

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591895
 研究課題名（和文）ヒト胎盤トロフォブラスト合胞体化機序の解析：妊娠高血圧症候群発症病態の解明
 研究課題名（英文）Study on the mechanisms of human placental trophoblast syncytialisation: implication for the pathogenesis of pre-eclampsia
 研究代表者
 工藤 美樹（KUDO YOSHIKI）
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：80241082

研究成果の概要（和文）：胎盤トロフォブラストの合胞体化のモデルである BeWo 細胞（forskolin 添加により細胞内 cyclicAMP レベルを上昇させると合胞体化が誘導される）を用いて、アミノ酸輸送担体を構成する蛋白である CD98 およびヒト内因性レトロウイルスのエンベロープ蛋白のひとつである HERV-W env（syncytin）とその受容体として同定されたタイプ D レトロウイルスレセプターである ASCT2 がトロフォブラストの合胞体化に関与していることを証明した

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that CD98 surface antigen, syncytin, an envelope gene of HERV-W (human endogenous retrovirus-W), and its receptor type D mammalian retrovirus receptor (ASCT2) are involved in the process of cell fusion necessary for syncytiotrophoblast formation using a cell model of syncytialisation (the cytotrophoblast cell line BeWo following increased intracellular cAMP by forskolin treatment).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、トロフォブラスト、妊娠高血圧症候群

1. 研究開始当初の背景

(1) 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胞体細胞塊（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栄養膜細胞（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オトロフォブラスト形成過程に関与する蛋白としてヒト内因性レトロウイルス（human endogenous retrovirus (HERV)) のエンベロップ糖蛋白（envelope glycoprotein (env)) のうちHERV-3 envとHERV-W env (syncytin) の関与が報告された。またsyncytinの受容体として同定されたタイプDレトロウイルスレセプターはアミノ酸輸送蛋白のASCT2であることが判明している。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らが報告したのみである。

(2) 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。さらに妊娠高血圧症候群の胎盤では上述した syncytin のシンシチオトロフォブラストでの発現量は低下すると共にその発現部位が正常胎盤とは異なることが報告されている。

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（シンシチウム化）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を検討する。

(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。

(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を検討する。

(4) 正常妊娠および妊娠高血圧症候群の胎盤における CD98、上記 2) で同定した分子の発現動態を解析し、妊娠高血圧症候群の発症病態への関与を検討する。

以上の検討により、胎盤シンシチオトロフォブラスト形成の調節機構、さらに胎盤低酸素状態とシンシチオトロフォブラスト形成不全が特徴である妊娠高血圧症候群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。

3. 研究の方法

(1) BeWo細胞を用いたシンシチウム化（細胞融合）の定量的測定：トロフォブラストのシンシチウム化のモデルであるBeWo細胞は、forskolin添加により細胞内cyclicAMPレベルを上昇させるとシンシチウム化が誘導される。この性質を有するBeWo細胞に緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein; GFP）と融合したヒストンH2B（H2B-GFP）および赤色蛍光タンパク質（DsRed）と融合したミトコンドリアチトクロムCと結合するタンパク（Mit-DsRed）をそれぞれ発現ベクターのトランスフェクションにより過剰発現させることにより、緑色蛍光を発する核を持つBeWo細胞と赤色蛍光を発するミトコンドリアを持つBeWo細胞のクローンをそれぞれ作成した。これらの2種類のBeWo細胞を50%の比率で混和しforskolin存在下で培養すると、シンシチウム化が起こり融合した細胞質の中に複数の緑の核と赤いミトコンドリアが存在する細胞が出現してくる。これをフローサイトメーターを用いて緑の蛍光のみ、赤い蛍光のみ、緑と赤の両方の蛍光を発する細胞の数をそれぞれ測定する。すなわち、緑と赤の両方の蛍光を発する細胞を細胞融合を起こした細胞と判定することにより、シンシチウム化を定量的に測定する。

(2) CD98、syncytin、ASCT2によるシンシチウム化の制御：シンシチウム化に伴うそれぞれの分子のmRNAレベルでの変化をRT-PCR法により、タンパクレベルでの変化をウエスタンブロット法により解析する。次に、RNA干渉法を用いて実験を行う。すなわち、それぞれの分子に対するsmall interfering RNAをBeWo細胞に導入し、mRNAレベルおよびタンパクレベルでの発現量の変化をそれぞれRT-PCR法、ウエスタンブロット法により解析する。シンシチウム化の程度はフローサイトメーターとhuman chorionic gonadotropin (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。また、CD98、syncytin、ASCT2タンパクの発現部位は免疫細胞化学染色法により確認する。

(3) 低酸素状態がシンシチウム化に及ぼす影響の解析：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フローサイトメーターでの測定とhCGの分泌量を測定することにより判定する。また、低酸素状態でのCD98、syncytin、ASCT2の発現量をmRNA（RT-PCR法）とタンパク（ウエスタンブロット法）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) ヒト胎盤組織におけるシンシチウム化に関与する分子の発現動態の解析：正常妊娠および妊娠高血圧症候群の胎盤を用いて、CD98、syncytin、ASCT2のmRNA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。mRNA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) CD98 によるシンシチウム化の制御：

① forskolin によって誘導される BeWo 細胞のシンシチウム化に伴って CD98 の発現は mRNA レベル、タンパクレベルともに経時的に上昇していた。

② BeWo 細胞を CD98 に対する small interfering RNA で処理すると forskolin に対する反応が変化し、CD98 タンパクの発現量は 1/2 に低下した。それに伴って、フロサイトメーターで測定した BeWo 細胞のシンシチウム化は抑制され、シンシチウム化の古典的マーカーである hCG の分泌も低下した。scrambled small interfering RNA を用いた実験では、CD98 タンパクの発現量、シンシチウム化の程度および hCG の分泌には変化が認められなかった。

③ 以上の結果より、CD98 がシンシチオトロフォブラストの形成過程に関与していることが証明された。

(2) syncytin および ASCT2 によるシンシチウム化の制御：

① forskolin によって誘導される BeWo 細胞のシンシチウム化に伴って、syncytin mRNA レベルは hCG 分泌が上昇するのに先立って上昇した。いっぽう、ASCT2 mRNA レベルは syncytin mRNA の推移とは相反して経時的に減少した。このことは細胞表面に存在する syncytin のレセプターがシンシチウム化に伴い減少すると考えられる。

② syncytin に対する small interfering RNA を BeWo 細胞に導入すると、syncytin の発現が RNA レベルおよびタンパクレベルともに低下した。この syncytin の発現レベルが低下した状態では、BeWo 細胞のシンシチウム化は抑制され、hCG の分泌も低下した。scrambled small interfering RNA を用いた実験では、上記の変化は認められなかった。以上の結果より、syncytin がトロフォブラストのシンシチウム化に関与していることが証明された。

③ ASCT2 に対する small interfering RNA を BeWo 細胞に導入すると、ASCT2 の発現が RNA レベルおよびタンパクレベルともに低下した。ASCT2 の発現レベルが低下した状態では、BeWo 細胞のシンシチウム化は抑制され、hCG の分泌も低下した。また、scrambled

small interfering RNA を用いた実験では、上記の変化は認められなかった。以上の結果より、syncytin の受容体である ASCT2 がトロフォブラストのシンシチウム化に関与していることが証明された。

(3) 低酸素状態がシンシチウム化に及ぼす影響：

① BeWo 細胞を低酸素状態（酸素濃度；2%）で培養すると、forskolin によって誘導される BeWo 細胞のシンシチウム化は抑制された。酸素濃度を低酸素状態（2%）から正酸素状態（20%）に上昇させると、シンシチウム化の抑制は解除された。hCG の分泌も同様で、低酸素状態では抑制されており、正酸素状態に戻すことにより抑制は解除された。

② シンシチウム化に関与していることが解明された分子である syncytin の発現は、低酸素状態では forskolin 存在下および非存在下において mRNA レベル、タンパクレベルともに低下していた。すなわち、低酸素状態では syncytin の発現が低下することによって、トロフォブラストのシンシチウム化が抑制されていることが推測できる。

③ syncytin の受容体である ASCT2 は、forskolin 存在下において正酸素状態（20%）で認められた経時的な発現の低下は、低酸素状態では消失した。

④ 以上の結果より、低酸素状態ではトロフォブラストにおける syncytin および ASCT2 の発現調節に異常が生じ、それによってシンシチウム化が障害される。すなわち、低酸素状態が特徴である妊娠高血圧症候群の胎盤においては、低酸素による syncytin の発現低下および ASCT2 の発現異常によってシンシチオトロフォブラストの形成不全が生じる可能性が示唆される。

(4) ヒト胎盤組織におけるシンシチウム化に関与する分子の発現：

① 正常妊娠の胎盤組織を用いて CD98 の免疫組織化学染色を行うと、CD98 の発現はシンシチオトロフォブラストとその下層に存在するサイトトロフォブラストに認められた。特にシンシチオトロフォブラストにおいては、基底膜側に高度に発現していた。

② 正常妊娠および妊娠高血圧症候群の胎盤絨毛組織よりタンパクを抽出しウエスタンブロット法により CD98 および syncytin のタンパク発現量を検討すると、CD98 の発現量には変化が認められなかったが、syncytin の発現量は妊娠高血圧症候群の胎盤絨毛組織において明らかに低下していた。すなわち、上記研究成果 (3) - ④での推測が、妊娠高血圧症候群の胎盤の絨毛組織レベルにおいて認められることが証明された。

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 7 件)

- ① Sakashita T, Nobuzane T, Miyoshi H, Fujiwara H and Kudo Y, Effects of menopause and hormone therapy on erythrocyte deformability. *Menopause* 2009; 16: 555-558. 査読あり
- ② Urabe S, Miyoshi H, Fujiwara H, Yamaoka K and Kudo Y, Enhanced expression of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the myometrium of pregnant rats in preterm delivery models. *Reprod Sci.* 2009; 16: 1186-1192. 査読あり
- ③ Nobuzane T, Tashiro S and Kudo Y, Morphologic effects of epithelial ion channels on the mouse uterus: differences between raloxifene analog (LY117018) and estradiol treatments. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008; 199: 363.e1-6. 査読あり
- ④ Tanigawa M, Miyoshi H, Samura O, Sugino K, Fujito N, Hyodo M, Mihar N and Kudo Y, Cell-free fetal DNA in the non-pregnant woman with thyroid disease disappeared after surgery. *Clin Chim Acta.* 2008; 397: 101-102. 査読あり
- ⑤ Regnault T, Kudo Y, Glazier J, Roos S, Lewis R and Jansson T, Heterodimeric amino acid transporters in the placenta. *Placenta* 2007; 28: S103-S106. 査読あり
- ⑥ Morrish DW, Kudo Y, Caniggia I, Cross J, Evain-Brion D, Gasperowicz M, Kokozidou M, Leisser C, Takahashi K and Yoshimatsu J, Growth factors and trophoblast differentiation. *Placenta* 2007; 28: S121-S124. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① 信実孝洋、松山 聖、工藤美樹 ヒト絨毛癌細胞 (BeWo) の細胞融合に及ぼす syncytin とそのレセプター (ASCT2) の影響 第17回日本胎盤学会、2009年10月17日、東京
- ② Sakashita T and Kudo Y, Circulating endothelial progenitor cells and placental abruption. *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* 2009, 12th September 2009, Oxford, UK.
- ③ Nobuzane T, Matsuyama S and Kudo Y, RNA interference-induced reduction in ASCT2 expression suppresses cell fusion of human placental BeWo cells. *International Federation of Placental Association Meeting* 2009, 8th October 2009, Seggau Adelaide,

Australia.

- ④ Nobuzane T and Kudo Y, RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialisation of human placental BeWo cells. *International Federation of Placental Association Meeting* 2008, 12th September 2008, Seggau Castle, Austria.
- ⑤ 工藤美樹 ヒト胎盤トロフォブラストーその多彩な機能についてー 第16回日本胎盤学会学術集会、2008年11月13日、浜松市
- ⑥ Kudo Y, Hypoxia suppresses expression of syncytin and cell fusion during syncytialisation of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *14th World Congress on Gestational Trophoblastic Diseases*, 14th November 2007, Fukuoka, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/sanfu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 美樹 (KUDO YOSHIKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80241082

(2) 研究分担者

三好 博史 (MIYOSHI HIROSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：40294590

(H20 ～ ：研究協力者)

信実 孝洋 (NOBUZANE TAKAHIRO)

広島大学・病院・助教

研究者番号：80403559

(3) 連携研究者

なし