

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08408

研究課題名（和文）mTORシグナルによる胎盤栄養輸送とエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名（英文）Epigenetic regulation of mTOR signalling pathway in placental nutrient transport.

研究代表者

平野 剛（HIRANO, Takeshi）

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：00322826

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）： 妊娠の進行に伴う胎盤の形態変化を反映した様々な評価モデルを用い、栄養感知システムであるmTORおよび関連因子の活性化と各種栄養素トランスポーター、特に妊娠初期に特異的な発現を確認したグルタミントランスポーター-SNAT3(Slc38a3)等との関連を妊娠期毎に網羅的に解析・評価した。パルプロ酸等とmTORの活性化およびmTORの活性化と栄養素トランスポーターの発現変動との関連性について評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精密にプログラムされた一連の遺伝子発現と子宮内で極めて速い速度で発育・発達を続けている胎児の健やかな誕生に多大な貢献をもたらす。妊娠初期における栄養素の欠如は胎児にとって致命的であり、エピジェネティックな変化も含めた研究意義は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）： The mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathways control protein synthesis in response to nutrient availability. Moreover, mTOR is a positive regulator of placental nutrient transport and is involved in the regulation of fetal growth. We focus on the role of mTOR in placental development, nutrient regulation and response.

研究分野：医療薬学

キーワード：mTOR エピジェネティック 栄養 胎盤 母体 胎児 トランスポーター 輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Barker DJ & Osmond C は「Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)」という概念、胎生期から乳幼児期にいたる栄養環境が、成人期あるいは老年期における生活習慣病発症リスクに影響する可能性を提唱している。胎児期において低栄養に胎芽が曝露されると成人病の素因が形成されるというものであり、2005年には、栄養学分野のノーベル賞といわれているダノン国際栄養学術賞を受賞している。このように新生児の健康状態は胎児期の栄養状態が深く関与しており、出生後の環境だけではなく、子宮内にいる胎児期と出生後数ヶ月の栄養状態が極めて重要であることを示している。この胎児期の栄養状態には、母体と胎児を結ぶ胎盤が深く関与しており、胎盤における栄養素の輸送機構が正常に機能しない場合、胎児への栄養供給が不足するため子宮内胎児発育不全や神経管閉鎖障害の発症リスクが増大し、葉酸摂取不足は二分脊椎や無脳症等の先天性脊椎癒合不全を惹起することも示唆されている。2006年には、厚生省から「妊産婦のための食生活指針」が発行され、若年女性のダイエット願望に対して警鐘を鳴らし食育の意義を謳ったものである。しかし、胎児期の慢性的な低栄養状態は、発達障害の増加と臨床像の変化にも関連していることが示唆されており、大きな社会問題にもなっている。以上のように、胎児期の栄養状態は胎児の発育のみならず、青年期以降の健康状態を反映するものとして極めて重要であり、成人期における生活習慣病を見据えて、臓器エピジェネティック制御機構の解析が行われている。

2. 研究の目的

これまでの研究により、環境に応じたトランスポーターの発現制御には栄養感知システムが関与することを明らかにしている。ラパマイシン標的タンパク質(mTOR: mammalian target of rapamycin)は、酵母からヒトまでの進化の過程で高度に保存されている生命維持に必須のシグナルであり、癌細胞でさえも突然変異していることが稀といわれる。それ故、正常細胞には極めて重要な生理的意義および機能がある。その役割として近年注目を集めているのが、細胞外の栄養環境、主にアミノ酸バランスの変化を感知し、タンパク質の翻訳・活性を制御する栄養感知システムとしての機能である。本機構はこれまで癌細胞のアミノ酸トランスポーターと関連性が研究されてきたが、正常細胞、特に胎盤の細胞における栄養環境と妊娠期による栄養素トランスポーターの発現変動との関連性およびエピジェネティック制御機構については、ほとんど研究されていない。これまでの研究では妊娠期全般における胎児の発育に関連した栄養素の母体胎児間輸送機構を明らかにしてきたが、本研究では、栄養感知システムとして機能している mTOR と妊娠期による栄養素トランスポーターの発現制御の関連をエピジェネティック制御機構の観点から詳細に明らかにする。

3. 研究の方法

臨床上問題となるビタミン K などの脂溶性ビタミン、エタノール、ニコチン、バルプロ酸などの抗てんかん薬、経口抗糖尿病薬、スタチン系薬物、あるいは mTOR 阻害薬エベロリムスなどを用いて、細胞増殖、妊娠期全般における栄養供給に及ぼす影響を検討する。特に、バルプロ酸はヒストン脱アセチル化酵素阻害薬としての機能を有することから興味深い。栄養素トランスポーターの対象は、前述の SNAT3(Slc38a3)の他、アミノ酸トランスポーター(SLC ファミリー)、グルコーストランスポーター(GLUT, SGLT ファミリー)、葉酸、カルニチンなどのビタミン類、核酸輸送に関与するヌクレオチドトランスポーターを網羅的に検討する。催奇形性薬物であるサリドマイドの胎盤透過は疑う余地はないものの、mTOR シグナルおよび栄養素トランスポーターへの影響の観点から実施する。一方、栄養素トランスポーターの発現は性ホルモン分泌に対しても大きな影響を与えることから、forskolin, PKC などによって胎盤の細胞を分化・誘導させた際のヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)産生とアロマトラーゼ活性についても詳細に確認することとする。

各種化合物暴露後の mTOR の活性化変動を mTOR 活性化マーカーである S6 タンパク質のリン酸化レベルにて評価する。また、各化合物暴露後の各種栄養素トランスポーターの発現変動を同時に解析し、各種化合物と mTOR の活性化、mTOR の活性化と栄養素トランスポーターの発現変動との関連性について詳細に評価する。

さらに、BeWo, JEG-3 細胞などの胎盤モデルの他、妊娠ラットおよびストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット胎盤、既に確立済のヒト満期胎盤初代培養系による DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化解析をバイサルファイト反応キットおよび Bisul Taq DNA Polymerase を用いて行う。

4. 研究成果

胎盤の栄養素を輸送するトランスポーターの発現は、妊娠の進行に伴って制御されており、栄養感知システムの存在およびエピジェネティック制御機構に着目して本研究を遂行した。

mTOR シグナルの下流に位置する p70 S6 kinase (Thr389) のリン酸化は、Western blotting によって評価した。また、mTOR 阻害剤(ラパマイシン、エベロリムス等)処理時におけるリン酸化を確認した。ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞を用いて、コントロールとして DMSO 0.1%添加、

mTOR 阻害剤処理群として、ラパマイシン (100 nM)、エベロリムス (100 nM) を含むメディウム (FBS15%含有) で 1 時間処理し、RIPA buffer (PMSF 添加) により cell lysate を作成した。Total p70 S6 kinase および phospho-p70 S6 kinase は、分子量 60kDa 前後に 2 本のバンドが検出された。今回実験に用いた抗体は、p70 S6 Kinase とともに p85 S6 kinase を認識することから、60kDa マーカーの上に検出されるバンドが p85、下のバンドが p70 であると考えられた。しかしながら、用いた抗体のデータシートでは、p70 が 70kDa、p85 が 85kDa となっており、検出位置に若干のずれが認められた。そこで、電気泳動の条件設定を再確認し、詳細に検討を加えた。ラパマイシン (100 nM) およびエベロリムス (100 nM) を 1 時間処理することによって、phospho-p70 S6 kinase と考えられるバンドは、ほとんど消失した。このことから、各薬液の処理濃度としては、100 nM で十分であると考えられたが、さらに最適化を目指して、薬液処理の濃度および時間等の条件を検討した。また、Total S6 kinase の発現量は、両薬物によって違いが認められたことから、詳細な密度解析を行った。

胎盤を通じて栄養素を胎児へ輸送するシステムとして、胎盤トランスポーターが知られている。これらのトランスポーターは、アミノ酸、グルコース、葉酸などの栄養素の妊娠期による需要の変化に応じて高度に発現制御を受けている。これらの機構により、胎児の栄養環境が決定されているが、環境に応じたトランスポーターの発現制御には、栄養感知システムが関与していることを明らかにした。特に妊娠初期に特異的な発現を確認したグルタミントランスポーター SNAT3 (Slc38a3) 等との関連を妊娠期毎に網羅的に解析・評価した。

妊娠初期のモデル細胞であるヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞に、ほ乳類発現プラスミドベクターを用いて mTOR を高発現させ、各栄養素トランスポーターの発現変動を確認した。また、SNAT3 の基質であるグルタミンなどの細胞内取り込みを評価した結果、SNAT3 の発現量とグルタミンの取り込み量が顕著に増加し、妊娠初期の胎盤において mTOR によるトランスポーターの発現調節機構が存在する可能性が示唆された。

mTOR シグナルの下流に位置する p70 S6 kinase (Thr389) のリン酸化の評価は、ラパマイシンおよびエベロリムスを含むメディウムで処理したが、さらに最適化を目指して、薬液処理の濃度および時間等の条件を検討した。

抗てんかん薬であるバルプロ酸曝露後の mTOR 活性化変動について、mTOR 活性化マーカーである S6 タンパク質のリン酸化レベルにて検討した。また、栄養素トランスポーターの発現変動を同時に解析し、バルプロ酸と mTOR の活性化および mTOR の活性化と栄養素トランスポーターの発現変動との関連性について評価した。

ロイシンなどの必須アミノ酸の取り込みに寄与している LAT1 (SLC7A5) の正常組織での発現は、胎盤、脳、骨髄ならびに精巣などに限られている。これまでの検討結果から、妊娠初期の胎盤には SNAT3 の発現のみが認められているが、LAT1 および LAT1 と協調的に作用するか否かは不明である。グルタミンを細胞内に維持する Na⁺依存性トランスポーターである ASCT2 (SLC1A5) は妊娠中期から後期に発現しているので、妊娠期全般を通じて栄養感知システムとして機能する mTOR AMPK との関連性を評価した。

カルバペネム系抗生物質およびセフェム系抗生物質を曝露することで、mTOR シグナルおよび栄養素トランスポーターへの影響を確認した。一方、栄養素トランスポーターの発現は性ホルモン分泌に対しても大きな影響を与えることから、forskolin, PKC などによって胎盤の細胞を分化・誘導させた際のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) 産生とアロマターゼ活性についても検討した。さらに、BeWo, JEG-3 細胞などの胎盤モデルの他、妊娠ラットおよびストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット胎盤を用いて、DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化解析をパイサルファイト反応キットおよび Bisul Taq DNA Polymerase を用いて検討した。

mTOR 活性化と各種栄養素トランスポーター発現との直接的な関連性を評価するために、リン酸化 S6 タンパク質と各種栄養素トランスポーターを同時に蛍光標識し、両者の局在について比較・検討することを今後の目標とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishiguro Yuri, Furugen Ayako, Narumi Katsuya, Nishimura Ayako, Hirano Takeshi, Kobayashi Masaki, Iseki Ken	4. 巻 33
2. 論文標題 Valproic acid transport in the choriocarcinoma placenta cell line JEG-3 proceeds independently of the proton-dependent transporters MCT1 and MCT4	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 270 ~ 274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2018.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 滝川裕基、高村茂生、櫻田 渉、中山 章、吉田栄一、平野 剛
2. 発表標題 抗生物質のpH変動に基づく配合変化の検討
3. 学会等名 第65回北海道薬学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤雅之、高村茂生、櫻田 渉、中山 章、吉田栄一、平野 剛
2. 発表標題 簡易型自記式食事歴法質問票（BDHQ）の概略と活用方法
3. 学会等名 第65回北海道薬学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	平井 みどり (HIRAI Midori) (70228766)	神戸大学・医学部附属病院・教授 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	井関 健 (ISEKI Ken) (40203062)	北海道大学・薬学研究科（研究院）・教授 (10101)	
連携研究者	小林 正紀 (KOBAYASHI Masaki) (70431319)	北海道大学・薬学研究科（研究院）・准教授 (10101)	
連携研究者	山本 和宏 (YAMAMOTO Kazuhiro) (30610349)	神戸大学・医学部附属病院・講師 (14501)	