

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11238

研究課題名(和文)胎盤絨毛細胞合体化の分子細胞生物学的機序の解明：妊娠高血圧症候群発症病態の解明

研究課題名(英文)Cell and molecular mechanisms of placental syncytialisation: pathogenesis of preeclampsia

研究代表者

工藤 美樹(KUDO, Yoshiki)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：80241082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：1. ヒト胎盤トロフォブラストのシンシチウム化を促進する分子であるsyncytinと抑制する分子であるsuppressynおよびそれらのレセプターであるASCT2の発現を妊娠高血圧症候群の胎盤において解析した。その結果、正常妊娠の胎盤と比較して妊娠高血圧症候群の胎盤ではsuppressynの発現の増強が認められた。

2. トリプトファン代謝酵素であるindoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の母体-胎児境界部位での発現動態を解析した。トロフォブラストの浸潤がIDOにより制御され、癒着胎盤においては脱落膜にIDOの発現が認められないことが発症病態である可能性が示唆された。

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周産期医療の発達した現在においても高頻度かつ母児共に生命に危険のある重篤な妊娠合併症である。その発症には胎盤の関与が示唆されており、病理組織学的にシンシチオトロフォブラストの形成不全が認められるのが特徴である。この研究で得られた結果は、シンシチオトロフォブラスト形成の調節機構、さらには妊娠高血圧症候群およびそれに合併する子宮内胎児発育不全の発症病態の分子生物学的機序の解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：1. The expression of syncytin, a molecule that promotes syncytialisation of human placental trophoblast, suppressyn, a molecule that suppresses syncytialisation, and ASCT2, a receptor for them, was analysed in the placenta of preeclampsia. As a result, enhanced expression of suppressyn was observed in the placenta of preeclampsia as compared with the placenta of normal pregnancy.

2. The expression kinetics of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a tryptophan-catabolising enzyme, was analysed at the maternal-fetal interface of human pregnancy. It was suggested that the invasion of trophoblast was controlled by IDO, and that no expression of IDO was observed in the decidua of placenta accreta, which could be the pathogenesis of this pathological pregnancy.

研究分野：産婦人科学

キーワード：胎盤 トロフォブラスト シンシチウム化 妊娠高血圧症候群 癒着胎盤

1. 研究開始当初の背景

ヒトの胎盤は血絨毛性胎盤で母体血液と直接に接する絨毛組織の最外層は多核合体細胞塊(シンシチウム、シンシチオトロフォブラスト)構造を有している。シンシチオトロフォブラストは母体胎児間の栄養代謝物交換やガス交換を行うとともに種々のホルモンや成長因子を産生しており正常な胎児成長発育に必要な胎盤機能の中心的な役割を果たしている。このシンシチオトロフォブラストはその下層に存在する単核のサイトトロフォブラスト同士が細胞融合することにより形成(シンシチウム化)されるが、その機序についてはほとんど解明されていない。最近になってシンシチウム化に関与する分子としてヒト内因性レトロウイルス(human endogenous retrovirus (HERV))のエンベロップ蛋白(envelope protein (env))のHERV-W env (syncytin) (Mi et al. (2000) Nature 403; 785-789)の関与が報告された。さらに、アミノ酸輸送担体を構成する蛋白のひとつであるCD98が、ウイルスによって誘発される細胞融合に関与する蛋白であるfusion regulatory protein-1と同一であることが判明した(Tsurudome & Ito (2000) Crit Rev Immunol 20; 167-196)。CD98はインテグリンを活性化することにより細胞融合を惹起する。ヒト胎盤においてもCD98の生理学的意義に関する研究は多く行われているが、そのほとんどはアミノ酸輸送に関するものでシンシチオトロフォブラストの形成に関するものは申請者が報告したのみである(kudo et al. (2003) J Physiol 550; 3-9, Kudo & Boyd (2004) FEBS Lett 577; 473-477)。

妊娠高血圧症候群は周産期医療の発達した現在においても高頻度かつ母児共に生命に危険のある重篤な妊娠合併症である。その発症には胎盤の関与が示唆されており、病理組織学的に子宮-胎盤血液循環不全による胎盤虚血(低酸素状態)およびシンシチオトロフォブラストの形成不全が認められるのが特徴である(Redman & Sargent (2005) Science 308; 1592-1594)。さらに妊娠高血圧症候群の胎盤では上述した syncytin のトロフォブラストでの発現量は低下すると共に発現部位が正常胎盤とは異なることが報告されている(Lee et al. (2001) Placenta 22; 808-812)。また、妊娠高血圧症候群には子宮内胎児発育不全が合併することが知られており、このような胎児では臍帯血中のアミノ酸の濃度は正常と比べて低下していて、胎盤を介するアミノ酸輸送能の低下が示唆されている(Marconi et al. (1999) Pediatr Res 46;114-119)。

2. 研究の目的

(1)ヒト胎盤におけるシンシチオトロフォブラストの形成とアミノ酸輸送活性が CD98 により制御されているかどうか、(2)CD98 以外にシンシチオトロフォブラストの形成に関与する分子の同定を行うこと、(3)低酸素状態がシンシチオトロフォブラストの形成、および CD98、上記(2)で同定したシンシチウム化に関与する分子の発現に影響を及ぼすかどうか、(4)正常妊娠および妊娠高血圧症候群の胎盤での CD98、上記(2)で同定した分子の発現動態を解析し比較することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CD98によるシンシチウム化およびアミノ酸輸送活性の制御

CD98タンパクの発現量を増加させるとシンシチウム化が促進されるかどうかを検討する。CD98を発現ベクター-のトランスフェクションによりBeWo細胞やクライマン細胞に過剰発現させる。CD98タンパク発現量の変化はウエスタンブロット法により解析し、発現部位の確認は免疫

細胞化学染色法により行う。シンシチウム化の程度は上記と同様の方法を用いて検討する。CD98に対するブロッキング抗体を用いた実験を行う。CD98に対するブロッキング抗体でそれぞれの細胞を処理後に、シンシチウム化の程度を検討する。シンシチウム化とCD98のアミノ酸輸送担体を構成するタンパクとしての機能との関係をさらに解析する。アンチセンス法を用いてCD98タンパクの発現量を抑制すると、シンシチウム化が低下するに伴ってCD98が関与しているアミノ酸輸送系(システム L, システム y⁺L)の輸送活性は低下していた(kudo et al. (2003) J Physiol 550; 3-9)。そこで、CD98を発現ベクタ - のトランスフェクションにより過剰発現させた場合、およびCD98に対するブロッキング抗体で細胞を処理した場合のそれぞれの条件下で、放射標識されたアミノ酸を基質として非標識アミノ酸を用いて交差阻害実験を行いCD98が関与しているアミノ酸輸送系(システム L, システム y⁺L)の輸送活性の変化を調べる。

(2)シンシチウム化に関与している分子の同定

シンシチウム化に伴う遺伝子発現の経時的変化を cDNA microarray 法により解析した結果(kudo et al. (2002) Placenta 23; 536-541)に基づいて、トロフォブラストのシンシチウム化に関与している新たな分子の同定を行う。すなわち、CD98の他にもこれまでシンシチウム化との関連が報告されている HERV-3 env と HERV-W env (syncytin)、syncytin のレセプタ - であるアミノ酸輸送タンパクの ASCT2、a disintegrin and metalloprotease (ADAM) domain family of proteins のうち ADAM8, 10, 18 などが cDNA microarray 法による解析の結果、シンシチウム化に関与している分子の候補として挙がってきている。これらのそれぞれの分子についても、CD98 での検討と同様にアンチセンス法や RNA 干渉法によりタンパクの発現を抑制したり、発現ベクタ - のトランスフェクション法により過剰発現させたりする。それぞれの条件下での、シンシチウム化の程度はフロ - サイトメ - タ - と hCG の分泌量により判定する。各分子の mRNA レベルおよびタンパクレベルでの発現量の変化はそれぞれ RT-PCR 法、ウエスタンブロット法により解析する。タンパクの発現部位の確認は免疫細胞化学染色法により行う。その際に必要な syncytin 抗体、ASCT2 抗体はすでに供与されており、HERV-3 env 抗体は提供を依頼する予定であり、ADAM 抗体は購入可能である。以上の検討によりこれらの分子のシンシチウム化への関与の有無を確認することができる。さらに、低酸素状態(酸素濃度; 2 または 5%)で細胞培養を行い、上記で同定した分子の発現量を遺伝子とタンパクのレベルで解析し、酸素濃度 20%で培養した時との結果と比較する。

(3)低酸素状態がシンシチウム化におよぼす影響

胎盤の低酸素状態は妊娠高血圧症候群の特徴のひとつである。その状態を模倣するために低酸素状態(酸素濃度; 2 または 5%)で細胞を培養し、シンシチウム化におよぼす影響を調べる。シンシチウム化の程度は BeWo 細胞ではフロ - サイトメ - タ - での測定と hCG の分泌量をエンザイムイムノアッセイで測定することにより判定する。クライマン細胞の場合は hCG の分泌量を測定することにより判定する。また、CD98に加えて(2)で同定したシンシチウム化に関与する分子の低酸素状態での発現量を遺伝子(RT-PCR法)とタンパク(ウエスタンブロット法、免疫細胞化学的染色法)のレベルで解析し、酸素濃度20%で培養した時との結果と比較する。

(4)ヒト胎盤組織でのシンシチウム化に関与する分子の発現動態

正常妊娠および妊娠高血圧症候群の胎盤を用いて、CD98に加えて上記(2)で同定したシンシチウム化に関与する分子の遺伝子およびタンパクレベルでの発現を解析し、正常胎盤でのそれらと比較する。上記と同様に遺伝子の発現量は RT-PCR 法、タンパクの発現量と発現部位はそれぞれウエスタンブロット法と免疫組織化学染色法により行う。

4．研究成果

(1)トロフォブラストのシンシチウム化に関する研究

正常妊娠のヒト胎盤組織で syncytin、ASCT2 の免疫組織染色を行うと、いずれの分子も多核のシンシチオトロフォブラストおよび単核のサイトトロフォブラストの細胞膜および細胞質に局在が認められた。妊娠高血圧症候群の胎盤においてもいずれの分子も発現が認められたが、ウエスタンブロット法で発現量を解析するとシンシチンの発現量は低下していた。トロフォブラストのシンシチウム化を抑制する分子として suppressyn が同定されたが、この分子も HERV のエンベロップタンパクであり、アミノ酸輸送タンパクの ASCT2 をレセプターとしている。そこでこの分子の発現動態を妊娠高血圧症の胎盤において解析した。暫定的な結果であるが、suppressyn の発現は正常妊娠の胎盤において、単核のサイトトロフォブラスト優位に発現が認められた。発現部位は細胞膜と細胞質であった。さらに、妊娠高血圧症候群の胎盤では suppressyn の染色の増強が認められた。以上の結果は、妊娠高血圧症候群の胎盤ではトロフォブラストのシンシチウム化を促進する分子である syncytin の発現の低下、シンシチウム化を抑制する suppressyn の発現の亢進により、シンシチオトロフォブラストの形成不全が生じている可能性を示唆する。

(2)トロフォブラストの浸潤に関する研究

トリプトファン代謝経路のうちキヌレニン経路の第一段階を触媒する酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の母体 - 胎児境界部位での発現動態を解析し、その機能の解明を試みた。IDO には二つのアイソフォームが同定されている (IDO-1、IDO-2)。この二つのアイソフォームの母体 - 胎児境界部位における発現動態を免疫組織化学染色法により解析した。その結果、IDO-1 は脱落膜の腺上皮、絨毛組織内の胎児の血管内皮およびマクロファージに発現が認められた。IDO-2 はシンシチオトロフォブラストに発現していた。IFN- γ は IDO-1 の遺伝子およびタンパクレベルでの発現を促進したが、この IFN- γ の効果は IDO-1 に特異的で IDO-2 に対しては認められなかった。母体 - 胎児境界部位における IDO の二つのアイソフォームの発現部位および IFN- γ への反応性が異なることは、それぞれのアイソフォームが正常妊娠御維持において特異的な役割を果たしていることが考えられる。すなわち、IDO の発現により局所でのトリプトファン濃度が低下し免疫細胞による拒絶反応を抑制したり、トロフォブラストの脱落膜組織および筋層内への浸潤が制御され、正常な胎盤形成が起こると考えられる。癒着胎盤の母体 - 胎児境界部位においては、脱落膜組織の IDO の発現が認められず、トロフォブラストの浸潤は子宮筋層内にまで及んでおり、このことが癒着胎盤の発症病態のひとつである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugimoto J, Schust DJ, Kinjo T, Aoki Y, Jinno Y and Kudo Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Suppressyn localization and dynamic expression patterns in primary human tissues support a physiologic role in human placentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 19502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55933-x.	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 該当する

1. 著者名 Kudo, Y., Koh, I., Yamazaki, T., Oomori, Y., Mukai, Y. and Sugimoto, J.	4. 巻 138
2. 論文標題 Indoleamine 2,3-dioxygenase and trophoblast invasion in caesarean scar pregnancy: Implications for the aetiopathogenesis of placenta accreta spectrum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Reprod. Immunol.	6. 最初と最後の頁 103009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2020.103099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudo, Y., Koh, I. and Sugimoto, J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase-2 at the human maternal-fetal interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Tryptophan Res.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1178646920984163	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本 潤、Schust Danny、工藤美樹
2. 発表標題 サブレンシン遺伝子の発現変化と細胞融合は酸素濃度に依存する
3. 学会等名 第27回日本胎盤学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Sugimoto, Yoshiki Kudo
2. 発表標題 O2 responses suggest a central role for suppressyn in trophoblast cell fusion
3. 学会等名 The 72nd Annual congress of the Japan society of obstetrics and gynecology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関根仁樹、杉本潤、工藤美樹
2. 発表標題 胎盤絨毛部および子宮内膜におけるインドールアミン酸素添加酵素 (IDO) の発現
3. 学会等名 日本生殖免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本潤、工藤美樹
2. 発表標題 Expression of the suppressyn protein in trisomy 21 placenta
3. 学会等名 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yoshiki Kudo	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 354
3. 書名 Fetal Morph Functional Diagnosis: Mendelian Disease	

〔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	古宇 家正 (Koh Iemasa) (10794779)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関