

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791548

研究課題名(和文)

胎盤形成関連分子の糖鎖修飾による機能制御の解明と胎盤形成不全の治療への応用

研究課題名(英文)

Regulation of trophoblast invasion by N-acetylglucosaminyltransferase in human placenta

研究代表者

山本 英子 (YAMAMOTO EIKO)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10432262

研究成果の概要(和文)：N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) はヒト胎盤では妊娠初期の絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) に発現するが、EVT における GnT-V 発現調整に関与する因子を、EVT 細胞株を用いた実験により検索した。脱落膜培養上清添加により低下し、サイトカイン添加による検討の結果、TGF- β によって GnT-V 発現が抑制されることがわかった。酸素条件では低酸素下培養により GnT-V の発現は増強した。GnT-V は integrin $\alpha 5 \beta 1$ の糖鎖修飾を介して浸潤能を調節するが、GnT-V shRNA 導入株ではフィブロネクチン刺激により FAK のリン酸化が抑制された。妊娠高血圧症患者の胎盤における発現は、正常胎盤と比べて免疫組織染色および Western blot では差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) is expressed in extravillous trophoblast (EVT) of human placenta in the first-trimester. We investigated factors which regulate expression of GnT-V in EVT cells using EVT cell line, HTR-8/SVneo. The supernatant of decidual tissue culture made GnT-V expression reduced and we confirmed TGF- β was the factor in cytokines. Hypoxia (1% Oxygen) promoted GnT-V expression in mRNA and protein levels after incubation for 48 hours compared to normoxia. Because GnT-V regulates trophoblast invasion by glycosylation of integrin $\alpha 5 \beta 1$, we investigated the affection on phosphorylation of FAK after incubation with fibronectin. The result was that phosphorylation of FAK was reduced in GnT-V shRNA transfectants compared to control cells. We also investigated the difference of GnT-V expression between normal placentas and pregnancy-induced hypertension's ones, but there was no difference in immunohistochemistry and Western blot.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：胎盤、Extravillous trophoblast、糖転移酵素、GnT-V、浸潤

1. 研究開始当初の背景

胎盤は妊娠成立より児の分娩に至るまで重要な役割を果たす臓器であるが、その形成については解明されていないことが多い。中でも絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) の浸潤制御メカニズムは依然として不明な点が多い。EVT は母体子宮筋層に浸潤し、らせん動脈の血管内皮細胞を置換することにより母体から絨毛間腔への血流を確保する。妊娠初期の EVT の浸潤不全は妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育遅延の病態に関与すると言われている。現在、妊娠高血圧症候群に対する治療は対症療法しかなく、時には分娩による妊娠の中断が必要になる場合もある。EVT 浸潤機構の解明は胎盤形成における生理学的意義のみでなく、妊娠高血圧症候群の病態制御や治療にも結びつく可能性がある。

2. 研究の目的

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) はアスパラギン結合型糖鎖の分岐鎖構造の決定に関与し、 β -1-6GlcNAc 鎖という特徴的な糖鎖構造をつくり、癌の転移に関係が深い酵素の 1 つである。ヒトの胎盤において、妊娠初期の EVT に発現し、integrin $\alpha 5 \beta 1$ の糖鎖修飾を介して EVT の浸潤制御に関与することをこれまでに明らかにしてきた。GnT-V の発現調整および新たな標的分子の発見や浸潤制御のさらなる分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EVT における GnT-V 発現が付着絨毛内の増殖型から浸潤型へ減弱するメカニズムを解明するために、脱落膜上清添加による GnT-V 発現の変化を RT-PCR および Western blot にて確認する。変化が見られた場合には、脱落膜で分泌されるサイトカインのなかで GnT-V 発現に影響を与えるものを同定するため、TGF- β 、IL-6、IL- β 、INF- γ などを添加し、GnT-V 発現変化を検討する。EVT 浸潤に影響を与える因子として、低酸素下 (1%) での培養による GnT-V 発現変化を、妊娠初期絨毛の初期培養や EVT 細胞株を用い、RT-PCR、Western blot、免疫組織染色法を用いて検討する。

(2) GnT-V 発現抑制によって絨毛細胞で浸潤能が抑制されたメカニズムを、細胞内シグナル伝達を中心に検討するとともに、 $\alpha 5 \beta 1$ integrin 以外の標的分子の存在を明らかにする。細胞内シグナル

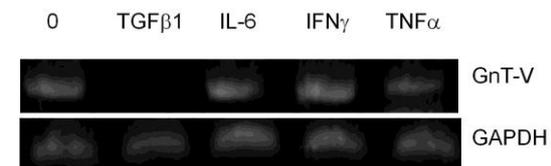
としては、絨毛癌細胞株 Jar に GnT-V shRNA stable-transfection 細胞を用いて、フィブロネクチン添加による FAK、Akt、ERK の発現およびリン酸化の変化を Western blot にて検討する。

(3) 妊娠高血圧症候群は EVT 浸潤不全により発症すると言われているため、正常妊娠および妊娠高血圧症候群の胎盤を用いた免疫染色を行い、絨毛細胞に発現する GnT-V の発現の差を検討する。

4. 研究成果

(1) 脱落膜を洗浄、細切し、1.7g に対して 2.5ml の培養液を加え、24 時間培養し、培養上清を回収した。EVT 細胞株 HTR-8/SVneo の培養液中に、脱落膜上清を 0%, 0.1%, 1% 添加、48 時間培養し、回収した細胞における GnT-V の発現を RT-PCR および Western blot にて確認したところ、いずれの濃度においても、mRNA レベル、タンパクレベルともに抑制された。

次に、脱落膜で分泌されるサイトカインのなかで GnT-V 発現に影響を与えるものを同定するため、HTR-8/SVneo に TGF- β 、IL-6、IL- β 、INF- γ を 1ng/ml 添加し、48 時間培養後に回収した細胞における GnT-V 発現変化を検討した。TGF- β 添加では発現が抑制されたが、その他のサイトカイン添加では変化は認めなかった。

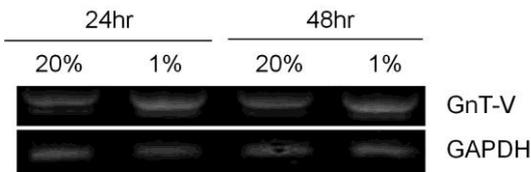


さらに、TGF- β を 0, 0.1, 1, 10ng/ml の濃度で HTR-8/SVneo に添加し 48 時間培養したところ、全ての濃度において GnT-V の発現は、mRNA レベル、タンパクレベルともに抑制された。

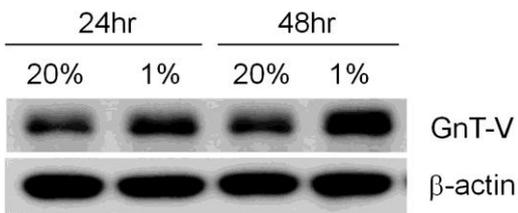
EVT 浸潤に影響を与える因子として、低酸素下 (1%) での培養による GnT-V 発現変化確認した。妊娠初期絨毛による初代培養から得られた培養 EVT に、TGF- β を 0 または 1ng/ml にて添加し 48 時間培養後に固定し、免疫組織染色法にて GnT-V の発現の変化を確認したが、TGF- β 添加による発現変化は認めなかった。

HTR-8/SVneo を酸素濃度 20% および 1% にて培養したところ、通常酸素下 (20%) に比べて低酸素下 (1%) では、24 時間、48 時間後ともに、mRNA およびタンパク

レベルでの GnT-V 発現の増強を認めた。



(2) フィブロネクチン添加刺激による FAK, AKT, ERK のリン酸化の変化を検討した。Jar, mock 株, KD 株 (shRNA 導入株) を FCS フリー培養液で培養し、フィブロネクチン (50ng/ml) を添加後、0 分、10 分、30 分後に回収した細胞よりタンパクを抽出し、Western blot を行った。FAK のリン酸化は、KD 株では Jar および mock 株に比べてリン酸化が抑制されていたが、AKT および ERK のリン酸化には差は認められなかった。また、接着に関与する因子として paxillin および PY20 の発現変化も検討したが、差は認められなかった。妊娠初期胎盤における EVT の浸潤制御には、GnT-V が integrin α 5 β 1 の糖鎖修飾を行うことにより、FAK のリン酸化を介して細胞遊走能を変化させるメカニズムが関与する



ことが示唆された。

(3) 妊娠高血圧症は EVT 浸潤不全が原因と言われているため、妊娠高血圧症患者の胎盤における GnT-V の発現を免疫組織染色にて正常胎盤と比較したが、明らかな変化は認められなかった。胎盤組織より抽出したタンパクを用いて Western blot においても、GnT-V の発現の変化は認められなかった。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

① Yamamoto E, Ino K, Sakurai M, Takigawa S, Iwase A, Kikkawa F. Fertility-sparing operation for recurrence of uterine cervical perivascular epithelioid cell tumor. Rare Tumors. 2010;30:72-73. 査読有り

② Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kondo S, Umezumi T, Nawa A, Takikawa O, Kikkawa F. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. Gynecol Oncol. 2010;117(3):423-8. 査読有り

③ 新美薫、山本英子、東真規子、林加奈子、近藤紳司、河合智子、井篁一彦、吉川史隆. 7 歳女兒に発症した子宮原発横紋筋肉腫の 1 例. 日本婦人科腫瘍学会雑誌 2010 年, 28 巻 4 号 Page575-580. 査読有り

④ 林加奈子, 山本英子, 新美薫, 近藤紳司, 稲葉智子, 井篁一彦, 吉川史隆. 肝転移巣の破裂による腹腔内出血を契機に診断された絨毛癌の 1 例. 東海産科婦人科学会雑誌 2010 年, 46 巻 Page209-212. 査読有り

⑤ Takahashi N, Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, Nagasaka T, Kajiyama H, Shibata K, Nawa A, Kikkawa F. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary. Oncol Rep. 2009;22:1027-32. 査読有り

⑥ Kotani T, Iwase A, Ino K, Sumigama S, Yamamoto E, Hayakawa H, Nagasaka T, Itakura A, Nomura S, Kikkawa F. Activator protein-2 impairs the invasion of a human extravillous trophoblast cell line. Endocrinology. 2009;150:4376-85. 査読有り

[学会発表] (計 24 件)

① 山本英子、林加奈子、新美薫、炭竈誠二、小谷友美、吉川史隆. 全胎状奇胎不死化細胞株の樹立. 第 18 回日本胎盤学会学術集会・第 28 回日本絨毛性疾患研究会. 2010 年 9 月 29 日. 熊本.

② 山本英子、井篁一彦、近藤紳司、新美薫、林加奈子、炭竈誠二、小谷友美、吉川史隆. 胎状奇胎後 hCG 経過非順調型症例の検討. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2010 年 4 月 23 日. 東京.

③ 新美薫、山本英子、林加奈子、近藤紳司、炭竈誠二、小谷友美、井篁一彦、吉川史隆. 絨毛細胞における N-アセチルグルコサミン転移酵素 IVa (GnT-IVa) の発現. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2010 年 4 月 23 日. 東京.

④ 山本英子、井篁一彦、近藤紳司、林加奈子、新美薫、吉川史隆. 当院における胎状奇胎後 hCG 経過非順調型症例の検

討：20週以降のhCG低単位持続症例の解析を含めて。第27回日本絨毛性疾患研究会 学術集会。2009年10月16日。東京。

⑤小谷友美、廣中昌恵、杉山知里、真野由紀雄、津田弘之、炭竈誠二、山本英子、早川博生、井篁一彦、吉川史隆。HTR-8/SVneo細胞機能におけるLPAの役割。第17回日本胎盤学会 学術集会。2009年10月16日。東京。

⑥林加奈子、山本英子、井篁一彦、新美薫、近藤紳司、稲葉智子、吉川史隆。EVTにおけるGnT-Vの発現制御因子の検討。第17回日本胎盤学会 学術集会。2009年10月16日。東京。

⑦Hayashi K, Yamamoto E, Ino K, Niimi K, Kondo S, Kikkawa. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V is downregulated by Transforming Growth Factor β 1 and hypoxia in extravillous trophoblast (EVT) cells. 15th IFPA Conference. 2009年10月8日。アデレード。

⑧ Yamamoto E, Niimi K, Hayashi K, Kotani T, Ino K, Kikkawa F. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase IVa in extravillous trophoblast and gestational trophoblastic disease. 15th IFPA Conference. 2009年10月8日。アデレード。

⑨Kotani T, Sumigama S, Yamamoto E, Hayakawa H, Mano Y, Kikkawa F. LPA promotes migration of human extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo. 15th IFPA Conference. 2009年10月8日。アデレード。

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 英子 (YAMAMOTO EIKO)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10432262

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし