

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462493

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の病態形成にはトロホプラストに発現するHMGA1が関与している

研究課題名(英文) Role of HMGA1 on the pathogenesis of preeclampsia

研究代表者

松原 圭一 (Matsubara, Keiichi)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80263937

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)：着床から3日目にはembryoの周りに絨毛細胞がみられ、妊娠高血圧症候群モデルマウスでは細胞質もHMGA1で染まり、一部は細胞外に放出されていた。ヒト妊娠高血圧症候群患者胎盤ではHMGA1が核から細胞質内に移行していた。DCAによって核から細胞質へHMGA1を移行させると絨毛外トロホプラストの浸潤能は低下した。正常妊娠の着床期では、絨毛外トロホプラストが母体の脱落膜・筋層の一部に浸潤するが、妊娠高血圧症候群では浸潤が阻害されている。HMGA1の核外移行は絨毛外トロホプラストの浸潤能を阻害することによって妊娠高血圧症候群の病態形成に関与している。

研究成果の概要(英文)：On the third day after the implantation, trophoblastic cells were aggregated around the embryo and HMGA1 was observed in the cytoplasm as well as the nuclei derived from the preeclampsia model mouse. A part of HMGA1 was also released out of the cells by the implantation site. Furthermore, HMGA1 was transported into the cytoplasm from the nuclei in the human preeclamptic placenta. We demonstrated that DCA could stimulate the transportation of HMGA1 from nuclei to cytoplasm. In culture system, DCA decreased the proliferation and invasive capacity of extravillous trophoblast. In normal pregnancy, extravillous trophoblasts could invade into maternal decidua and uterine myometrium resulted in increased utero-maternal circulation to maintain the pregnancy. However, it is known that the effects were reduced in preeclampsia. Extra nuclear transport of HMGA1 is involved in the pathogenesis of preeclampsia through inhibiting extravillous trophoblasts invasion.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠高血圧症候群 血管内皮 絨毛細胞 高血圧

1. 研究開始当初の背景

受精卵が子宮内膜に着床した後、サイトトロホプラストの一部は絨毛外トロホプラストに分化し、Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)などを産生して細胞外マトリックスを分解しながら子宮の脱落膜や筋層内に浸潤する。絨毛外トロホプラストの浸潤はらせん動脈の re-modeling を促進し、豊富な子宮胎盤循環を形成することによって妊娠の維持に寄与している。しかしながら、妊娠高血圧症候群では、絨毛外トロホプラストの浸潤が障害されることによってらせん動脈の re-modeling がうまくいかないことで、子宮胎盤循環の形成が抑制された結果病態が形成されると考えられている。しかしながら、この絨毛外トロホプラストの浸潤のメカニズムについてはよく分かっていない。high mobility group AT-hook 1 (HMGA1) は癌細胞などの増殖や浸潤に関与していることが知られているが、絨毛細胞に関する報告はほとんどない。我々は、本研究で HMGA1 が絨毛外トロホプラストの浸潤能にどのような役割を果たしているのかについて検討することによって、妊娠高血圧症候群の病態形成における HMGA1 の作用について解明する。

2. 研究の目的

MMP-9 の発現は HMGA1 との関連性が報告されており、細胞の浸潤能への HMGA1 の関与が推測される。更に、サイトトロホプラストが絨毛外トロホプラストに分化する際に、HMGA1 は核から細胞質内に移動することも報告されている。本研究では、まず、妊娠高血圧症候群において HMGA1 がどのような発現や分布をしているのかについて検討を行い、正常妊娠と妊娠高血圧症候群との間にその分布の差があるかどうかについて検討する。その結果、HMGA1 の発現に差があると判断された場合、発現した細胞に注目し、もし、トロホプラストに発現が認められた場合、トロホプラスト、特に絨毛外トロホプラストの増殖や浸潤に HMGA1 がどのような役割を果たしているのかについて検討を行う。HMGA1 は一般的には、核外への移行や細胞外への分泌は行われないとされているが、絨毛細胞に関しては、例外的な機能が果たされているのではないかと仮説を元に本研究を行う。また、妊娠の成立にどのような役割を果たしているのかについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 妊娠高血圧症候群患者胎盤における HMGA1 の発現・分布について免疫染色を用いて評価する。

(2) 我々が独自に開発した CD40-ligand

による妊娠高血圧症候群モデルマウスを用い、受精卵の子宮移植後 3 日における着床部位での HMGA1 の発現・分布について正常妊娠マウスと比較する。

(3) 絨毛外トロホプラストの浸潤能に与える HMGA1 の影響について検討するため、wound healing assay や transwell migration assay を用いて細胞の浸潤能について解析する。この際、HMGA1 の siRNA・cDNA を絨毛外トロホプラストに導入した後、同様の研究を行う。

(4) DCA を絨毛外トロホプラストに添加することによって HMGA1 が核外移行するかどうかについて検討する。更に、核外移行するならば、real time PCR・western blotting によって HMGA1 の DNA・蛋白の発現について検討する。また、細胞外への HMGA1 分泌があるかどうかについて ELISA を用いて検討する。さらに絨毛外トロホプラストの浸潤能・増殖能に DCA が与える影響について検討する。

4. 研究成果

(1) 妊娠高血圧症候群患者胎盤において、HMGA1 は絨毛外トロホプラストに発現しており、正常妊婦胎盤ではその核のみに発現していたものが、妊娠高血圧症候群患者胎盤では細胞質にも発現していた。この結果から、HMGA1 の細胞内での分布が妊娠高血圧症候群の病態形成に何らかの影響を与えていることが推測された。

(2) 我々の妊娠高血圧症候群モデルマウスでは着床後すぐの状態をも研究できる世界でも類のないモデルマウスである。このモデルマウスを用いた実験によって、受精卵の子宮内移植から 3 日目には embryo の周りに絨毛細胞が集簇し、妊娠高血圧症候群モデルマウスでは、embryo 周囲に集簇したトロホプラストの核だけでなく細胞質にも HMGA1 が発現していることが分かった。さらにこのマウスでは HMGA1 が細胞外にも放出されていた。正常妊娠マウスでは HMGA1 はトロホプラストの核内のみ発現しており、ヒトの胎盤と同様に妊娠高血圧症候群において明らかな HMGA1 のトロホプラストにおける発現の違いが認められた。また、この反応にはヒトとマウスとの間に違いがないことも分かった。

(3) 培養絨毛外トロホプラストの核には HMGA1 が強く発現していることが分かったが、wound healing assay において培養 dish で培養した絨毛外トロホプラストにスクラッチを加えた際に傷の周囲の細胞では核外への HMGA1 の移行が認められた。siRNA や DNA による実験によって、HMGA1 は癌細胞に対する作用と同様に、絨

毛外トロホプラストにおいてもその増殖や浸潤能を促進する作用を有していた。この反応は HMGA1 が核内に存在するときに強く作用すると考えられた。

(4) DCA は HMGB1 を核外移行する作用を持っていることから、HMGA1 も核外移行させるのではないかと考え、実験を行ったところ 絨毛外トロホプラストにおいても DCA によって核から細胞質へ HMGA1 を移行させることができた。さらに DCA によって HMGA1 を核外移行させた細胞を用いた wound healing assay や transwell migration assay によって絨毛外トロホプラストの浸潤能が低下することが分かった。HMGA1 は細胞の増殖や浸潤能を促進するように作用することが知られているが、HMGA1 が核から細胞質に移行することによってその作用が抑制されることが分かった。しかし、その作用は western blotting や real time PCR また、ELISA によって証明することが出来なかった。何らかの実験系の問題があると考えられるため、今後更に原因を突き止め、追加実験を行っていく予定である。

(5) 正常妊娠の着床期では、絨毛外トロホプラストが母体の脱落膜・筋層の一部に浸潤することによって十分な血液を胎盤に輸送することが出来るようになり、妊娠の維持に働いているが、妊娠高血圧症候群ではこの絨毛外トロホプラストの浸潤が阻害されていることが知られている。今回の研究でみられた HMGA1 の核外移行は絨毛外トロホプラストの浸潤能を阻害することによって妊娠高血圧症候群の病態形成に関与していることを世界で初めて示すことが出来た。

(6) 今後は、他に HMGA1 の核外移行を促進することが出来る物質を探し、その物質の投与によって妊娠高血圧症候群を発症させることが出来るかどうかについて検討する。更に、逆に HMGA1 の核外移行を抑制する因子を探して、妊娠高血圧症候群の予防あるいは治療について検討を行っていきたい。

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 2 件)

1. Uchikura Y, Matsubara K, Muto Y, Matsubara Y, Fujioka T, Matsumoto T, Sugiyama T. Extranuclear Translocation of High-Mobility Group A1 Reduces the Invasion of Extravillous Trophoblasts Involved in the Pathogenesis of Preeclampsia -New Aspect of High-Mobility Group A1-. Reproductive Sciences 1-9, 2017. (査読あり)

2. Matsubara K, Matsubara Y, Mori M, Uchikura Y, Hamada K, Fujioka T, Hashimoto H, Matsumoto T. Immune activation during the implantation phase causes preeclampsia-like symptoms via the CD40-CD40 ligand pathway in pregnant mice. Hypertens Res, 39(6), 407-414, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Uchikura Y, Matsubara K, Matsubara Y, Sugiyama T. Role of high-mobility group A1 protein in preeclampsia. 64th SRI, Orlando Florida USA, March 16-18, 2017.
2. Uchikura Y, Matsubara K, Matsubara Y, Mori M. Role of high-mobility group A1 protein in trophoblast invasion. ISSHP European Congress, Budapest Hungary, Sep 24-26, 2015.

〔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

松原 圭一 (Matsubara, Keiichi)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80263937

(2)研究分担者

松原 裕子 (Matsubara, Yuko)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号： 60403820

那波 明宏 (Nawa, Akihiro)
名古屋大学・医学系研究科・特任教授
研究者番号： 90242859

(3)連携研究者

なし ())

研究者番号：

(4)研究協力者

山本 沙和 (Yamamoto Sawa)