

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591288
 研究課題名（和文）ヘパリン結合性成長分化因子 Midkine のヒト胎児羊膜系における機能
 に関する研究
 研究課題名（英文）Studies on possible roles of midkine, a heparin-binding
 growth factor, in the human feto-amniotic unit
 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

研究成果の概要：

本研究により、ヘパリン結合性成長因子であるミッドカイン(MK)が羊膜に作用する「胎児シグナル」として働き、子宮収縮物質であるプロスタグランディンを産生する酵素である COX2 の発現抑制などを介して妊娠維持に関与している可能性が示唆された。また MK は ACTH 受容体の発現を抑制し、ヒト胎児副腎の恒常性維持に関与している可能性があることが示唆された。従来の研究成績とあわせ、MK は分娩発来機構の中にあつて抑制制御因子、あるいは恒常性維持因子として働いている可能性が推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：周産期医学、胎児医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：ミッドカイン、羊膜、胎児、副腎、羊水

1. 研究開始当初の背景

早産の予知・防止は今日の周産期学が抱える最大の課題である。この課題に取り組むためには分娩発来機構、裏返していえば妊娠維持機構の理解が不可欠であるが、ヒトを含む霊長類におけるこれら機序の解明は未だ道半ばである。あらゆる胎生動物において在胎期間は種特異的に正確に定められているが、これはその種において母体が分娩を安全に遂行することができ、かつ児が胎外生活を開始する上での最良のタイミングが決まってい

るということを意味する。以前より数多くの分娩発来機序に関する仮説が提唱されてきたが、「胎児が分娩のシグナルを発する」という仮説は胎児の成熟の終了が分娩のタイミングを決めるという点で極めて合理的であり、ヒトのように少ない数の同胞が一回の分娩で産まれる場合には、個々の児の生存にとって有利な状況を生む。羊においては、肺など胎児諸臓器の成熟にとって最も重要なホルモンであるコルチゾールが、妊娠末期に胎仔視床下部下垂体副腎系の成熟により増

加し、胎盤のステロイド産生に影響を及ぼし、プロゲステロンの減少とエストロゲンの増加をもたらす、これが trigger となって陣痛が発来することが Liggins らの研究以来明らかにされている。すなわちコルチゾールは羊における「胎児からの分娩シグナル」であるといえる。ヒトにおける胎児シグナルとしてのコルチゾールの意義は確定していないが、ヒト胎児においても分娩発来前にコルチゾール産生が増加することから、分娩発来機序に何らかの形で関与しているものと考えられる。

コルチゾールは妊娠中期以降に胎児副腎で主に産生される。我々は海外共同研究者と共にヒト胎児副腎の発育や機能に関わる複数の興味深い蛋白を見いだした。その中でヘパリン結合性成長分化因子に属する midkine (MK) がヒト妊娠中期胎児副腎に高発現しており、さらに前駆細胞のプールと考えられる外層由来の細胞のみに増殖活性を示すことを明らかにした (Ishimoto H et al. *J Clin Endocrinol Metab* 91(10):4050-56,2006)。コルチゾールは妊娠中期まで胎児副腎においてその産生が抑制されているが、これは主に key enzyme である HSD3B2 の発現が抑制されていることによる。この機序はこれまで明らかでなかったが、我々は MK が *in vitro* でコルチゾール産生の key enzyme である HSD3B2 の発現を抑制することを報告し、妊娠中期までの胎児副腎におけるコルチゾール産生抑制に関与している可能性を示した。

McLean の報告(Nat Med,1995)以来、分娩発来機構に CRH が重要な役割を担っている可能性を示すデータが蓄積されつつある。CRH は母体、胎児血中において分娩直前に著増するが、これは主に胎盤に由来する CRH である。CRH は下垂体において ACTH 産生を促進する。一方コルチゾールは視床下部においては CRH の産生を negative-feedback 機構により抑制することが知られているが、胎盤においては逆にコルチゾール産生を増加させる。我々の海外共同研究者である Jaffe 教授のグループは CRH が胎児下垂体を介してではなく直接副腎に働き、DHEAS やコルチゾール産生を促進することを示した。すなわち胎盤の CRH 産生と胎児副腎のコルチゾール産生の positive-feedback 機構が成立することとなり、これが分娩発来機構のエンジンとなり得る。

これまで我々が得てきた結果より、MK は HSD3B2 や ACTH 受容体の発現を抑制することからして、この分娩発来機構の中において抑制制御因子として働いている可能性が示唆される。

MK は分子量 13kDa の分泌蛋白であり、細胞増殖、分化、遊走の促進など多彩な生物活性を有する(<http://midkine.org>)。MK はマ

ウスでは胎生中期にピークを持つ一過性の発現を示し、生後も腎臓に発現が見られるがこれは加齢と共に減少する。ヒトでは生後正常組織での発現は極僅かである。興味深いことに、マウスでは胎生中期の羊水中に大量の MK 蛋白が存在することが明らかとなっているが (Obama H et al. *J Biochem* 118:88-93,1995)その意義は不明である。我々はヒト妊娠中期の羊水中においても同様に MK 蛋白が存在することを予備実験で得ている。羊水中の MK の産生源としては、まず羊膜上皮からの分泌が考えられる。マウスでは胎生初期には MK は羊膜に局在するが中期以降は発現が減弱することが知られている。妊娠中期以降は羊水の産生源は胎児尿が主体であることから、MK の産生源も尿由来である可能性がある。胎児尿細管機能は妊娠中期には未熟であり MK のような低分子の蛋白は原尿から再吸収を受けずに尿として羊水中に排出される可能性が高い。このことは早産児の尿蛋白がしばしば陽性になることから強く示唆される。またマウスでも遠位尿細管に MK 蛋白が付着していることが示されている。我々は MK がヒト妊娠中期胎児腎臓においても高発現していることをリアルタイム RT-PCR 法で確認した。さらに齧歯類で示されているように胎生中期の胎児肺でも MK は高発現しており肺発育にも関与しているとされることから、羊水中の MK が胎児肺由来の可能性も否定できない。本研究では羊水中の MK の産生源について検討すると共に、これがどのような作用を担っているのかについて探求してゆく予定である。特に MK は、我々がこれまで得てきた発現プロフィールより、齧歯類の結果と同様にヒトにおいても妊娠中期に一過性に発現がピークになる蛋白と考えられることから、羊水中の MK は「胎児がまだ発育・成熟中であることを伝えるシグナル」ではないか、換言すれば MK は胎児に由来する「妊娠維持のシグナルではないか」との仮説を立てるに至った。羊水中の MK は子宮(母体)との interface である羊膜にまず作用すると推定されることから、本研究で我々は MK の羊膜への作用に焦点を当て、羊膜が有するさまざまな機能に対する影響を、特に妊娠維持・分娩発来機構との関連において検討する。この点に関連して、我々はヒト羊膜培養細胞において MK の受容体の一つである syndecan が発現していることを予備的検討により確認した。

2. 研究の目的

ミッドカイン (midkine、以下 MK) は細胞増殖、分化、遊走の促進など多彩な生物活性を有し、マウスでは妊娠中期の胎児諸臓器で高発現するが正常成人臓器ではほとんど発現がみられないことが知られている。またマ

ウス羊水中にも存在することが知られているがその意義は不明である。これまでに我々は MK がヒト妊娠中期の胎児副腎に高発現し、胎児肺成熟や分娩発来にも関わるコルチゾール産生を妊娠中期において抑制している可能性を示してきた。しかし、他のヒト胎児臓器や羊水・羊膜における MK の発現や役割については不明な点が多い。

そこで本研究では、まず母児間コミュニケーションに関わる羊水・羊膜、および胎児臓器等における MK の発現を検討する。また MK は妊娠維持・分娩発来機構の中にあって抑制制御因子として働き妊娠維持に寄与している可能性が示唆されるが、本研究ではこの可能性について究明する。さらにヒト胎児-羊膜系における MK の作用機構や、MK に関連した分子についても細胞・分子生物学的に検討を加える。

3. 研究の方法

海外共同研究者との共同研究により以下について検討を加えた。

(1) 羊水中の Midkine(MK)に関する研究

ヒト羊水中の MK 濃度の変化と、その産生源に関する検討

① ヒト羊水中の MK 濃度

羊水中の MK 蛋白量を Western blot 法により測定する。

② 羊水中の MK 産生源の検討

羊膜 (妊娠中期、後期)、妊娠中期の胎児胎児諸臓器(肺、腎臓など)について MK mRNA 定量をリアルタイム RT-PCR 法により行う。MK 蛋白の局在は免疫組織化学により検討する。

③ 羊水、羊膜における組織 transglutaminase に関する検討

羊水中で MK が多量体化している可能性が高いため、MK 多量体化に寄与する酵素として知られる組織 transglutaminase(TGM2)の羊水や羊膜での存在を検討する。

④ MK の羊膜培養細胞に与える影響についての解析: 羊膜上皮細胞のプロスタグランジン(PG)E2 産生系への影響

羊膜細胞初代培養: 選択的帝王切開時に得られた羊膜より上皮細胞の培養を行う。羊膜上皮細胞では妊娠が進行するにつれ cyclooxygenase type2 (COX2)の発現が増強する。MK を添加し、COX2 発現への影響について検討する。

(2) 胎児副腎に関する研究

① ACTH 受容体の ontogenic な層別発現の検討

ヒト胎児副腎の各細胞層(DZ と FZ)から laser-capture microdissection 法により得られた RNA を用いリアルタイム RT-PCR 法で検討する。

② ACTH 受容体発現調節への MK 関与につ

いての検討

培養ヒト胎児副腎細胞に MK を添加し、ACTH 受容体発現への影響についてリアルタイム RT-PCR 法で検討する。

③ ヒト胎児副腎における血管新生部位の検討

免疫組織学的に細胞増殖マーカーと血管内皮マーカーの二重染色を行い、血管新生部位を明らかにすると共に、血管新生に関連する分子の発現、局在を上記の laser-capture microdissection 法および免疫組織学的に検討する。また DZ 細胞における MK の血管増生因子の発現調節を in vitro で検討する。

4. 研究成果

(1) 羊水中の Midkine(MK)に関する研究

MK 蛋白は羊水中に高濃度に認められ、妊娠中期の方が後期よりも3倍以上高濃度であった。また羊水中では多量体を形成している可能性が考えられた。MK は組織トランスグルタミナーゼ (以下、tTG) の作用を受けて多量体を形成し安定化することが知られているが、羊水中には tTG も高濃度に存在していた。また羊膜には MK は発現していないものの、MK 受容体である Syndecan-1 および-4 と LDL receptor 関連蛋白が発現していた。羊膜上皮培養細胞に対してヒトリコンビナント MK を添加すると、プロスタグランジン合成酵素である cyclooxygenase 2(以下、COX2)mRNA が時間および濃度依存性に減少した。ヒト羊膜では COX2 の発現は分娩の発来に向けて増強することが知られている。また MK は胎児臓器 (副腎以外では特に肺や腎) には発現しているものの羊膜には発現していない。したがって、胎児由来の MK が羊膜に作用する「胎児シグナル」として働き、COX2 の発現抑制などを介して妊娠維持に関与している可能性が示唆された。

(2) 胎児副腎に関する研究

① ACTH 受容体の ontogenic な層別発現の検討

laser-capture microdissection 法により妊娠中期胎児副腎 ACTH 受容体 mRNA は層により differential な発現量を示し DZ<FZ の関係であることが明らかになった。

② ACTH 受容体発現調節への MK 関与についての検討

培養ヒト胎児副腎細胞への MK 添加により ACTH 受容体 mRNA は量依存的に減少した。我々のこれまでの検討により MK は ACTH により発現が増強される。したがって MK の ACTH 受容体発現抑制は、ACTH 受容体を一定のレベルに保つヒト胎児副腎恒常性維持機構の一端を MK が担っていることを示唆するものと思われた。

③ ヒト胎児副腎における血管新生部位の検討

免疫組織学的に細胞増殖マーカーと血管内皮マーカーの二重染色を行い、血管増生 (angiogenesis) が DZ を中心におきている証拠を得た。またこれを裏付けるように DZ では血管増生因子の Angiopoietin-2 (Ang2)、VEGF-A や FGF-2 が高発現していること、Ang2 が FGF-2 により発現刺激をうけることを明らかにした。なお MK は血管増生因子の発現をパラクラインに調節することが知られているが、現時点までには DZ 細胞において血管増生因子調節に関与しているかは明らかではない。ただし、MK は DZ 細胞選択的に増殖刺激活性を示すこと、FGF-2 や MK の共役受容体であることが知られる Syndecan-3 が、我々の検討で DZ 特異的に発現していること等から、この可能性は十分にあるものと推察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Asai S, Ishimoto H, Kim SH, Higuchi T, Minegishi K, Tanaka M, Hoshino K, Morikawa Y, Yoshimura Y. Prenatal diagnosis of retroperitoneal teratoma: a case report and review of literature. Fetal Diagn Ther 25:76-78, 2009 (査読あり)

② Ishimoto H, Minegishi K, Higuchi T, Furuya M, Asai S, Kim SH, Tanaka M, Yoshimura Y, Jaffe RB. The periphery of the human fetal adrenal gland is a site of angiogenesis: zonal differential expression and regulation of angiogenic factors. J Clin Endocrinol Metab 93:2402-2408, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

① Ishimoto H, Minegishi K, Higuchi T, Asai S, Kim SH, Tanaka M, Yoshimura Y, Jaffe RB. Regulation of Expression of Angiotensin II Receptor Subtypes and ACTH Receptor by ACTH and Angiotensin II in Human Fetal Adrenal Cells. 90th Annual Meeting of the Endocrine Society (2008. 6. 17 発表)、San Francisco, USA

② 樋口隆幸, 石本人士, 金善恵, 浅井哲, 峰岸一宏, 田中守, 青木大輔, 吉村泰典. ヘパリン結合性成長因子 Midkine のヒト胎児羊膜系における発現についての検討. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2008. 4. 15 発表)、横浜 (パシフィコ横浜)

③ Ishimoto H, Higuchi T, Minegishi K, Asai S, Kim SH, Tanaka M, Jaffe RB, Yoshimura Y. Profile of Midkine, a Heparin-Binding Growth Factor, in Human Amniotic Fluid and Amnion. 55th Annual

Meeting of the Society for Gynecologic Investigation (2008. 3. 27 発表)、San Diego, USA

④ Higuchi T, Ishimoto H, Asai S, Minegishi K, Tanaka M, Yoshimura Y, Jaffe RB. Expression profile of a heparin-binding growth factor, midkine, in human fetal tissues and the placenta. 89th Annual Meeting of the Endocrine Society (2007. 6. 4 発表)、Toronto, Canada

⑤ Ishimoto H, Higuchi T, Asai S, Minegishi K, Tanaka M, Yoshimura Y, Jaffe RB. Down-regulation of ACTH receptor gene expression by an ACTH-inducible heparin-binding growth factor, midkine, in human fetal adrenal cells. 89th Annual Meeting of the Endocrine Society (2007. 6. 4 発表)、Toronto, Canada

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

樋口 隆幸 (HIGUCHI TAKAYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 30365332

(2008 年 4 月脱退)

浅井 哲 (ASAI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 70383867

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者 (海外共同研究者)

Robert B. Jaffe

カリフォルニア大学サンフランシスコ校・医学部・教授

(研究者番号: 該当せず)