

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11226

研究課題名(和文)ヘパリン/ヘパラン硫酸 細胞内シグナル伝達系を介する絨毛細胞の遊走制御機構

研究課題名(英文) Regulation of migration of trophoblast cell through cell signaling by heparin-heparansulphate.

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群は不育症の多様な臨床型を示す。特に妊娠中期には高サイトカイン炎症系ネットワークに惹起された絨毛細胞障害修復不全による胎盤機能不全が重要な役割を演じている。この過程ではヘパリン/ヘパラン硫酸/増殖因子(VEGF、EGF、HGF、FGFなど)と、その受容体を介する細胞内シグナル伝達系が絨毛細胞の遊走浸潤や組織修復に重要である。VEGF familyのひとつであるPlGF2はヘパリン結合部位を有し、細胞膜上で細胞内シグナル伝達系分子により組織形成過程に関与し、炎症性サイトカインが関与するPlGF2-VEGF-VEGFR1シグナル伝達系の異常による胎盤形成機能不全の機構を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群は不育症の多様な臨床型を示す。絨毛細胞が脱落膜細胞などの母体細胞群に遊走接触する初期の胎盤形成不全や、妊娠中期に高サイトカイン炎症系ネットワークに惹起された絨毛細胞障害修復不全による胎盤機能不全が重要な役割を演じている。今回の研究により、直接前炎症性サイトカインによる絨毛細胞からのVEGF familyのひとつであるPlGF2産生の抑制を見出した。従来の血中でのsFLT1増加が妊娠高血圧症候群の発症につながる機序とは異なる機序が推測された。特にヘパリン結合部位を有するPlGF2は絨毛細胞膜上でVEGFRに結合することから、炎症性サイトカインの直接的作用を細胞レベルで示した。

研究成果の概要(英文)：Hypertension disorder of pregnancy shows a wide variety of clinical form. Especially in the second trimester of pregnancy, placental dysfunction due to villous trophoblast cell damage caused by cytokine-inflammatory network plays an important role. In this process, intracellular signal transduction through the receptor is important in migration and tissue repair of villous trophoblast cells by heparin/heparan sulphate/ growth factors. PlGF2, one of the VEGF families, with a heparin-binding site is involved in the process of tissue repair by cell signaling molecules on the cell membrane. We have shown one of the mechanisms of dysregulation of repairing through the inflammatory cytokine-induced dysfunction of PlGF2-VEGF-VEGFR1 signal transduction system.

研究分野：産科学

キーワード：trophoblast Heparan sulphate migration cell signaling

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 早期流産、胎児発育不全 (fetal growth restriction: FGR)、妊娠高血圧症候群 (HDP) の発症は不育症の多様な臨床型を示したもののだが、近年では胎盤の形成機能不全が原因であると考えられるようになってきた。特に FGR は人工早産の大きな原因となっており、新生児医療の向上とともに生命予後は改善しつつあるが、現在においても FGR 自体が脳性麻痺の一部原因となっている。

(2) 病態の背景は多様だが、胎盤形成初期が重要な役割を演じている。上皮系、間葉系幹細胞前駆細胞から始まる胎盤形成の初期過程は、胎児由来細胞である絨毛細胞が母体由来細胞群である脱落膜細胞、血管内皮細胞、子宮筋細胞、間質細胞、リンパ マクロファージ系細胞に接触することから開始する。興味深いことに胎児由来の絨毛外栄養膜絨毛細胞 (extravillous cytotrophoblast: EVT) は脱落膜層、子宮筋層を遊走移動し、母体由来細胞群に接触、分化しながら胎盤循環形成のためのらせん動脈の remodeling を行い、適切に停止する。遊走浸潤が不良な場合には remodeling 不全の結果、絨毛間腔内の二次的低酸素低灌流が血管増殖因子 抗血管増殖因子の不均衡を生み出し、母体血管内皮障害や絨毛細胞障害を惹起する PIH や FGR 発症につながる。特に過凝固 高サイトカイン 炎症系ネットワークに暴露された微小環境での、絨毛細胞の遊走と移動停止の調節機構の解明は、過凝固状態を背景とする一部の不育症の病態改善につながる可能性を着想し今回の研究がおこなわれた。

2. 研究の目的

早期流産、胎児発育不全、妊娠高血圧症候群は不育症の多様な臨床型を示すが、抗リン脂質抗体症候群合併妊娠では過凝固 高サイトカイン 炎症系ネットワークに惹起された胎盤の形成機能不全がある。特に絨毛細胞が脱落膜細胞などの母体細胞群に遊走接触する胎盤形成初期は、細胞周囲微小環境におけるヘパリン/ヘパラン硫酸/増殖因子 (EGF、VEGF、HGF、FGF など) とその受容体を介する細胞内シグナル伝達系が遊走に重要な役割を演じているが、病態とその制御機構については知見が乏しい。ヘパリン/ヘパラン硫酸は CD44 や syndecan-4 を介し Akt、mTOR、PAK-1 といった細胞内シグナル伝達系分子により細胞遊走から組織形成過程に関与しており、シグナル伝達系の異常による胎盤形成機能不全に注目し、機構解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PIGF2、PIGF1、ヒト不死化絨毛培養細胞 (HTR-8/SVneo) における wound healing migration assay モデルでの細胞遊走関連情報伝達系リン酸化分子の検討

24 穴培養プレートに播種し、RPMI-1640 無血清培地に変更ののち増殖の過程を経時的に観察、コンフルエントののち 24 穴中央にスクラッチ線を作成、その機械的創傷に対し絨毛細胞の遊走、閉鎖を画像解析ソフトを有する倒立顕微鏡を用い細胞の存在しない部分の面積の経時変化を観察する (in vitro scratch migration assay)。PIGF2、PIGF1 添加による遊走能を評価する。

また、PIGF2、PIGF1 添加時の PAK1 リン酸化の検討を行った。

(2) 上記条件で各種濃度の TNF 存在下 (最終濃度 50ng/ml) 創面積の経時変化 (day0, day1, day2) を観察した (scratch assay)。

(3) 同細胞を上記条件で培養し、scratch 及び TNF 存在下 (最終濃度 50ng/ml) で PIGF 発現の経時変化 (0h、6h、24h、48h) を western blot 法で検討した。

4. 研究成果

(1) PLGF2 存在下 (最終濃度 10 100ng/ml) で、HTR-8/SV neo 細胞は閉創がコントロールと比較して有意に促進されたが、PLGF1 では認められなかった。PLGF2 存在下で、HTR-8/Svneo 細胞は浸潤能が有意に促進された。PLGF2 存在下で PAK-1 リン酸化が有意に促進された。

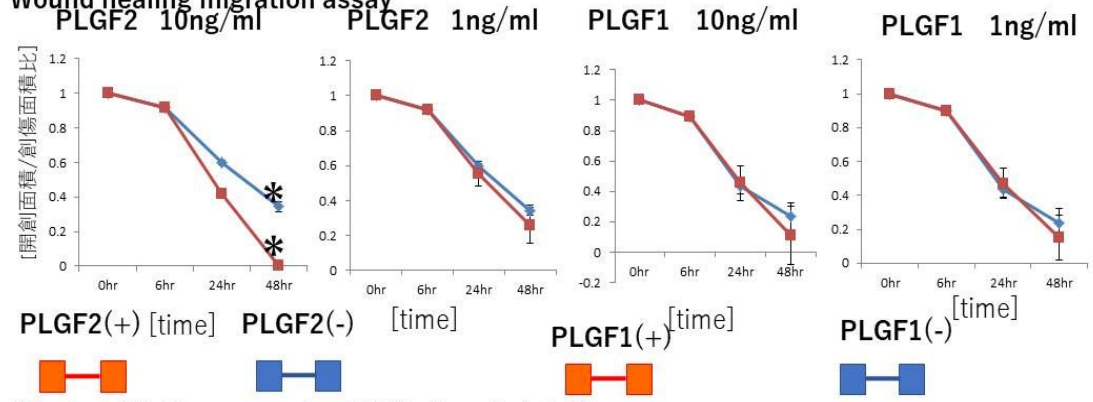
(図)

(2) TNF 存在下、HTR-8/SV neo 細胞は閉創がコントロールと比較して有意に抑制された。

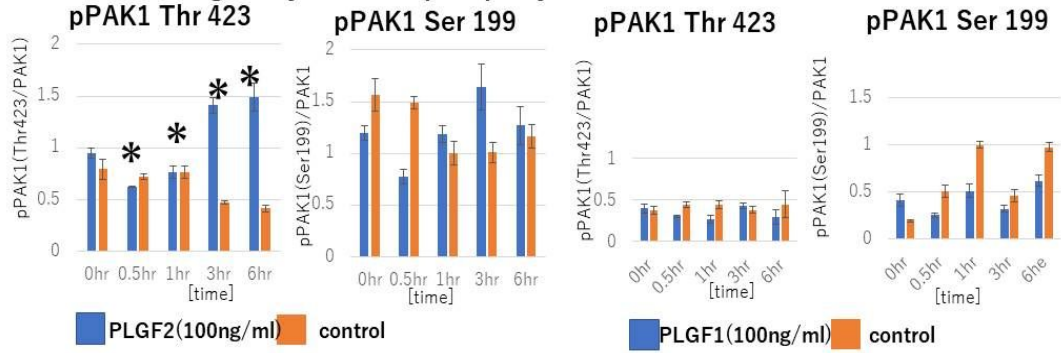
(3) 同存在下、同細胞は PIGF タンパク発現が有意に抑制された。

我々は不死化 EVT 細胞株 HTR-8/SVneo では外的投与 PIGF1 は PAK1 リン酸化を有意に示さず、遊走も促進させないが、細胞膜上のヘパリン/ヘパラン硫酸への結合のより起こりやすい PIGF2 は PAK1 リン酸化を誘導、遊走促進を示唆する。さらに TNF- は同細胞において PIGF1 ならびに PIGF2 発現をともに抑制する。これは sFLT1 の過剰発現とそれによる PIGF の母体血中での濃度低下が PIGF-VEGF-VEGFR1 シグナリング系を結果的に抑制し、HDP を発症する “two stage disorder” theory とは異なる機序を示唆する仮説である。炎症性サイトカインによる PIGF 産生の抑制が、細胞膜上での PIGF2- VEGF-VEGFR1 情報伝達系の抑制を惹起し、遊走移動が抑制される可能性を示したことは、HDP の治療に PIGF2 が PIGF2- VEGF-VEGFR1 情報伝達系を促進することで病態の改善をはかれる可能性を示した。

Wound healing migration assay



Western blotting assay for PAK1 phosphorylation



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 岩田智子、杉村基 |
| 2. 発表標題 胎盤成長因子(PLGF)による培養絨毛外絨毛細胞の遊走浸潤能の検討 Effect of placental growth factors on the cell migration and invasion in the extravillous trophoblast cell line |
| 3. 学会等名 日本産科婦人科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 城向賢、杉村基 |
| 2. 発表標題 Metformin存在下での培養絨毛外絨毛細胞の遊走浸潤能の検討 Cell migration in the extravillous trophoblast cell line by metformin through PAK-1 signal transduction |
| 3. 学会等名 日本産科婦人科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 杉村基 |
| 2. 発表標題 ヘパリン/ヘパラン硫酸/ヒアルロンンによるPAK-1シグナル情報伝達系を介した培養絨毛外絨毛細胞の遊走能調節機構の検討 Regulation of the cell migration in the extravillous trophoblast cell lines by heparin/heparan sulfate/hyaururonan through PAK-1 signal transduction |
| 3. 学会等名 日本血栓止血学会 |
| 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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 鳴本 敬一郎 (Narumoto keiichiro) (90647603) | 浜松医科大学・医学部・特任研究員 (13802) | |