

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791172  
 研究課題名 (和文) SPINT1 を介した胎盤絨毛形成・維持機構の解明：  
 正常および異常妊娠における役割  
 研究課題名 (英文) SPINT1 in human placental morphogenesis  
 in normal and abnormal pregnancy  
 研究代表者  
 森 美貴 (MORI MIKI)  
 日本医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：00277576

研究成果の概要：胎盤ラングハンス細胞の特異的なマーカーである SPINT1 機能を解明するために、*in vivo* における関連分子の発現解析、RNA 干渉技術を用いた機能解析を行うことを目的として研究を行った。ヒト胎盤において SPINT1 および関連因子が妊娠週数とともに上昇する新知見を得た。さらに、*shSPINT1* による *in vitro* 栄養膜細胞解析モデルを作製した。初期の胎盤形成時だけでなく、妊娠期間を通して SPINT1 が絨毛形成機構、および絨毛構造の恒常性維持機構においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・産婦人科学

キーワード：産科学、ヒト胎盤、ラングハンス細胞、SPINT1

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト胎盤絨毛の構造が、成書の記載(定説)とは異なり、正常胎盤においてもラングハンス細胞層は断裂せず、層構造が維持されていることをはじめて明らかにしてきた(Mori et al. *Biol Reprod* 76: 164-172, 2007)。SPINT1(肝細胞増殖因子(HGF)の胎盤における機能は不明のままでしたが、最近、*Spint1* ノックアウトマウスを解析したところ、胎盤初期絨毛膜上の栄養膜細胞に存在するセリンプロテアーゼである matriptase (ST14)の SPINT1 による

特異的抑制が働かないと栄養膜細胞の層構造が破堤し、栄養膜合体への分化が起こらず、胎盤迷路層の絨毛形成不全により胎盤機能不全を起こし、妊娠 10.5 日目に胎児死が引き起こされることが示され、妊娠初期の胎盤形成における SPINT1 の重要性が報告された。しかし、「SPINT1 の胎盤における役割は妊娠初期だけなのだろうか？」という疑問が残された。

## 2. 研究の目的

今回の研究により、胎盤ラングハンス細胞の特異的なマーカーである SPINT1 機能、SPINT1 が特異的に発現しているラングハンス細胞層の新しい機能を解明するために、

(1) In vivo 正常胎盤における SPINT1 関連分子発現解析、(2) In vivo 異常妊娠の胎盤絨毛解析、(3) ヒト由来ラングハンス細胞の培養細胞系において、RNA 干渉技術(RNAi)を用いてラングハンス細胞における SPINT1 mRNA をノックダウンすることにより、ラングハンス細胞の形態変化(特に接着装置の動態)と、SPINT1 関連因子の発現変動を解析、さらに、(4) 低酸素状態における SPINT1 機能解析を行うことを目的として、研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) In vivo 正常胎盤における SPINT1 関連分子発現解析: SPINT1 および、それに関与する HGF 活性化経路の因子(ST14 (HGF 活性化因子)、HGF、MET(HGF の受容体))が、妊娠週数および絨毛系統の中でどの様に発現しているのか real-time PCR 法を用いて解析した。

(2) In vivo 異常妊娠の胎盤絨毛解析: 異常妊娠において胎盤絨毛は直接または間接的に障害を受けている。SPINT1 関連分子、細胞骨格関連分子に関する胎盤絨毛組織の分子構築を、光顕レベルで電子顕微鏡の解像力に迫る、独自に開発した超高分解能蛍光顕微鏡法を軸に解析を行った。

(3) short hairpin RNA (shRNA)によるノックダウン解析: EmGFP 付きベクター(invitrogen社)を用いて shSPINT1 を作製した。絨毛栄養膜細胞株(BeWo 等)に導入し、ラングハンス細胞間接着分子の生化学的および組織化学的解析を行った。

(4) 低酸素状態における SPINT1 機能解析: 妊娠高血圧症候群において、胎盤の酸素濃度が低下し、栄養膜からの fms-related tyrosine kinase 1 等の放出、胎盤機能不全が引き起こされる。そこで、in vitro のモデルとして低酸素状態で培養した BeWo における SPINT1 に関連する生化学的および組織化学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) In vivo 正常胎盤における SPINT1 関連分子発現解析: SPINT1 および関連因子が妊娠週数とともに上昇すること、絨毛系統において、一番末梢の母児間輸送の鍵となる終末絨毛において強い発現を示す新知見を得た(図1)。このことは、初期の胎盤形成時だけでなく、妊娠期間を通して SPINT1 が絨毛形成機構、および絨毛構造の恒常性維持機構においても重要な役割を果たしている可能性が

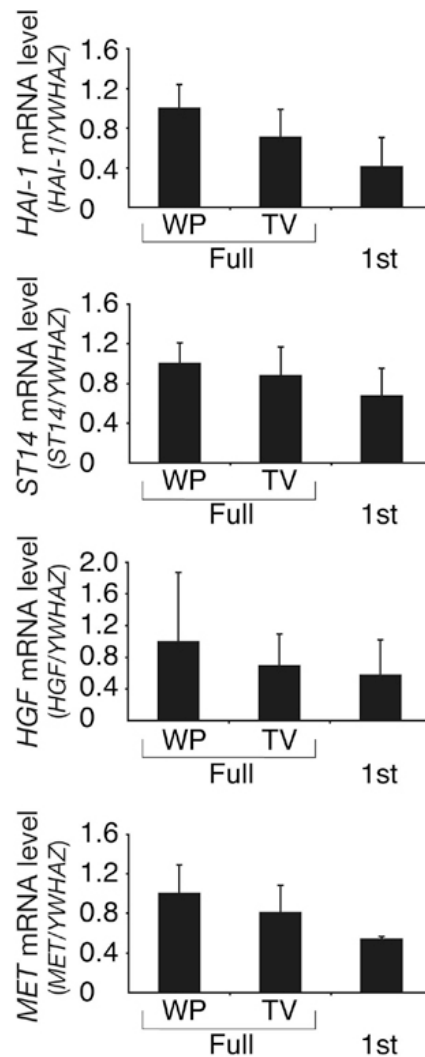


図1 In vivo 正常胎盤における SPINT1 関連分子発現に関する real-time PCR 解析。

1st, first-trimester placenta; Full, full-term placenta; WP, whole placenta; TV, terminal-villus-rich fraction of full-term placenta. mRNA expression was normalized to that of YWHAZ mRNA.

示唆された。

(2) In vivo 異常妊娠の胎盤絨毛解析: サイトケラチン7の免疫染色から、正常胎盤絨毛組織と比較して、妊娠高血圧症候群の胎盤絨毛組織では、絨毛栄養膜のサイトケラチンの分布に異常を示す所見を得た。

(3) short hairpin RNA (shRNA)によるノックダウン解析:

① In vitro のモデル系として絨毛栄養膜細胞株(BeWo 等)にて、SPINT1 が発現していることを免疫組織化学および real-time PCR にて検証した。

② SPINT1 に対する GFP 融合 shRNA(shSPINT1)を作製した。BeWo 細胞を

用いて、作製した3つの抑制効果の検証を行い、mRNAレベル、蛋白質レベル、および免疫組織化学レベルにおいて、十分なSPINT1抑制効果を持つことを明らかとなった。

③shSPINT1によるノックダウン BeWo 細胞において、E-cadherin (CDH1)には著明な変化が観察されなかったが、matriptase (ST14)の発現低下と、METの発現増強を認めた。

(4)低酸素状態におけるSPINT1機能解析：低酸素環境では、SPINT1の発現低下とともに、CDH1およびST14の発現低下が観察された。これは、正常の胎盤環境とは異なり、病的環境において、SPINT1、SPINT1関連分子、および接着分子の動態が大きく変動し、胎盤絨毛組織の病的構造変化に関与する可能性を示唆する所見であると考えられた。

今回、RNAi技術によるin vitro栄養膜SPINT1解析モデルを作製した。共焦点顕微鏡および免疫電子顕微鏡による詳細な形態学的解析及び網羅的なシグナル伝達系の生化学的解析が課題として残された。

## 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)

成果は投稿準備中である。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森 美貴 (MORI MIKI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00277576

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者