎盤由来ヒト不死化絨毛細胞を用いて chymotrypsin、chymotrypsin inhibitor、合成 PAR-2 アゴニスト、アンタゴニストが VEGFR variant form である soluble FLT1 発現、産生を有意に制御する興味深い現象に基づき、PAR-2 依存性の情報伝達系活性化と細胞周囲に存在するセリンプロテアーゼの関与を検討。

血管透過性に加え炎症系ネットワークが、PIH-FGR の病態形成における絨毛細胞障害と修復調節機構に関与を明らかにする。

絨毛細胞膜に存在する PAR 群 - 細胞内シグナル伝達系を介し障害を受けた絨毛細胞自身が局所でどのような調節機序について検討。

3. 研究の方法

胎児発育不全 (FGR) の機序解析を目的として過凝固 - 高サイトカイン 炎症系の観点からプロテアーゼ活性化受容体 PAR-2 を介した絨毛細胞障害と修復の検討。

1) ヒト不死化絨毛細胞株並びにヒト胎盤絨毛初代培養細胞を用いて各種サイトカイン (IL-1、IL-6、TGF-beta、TNF-alpha) 存在下で PAR-2 発現の検討。

2) サイトカイン存在下で PAR-2 細胞内シグナル伝達分子リン酸化の動態確認。PAR-2 アンタゴニストを用いてシグナル伝達分子のリン酸化動態から機能解析

3) 妊娠初期絨毛での PAR-2 発現の検討。

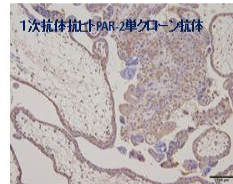
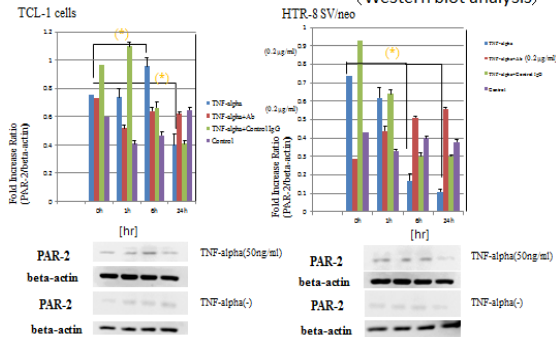
4. 研究成果

TNF- により TCL-1/PAR-2 タンパク発現は 24 時間後約 50% に低下、HTR-8/SVneo では同約 13% に低下、また同抑制は抗 TNF- 多クローン抗体 (0.2 μg/ml) により抑制された。non-immune control IgG 存在下では PAR-2 発現は一定で変化なかった。

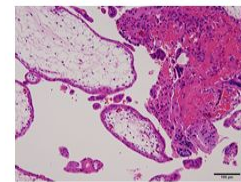
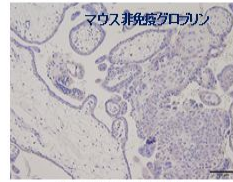
TCL-1 PAR-2 mRNA は TNF-、IL-1 により

約 20% 減少するが、HTR-8SV/neo では PAR-2mRNA は約 50%減少した。

TNF-alpha存在下での PAR-2 発現の経時的変化 (Western blot analysis)



妊娠絨毛組織 (妊娠7週) における PAR-2 発現

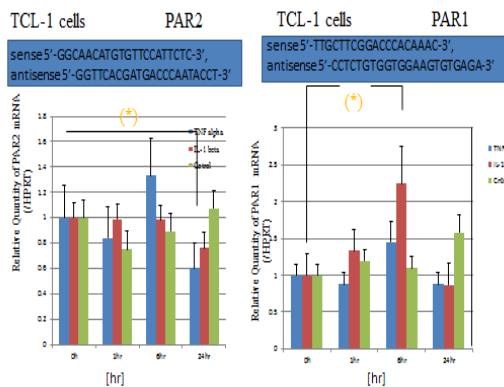


免疫組織学的染色(ABC法)

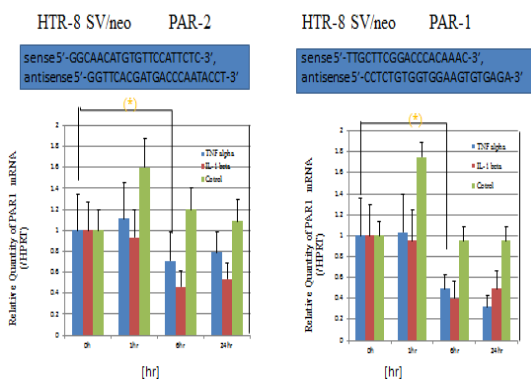
HE染色

TNF-、IL-1 により、特に HTR-8SV/neo では、生理的に発現している PAR-2 発現が抑制されたことより、EVT の細胞移動が抑制される可能性がある。このことは胎盤初期絨毛の胎盤構築に炎症性サイトカインが関与していることを示す可能性があり、胎盤形成機能不全の病態解明に貢献する。

TNF-alpha または IL-1 beta 存在下での PAR-2,1 mRNA 発現の経時的変化 (RT-PCR)



TNF-alpha または IL-1 beta 存在下での PAR-2,1 mRNA 発現の経時的変化 (RT-PCR)



PAR-2 発現は cytotrophoblast に強く局在を示した。syncytiotrophoblast には局在を認めなかった。

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)

Hirai C, Sugimura M, Makino S, Takeda S. Chymotrypsin enhances soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFLT1) production through protease-activated receptor (PAR-2) in placenta-derived immortalized human trophoblast cells. *Reprod Sciences* 11;1542-50. 2016

Sugimura M. Is thrombin a "toxin" in the pathogenesis of preeclampsia? *Hypertens Res Pregnancy* 3:13-18. 2015

Narumoto K, Sugimura M, Saga K, Matsunaga Y. Changes in pelvic shape among Japanese pregnant women over the last 5 decades. *J Obstet Gynaecol Res*. Doi:10.1111/jog.12778 2015

(雑誌論文)(計 3 件)

(学会発表)(計 0 件)

(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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉村 基 (SUGIMURA, Motoi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：30273189

(2) 研究分担者

鳴本敬一郎 (NARUMOTO, Keiichiro)
浜松医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：90647603

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()