

令和元年6月7日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10110

研究課題名(和文)胎児と内分泌因子が関与する妊娠維持・分娩発来機構の解明

研究課題名(英文)Studies on pregnancy maintenance mediated by fetal and endocrine factors

研究代表者

石本 人士 (ISHIMOTO, Hitoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10212937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：表記の研究において以下の結果を得た。羊膜上皮細胞でプロゲステロン(P4)核型受容体のmRNAは低発現、膜型受容体PGRMC1は高発現、P4代謝に関わるSRD5A1やAKR1C1～C3は低発現であった。P4局所産生に関わるHSD17B2とコラーゲン安定化蛋白decorin(DCN)は上皮細胞では著明な低発現、間質細胞では著明な高発現を示した。DCNは妊娠後期で羊膜発現が減少した。ヒト胎児副腎(HFA)皮質細胞モデル(NCI-H295A)と親類株(NCI-H295R)でのRNA-seq解析から、HAFの外層選択的な細胞増殖やコルチゾール産生抑制機構の端緒となる知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで明らかでなかった羊膜局所でのプロゲステロン(P4)濃度維持機構の存在と機能的P4減少の可能性を示すことができ、また妊娠中の胎児由来内分泌因子産生源として重要なヒト胎児副腎の発育や機能調節解明のきっかけとなる知見を得ることができた。このような胎児と内分泌因子が関与する妊娠維持機構の分子基盤解明の試みは、複雑な分娩発来機構の理解を通じ将来の早産予防法開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In search for pregnancy-maintaining mechanisms, we studied on fetal and endocrine factors. The obtained data are as follows: 1) mRNA expression in amniotic epithelial cells are low with progesterone (P4) nuclear receptor, SRD5A1, AKR1C1, AKR1C2, and AKR1C3. In contrast, PGRMC1, a membranous P4 receptor, showed high mRNA levels. The mRNA levels of HSD17B2 and decorin (DCN), which stabilizes collagen structure, were scarce in amniotic epithelial cells, but were very high in amniotic stromal cells. Such DCN mRNA expression was decreased in late gestation. 2) RNA sequence analysis in NCI-H295A (fetal adrenocortical cell model) and NCI-H295R cells, which have differential biological properties, revealed several new findings that should guide future research on the outer-zone selective cell proliferation seen in the human fetal adrenal gland, and on an inhibiting mechanism of cortisol synthesis.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠維持機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

早産の予知・防止は今日の周産期医学における最大の課題であり、解決には分娩発来機構や妊娠維持機構の解明が欠かせない。自然早産の原因として上行性感染がよく知られているが、感染以外の原因も多く、一部には、精緻に調節されているはずの内分泌機構、とりわけ母児間の内分泌シグナルの攪乱に起因するものがあることが推察される。

妊娠維持には胎盤で産生されるプロゲステロン(P4)の作用が重要である。多くの哺乳類において母体血中 P4 濃度の低下後に分娩が生じる。しかしヒトにおいては、母体血中 P4 濃度が低下しないにもかかわらず分娩が生じる。このパラドックスは機能的 P4 減少(functional withdrawal of progesterone)という概念で説明されている。すなわち、受容体やサブタイプの発現変化、P4 局所濃度調節、コファクターの変化などにより、P4 自体の多寡でなく、P4 の作用が分娩前に減少するため分娩が発来するという考え方である。実際、ヒト子宮下筋層において分娩前に P4 受容体のサブタイプ変化が生じることが明らかとなっている。しかし羊膜や頸管など他の妊娠組織における機能的 P4 減少のしくみについてはまだ不明な点が多い。

またヒトにおける他の哺乳類と大きく異なる妊娠中のホルモン動態の特徴として、胎児胎盤系の存在がある。すなわちこれは母児間の内分泌連関である。妊娠中はプロゲステロンやエストロゲンの産生が胎盤で盛んである。しかしエストロゲンについては、ヒトでは胎盤の CYP17 酵素欠損があるため、de novo 合成ができない。そこで前駆体である DHEA(-S)が胎児副腎で作られ、直接あるいは肝臓で代謝されたのち胎盤に運ばれ、これをもとにエストロゲンが産生されている。またヒトの際だった特徴として、胎盤でコルチコトロピン放出ホルモン(CRH)が産生され、妊娠後期に CRH 産生量が急激に上昇することが分娩惹起をもたらす「胎盤時計」ではないかと提唱されている。一方、胎児の肺などの臓器成熟には副腎で産生されるコルチゾールの働きが欠かせない。ヒト胎児副腎におけるコルチゾール産生は時間的に厳密に調節されており、妊娠後期になるまでコルチゾール産生は抑制されているが、この機序は十分に解明されていない。妊娠後期のコルチゾール産生刺激については、ヒト胎児副腎皮質細胞に直接 CRH が働き、HSD3B2 発現が増加しコルチゾール産生が正の産生調節を受けることが *in vitro* で示されている。一方、妊娠後期までのコルチゾール産生抑制機構についてはほとんどわかっていない。

ヒト胎児胎盤系の中核をなす胎児副腎(HFA)は、胎児の体のサイズに比べ相対的に最も大きい臓器で、皮質のホルモン産生能は非常に活発である。皮質は成人の3層構造とは異なり、大半の期間、外層の definitive zone (DZ) および内層の fetal zone (FZ) の2つの層構造を成し、髄質は明らかな構造をとらない。HFA の発育・成長に関し、*in vivo* では細胞増殖は DZ にほぼ限定して認められ、FZ ではほとんど見られないが、この機序は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究が目指すのは、胎児と内分泌因子が関与する妊娠維持機構の分子基盤を明らかにすることにより、分娩発来機構の理解を深め、早産予防に繋がる知見を得ることである。具体的には、研究背景で示した様々な不明点を明らかにすべく解析を進める。

3. 研究の方法

臨床研究審査委員会の承認とインフォームドコンセントのもと、得られたヒト羊膜を用いて実験を行う。羊膜と、羊膜から単離した上皮細胞、間質細胞について、発現プロファイル解析、局在の検討を RT-PCR、リアルタイム RT-PCR、免疫染色により行う。また羊膜上皮細胞初代培養を施行し、以前から羊水中の妊娠維持作用保有蛋白として解析を進めている midkine(MDK)を添加して、RNAseq 解析により網羅的発現差異解析を行う。またヒト胎児副腎皮質細胞のモデル細胞株である NCI-H295A 細胞と親類株(NCI-H295R 細胞)において、MDK による細胞増殖促進作用等に対する反応性の相違を端緒に、網羅的に RNA-seq により遺伝子発現差異の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 羊膜におけるプロゲステロン(P4)の受容体や P4 代謝・産生系因子の発現プロファイル・局在の検討

羊膜の mRNA 発現をみると、P4 の核型受容体である PGR の発現レベルは極めて低く、これは PGR 蛋白陰性であった免疫組織染色の結果と合致した。この点に関して、羊膜から単離した上皮細胞(EPCAM 陽性)と間質細胞(EPCAM 陰性、Vimentin 陽性)との間で差異はなかった。一方、P4 の膜性受容体である PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1)については、羊膜で mRNA 発現レベルが高く、これは既報の免疫組織染色の結果と合致し、こちらも PGR と同様に上皮細胞、間質細胞間で発現レベルに差異は認めなかった。P4 代謝・産生系因子の mRNA 発現に関しては、P4 の代謝に関わる SRD5A1(steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1) や AKR1C1 ~ C3(aldo-keto reductase family 1; member C1, C2, および C3)の羊膜上皮細胞発現レベルは低かった。また P4 の局所生成に関わる酵素である HSD17B2 の mRNA 発現レベルは非常に低かった。しかし間質細胞においては、HSD17B2 は特徴的な高発現を示し、これは上皮細胞と比較し 300 倍以上の発現レベルであった。今後蛋白レベルでの検討を要するものの、上記の結果は、P4 が PGR 受容体発現のない羊膜においても膜性受容体などを通じて作用を及ぼしている可能性、また羊膜局所で P4 濃度維持機構が存在する可能性を示唆するものと考えられた。

(2) 羊膜における機能的プロゲステロン減少に影響を受ける可能性がある候補蛋白の検討
機能的プロゲステロン減少に影響を受け、妊娠維持機構の破綻(=分娩発来)に介在する可能性のある蛋白として、プロテオグリカンの一種である decorin(DCN)に着目し検討した。コラーゲンを安定させる働きのある DCN は、P4 により発現増強されることが子宮内膜症モデル細胞で知られる。また DCN は羊膜に高発現するが、分娩時の頸管近傍の羊膜では発現が減少することが報告されている。我々の検討では、FACS で単離した羊膜上皮細胞と間質細胞の比較で、DCN mRNA は間質細胞で約 3 倍高発現していた。また妊娠中期に比べ末期羊膜において、DCN mRNA 発現量は著明に減少していた。また羊膜上皮細胞と間質細胞の DCN 発現パターンは HSD17B2 に類似していた。よって、妊娠末期の羊膜 DCN 発現減少は、局所の P4 減少による可能性があるものと考えられた。また DCN は、妊娠中期の羊水中に豊富に存在する成長因子 midkine(MDK)により正の発現調節を受けている可能性が、培養羊膜上皮細胞への MDK 添加による網羅的発現解析の結果から示された。P4 作用の減少に伴う DCN 発現減少はコラーゲンの不安定化から卵膜の脆弱化や破水の契機になりうる事が推察され、前期破水例などの早産関連病態における今後の研究の展開が期待される。

(3) ヒト胎児副腎モデル細胞株(NCI-H295A 細胞)と、親類株(NCI-H295R 細胞)における、MDK による細胞増殖促進作用に対する反応性の相違、および遺伝子発現差異の検討

ヒト胎児副腎(HFA)は体のサイズに比べ相対的に最も大きい臓器であり、胎盤で産生されるエストロゲンの前駆体を産生し、妊娠末期には肺など胎児臓器の成熟に不可欠なコルチゾールの産生を開始する。HFA では外層(DZ)にほぼ限定して細胞増殖が生じるが機序は不明である。これまでの我々の検討から、成長因子のうち、FGF-2 はどの部位の HFA 由来細胞に対しても増殖促進効果を示すが、MDK は DZ 細胞のみに増殖促進作用を示す。また FGF-2 はヒト副腎皮質モデル細胞株である NCI-H295R や NCI-H295A のいずれにも増殖促進作用を示すが、MDK はより胎児副腎皮質の表現型に近い NCI-H295A 細胞に対してのみ増殖促進作用を示す。上記の細胞選択性の差異を、DZ 選択的な細胞増殖の機序解明の端緒とするべく、ヒト胎児副腎モデル細胞株(NCI-H295A 細胞)と親類株(NCI-H295R 細胞、ステロイド研究に汎用される)における遺伝子発現差異を RNAseq により網羅的に解析した。MDK 受容体候補および FGF 受容体(1~4)に関する mRNA 発現パターンの差異については、MDK の受容体候補では ITGB1 の発現レベルが両細胞で最も高く、SDC3 と NCAM1 がそれに次いだ。また LRP1 は NCI-H295A 細胞で 4 倍高発現していた。以上より、MDK の NCI-H295A や DZ の細胞増殖促進作用に LRP1 介在の可能性が示唆され、今後の検討課題と考えられた。また両細胞には FGFR1 と 4 が発現し、FGFR1 は NCI-H295A 細胞で 3 倍高発現していた。FGF ファミリー(FGF1~20)についても解析すると、FGF9、11、13 を除き両細胞にはほとんど発現していなかった。これはモデル細胞株の基礎値の結果ではあるが、HFA 皮質細胞に関して、FGF2 が ACTH により発現・産生亢進しオートクラインに作用して細胞増殖をもたらすという従来有力だった仮説と反する結果であり、今後の検討を要する。またコルチゾール産生に関わる遺伝子発現差異について、妊娠中期まで発現抑制されており産生調節の key となる HSD3B2 に関しては、NCI-H295A 細胞では H295R 細胞の 10 倍高発現しており、同様の結果は real time RT-PCR でも確認された。これに加え、コルチゾール産生経路に關与する STAR、CYP11B1 も NCI-H295R 細胞に比べ H295A 細胞で 2 倍以上高発現していた。以上より、NCI-H295A 細胞はコルチゾール産生制御機構の検討にも、より適した細胞株と考えられた。しかしながら、これまでの我々の実験から、NCI-H295A 細胞は siRNA による遺伝子のサイレンシングは可能なものの、MDK プラスミドのトランスフェクションによる過剰発現実験が困難な細胞株であることが判明しており、今後さらに至適試薬や条件の検討を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

石本 人土、新時代のホルモン療法マニュアル：妊娠・出産に伴うホルモンの生理的变化、産科と婦人科、Vol.86 増刊号、54-59、2019、査読無

Sakamoto N, Mitsuzuka K, Kanno Y, Hayashi M, Goto Y, Ueno S, Ishimoto H. Atypical presentation of duodenal atresia concomitant with type-A esophageal atresia in fetal life: a case report. The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine, 2019(in press) 査読有

Kuroda Y, Murakami H, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Takahashi K, Mitsuzuka K, Ishimoto H, Nishimura G, Kurosawa K: A novel gene (FAM20B encoding glycosaminoglycan xylosylkinase) for neonatal short limb dysplasia resembling Desbuquois dysplasia. Clinical Genetics, 95(6), 713-717, 2019. doi: 10.1111/cge.13530. Epub 2019 Apr 11. 査読有

[学会発表](計 3 件)

Togo A, Hanawa S, Mitsuzuka K, Goto Y, Nishijima Y, Hayashi M, Kannno Y, Miyazawa M, Miyazawa M, Ishimoto H: Silencing of the Human Mitochondria-Localized Glutamic Acid-Rich

Protein (MGARP) Gene Induces Apoptosis in a Cell Line Model for Human Fetal Adrenal.,
The 66th Annual Meeting of the Society for Reproductive Investigation (国際学会), 2019

Kashiwagi H, Izumi S, Mitsuzuka K, Togo A, Ishimoto H, Mikami M: Study on the Kinetics
of Pregnancy-Related Proteins in Primates, 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会
(International session), 2018

Togo A, Kanno Y, Shida M, Narayama T, Kashiwagi H, Hayashi M, Mitsuzuka K, Ishimoto
H: Does a short cervix predict antepartum massive hemorrhage in patients with placenta
previa?, The 27th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (国際学会),
2017

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三塚 加奈子
ローマ字氏名：MITSUZUKA, Kanako
所属研究機関名：東海大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：00514639

研究分担者氏名：東郷 敦子
ローマ字氏名：TOGO, Atsuko
所属研究機関名：東海大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：20408024

研究分担者氏名：三塚 加奈子
ローマ字氏名：MITSUZUKA, Kanako
所属研究機関名：東海大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：00514639

研究分担者氏名：宮澤 昌樹
ローマ字氏名：MIYAZAWA, Masaki
所属研究機関名：東海大学
部局名：医学部
職名：客員講師
研究者番号(8桁)：30624572

研究分担者氏名：菅野 秀俊
ローマ字氏名：KANNO, Hidetoshi
所属研究機関名：東海大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：90631804

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。