

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09781

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の病態形成に対するトロホプラスト由来exosomeの関与

研究課題名(英文) Trophoblast-derived exosome on the pathogenesis of preeclampsia

研究代表者

松原 圭一 (Matsubara, Keiichi)

愛媛大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：80263937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：絨毛外栄養膜細胞(EVTs)から上清に放出されたexosomeをExoQuick-TCで抽出することができた。EVTsにおけるHMGA1は胎盤形成に関与し、妊娠高血圧症候群(HDP)患者由来EVTsでは細胞外に放出され遠隔臓器に運搬されることによって病態形成に関与している。抽出したexosomeに対してproteosome assayを行ったところHMGA1蛋白の発現が増加していた。さらにPrincipal component分析・Protein-protein interaction ネットワーク解析によって複数個のハブ蛋白がHDPの病態形成に関与していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってHMGA1が妊娠高血圧症候群の病態形成に重要な役割を果たしていることが分かった。さらにHMGA1は絨毛細胞の核から細胞質内・細胞外に放出されて病態形成に関与していることがわかった。これは世界的にも報告のない発見であり、学術的に非常に重要な意味を持つ。HMGA1が妊娠高血圧症候群の病態形成に関与しており、特にHMGA1の核外そして細胞外への放出が重要であり、この過程をdeoxycholic acid(DCA)がWNT/Cat系を介して促進することが分かった。従って、これらの作用をさらに解析することによって病態改善の手段を手に入れることができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Exosomes released into the supernatant from extravillous trophoblast cells (EVTs) could be extracted by ExoQuick-TC, and HMGA1 in EVT is involved in placentation, and in EVT from HDP patients it is involved in pathogenesis by being released extracellularly and transported to distant organs. Proteosome assay of the extracted exosomes showed increased expression of HMGA1 protein. Furthermore, we found that multiple hub proteins are involved in the pathogenesis of HDP by analysis of the principal component and the protein-protein interaction network.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠高血圧症候群 エクソソーム 絨毛細胞 高血圧

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群（HDP）の病態形成は Two-stage theory によって理解される様になり，着床期における 1st stage では絨毛外栄養膜細胞（EVTs）による脱落膜・子宮筋層への浸潤が障害された結果，らせん動脈の remodeling が障害され，妊娠中期以降の 2nd stage において血流障害に伴う胎盤形成不全によって胎盤から産生される sFlt-1 をはじめとする血管新生障害因子や血管収縮因子が母体血中に放出されて多臓器不全が生じると考えられた。1st stage における EVTs の増殖・浸潤は正常妊娠における胎盤形成において非常に重要な役割を果たしている。そして，HDP ではその過程が障害されていることが分かっている。しかし，そのメカニズムについてはよく分かっていない。我々は，転写因子であり癌の増殖に関与している high mobility group AT-hook 1（HMGA1）に注目して研究を行ってきた。そして，先行研究によって HMGA1 が妊娠高血圧症候群で核外に移行することによって EVTs の増殖・浸潤が障害されていることを発見した。最近，蛋白や DNA あるいは RNA が細胞外に放出され遠隔臓器に作用するには分解・代謝を防ぐために exosome を含む細胞外小胞（EVs）に含まれた状態で輸送されるメカニズムが知られている。HMGA1 も exosome に含まれた状態で遠隔臓器に運搬されている可能性がある。

2. 研究の目的

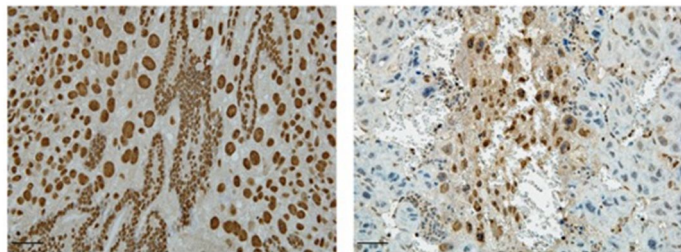
HMGA1 を含む蛋白が遠隔臓器に作用するには直接組織に運ばれて作用するか，もしくは，EVs に含まれた状態で運ばれるかのいずれかの手段が必要である。しかしながら，全身の多くの臓器に一斉に作用するには EVs によって運搬されるメカニズムが合理的である。我々は，HMGA1 が遠隔臓器に作用するメカニズムについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) HDP モデルマウスの改良作成：受精卵を卵管から採取し，培養することによって多数（100 個前後/実験）の胚盤胞を得ることができるようになった。これにアデノウイルスを用いて免疫応答を活性化させる CD40L を infect させ，HDP モデルマウスをコンスタントに作成できるようになった。
- 2) HDP モデルマウスの受精卵移植後 3 日目に屠殺し，子宮を取りだして受精卵周囲の状態を HE 染色し顕微鏡下に確認した。さらに免疫染色で HMGA1 の局在を確認した。
- 3) HDP 患者胎盤組織を HMGA1 に関して免疫染色を行った。
- 4) 母体血漿中 HMGA1 濃度を ELISA によって測定した。
- 5) 2% O₂ の低酸素環境（着床期の生理的な酸素濃度）で deoxycholic acid (DCA : 0.5mM) を EVTs (HTR8/SV40neo) に添加して 24 時間培養し，ELISA で上清中の HMGA1 濃度を測定した。
- 6) 2% O₂ の低酸素環境（着床期の生理的な酸素濃度）で deoxycholic acid (DCA : 0.5mM) を EVTs (HTR8/SV40neo) に添加して 24 時間培養し，上清から exosome を抽出し，DIA-proteome assay を行い HMGA1 の exosome における濃度変化を測定した。さらに，exosome における重要なハブ蛋白を解析抽出した。
- 7) DCA による EVTs への影響における細胞内 signaling pathway を解析するため，WNT/ catenin の変化について western blotting・RT-PCR を用いて検討した。

4. 研究成果

- 1) HDP モデルマウスをコンスタントに作成できるようになった。以前のモデルマウスでは子宮内から胚盤胞を抽出していたため一度に採取できる胚盤胞数が多くて 10~20 個と少なく，実験を定期的に行うことができなかった。現在は，卵管から受精卵を採取し，in vitro で培養することによって一回の実験に 80~100 個の胚盤胞をもちることができるようになり，定期的の実験を行うことができるようになった。
- 2) HDP モデルマウスの着床期における子宮に対して HMGA1 の免疫染色を行った。その結果，HMGA1 は核内から細胞質，さらに，細胞外にも放出されていた (Fig1)。
- 3) HDP 患者の胎盤では EVTs の核内から細胞質に HMGA1 が放出されていることが確認された (Fig2)。この現象は正常妊娠胎盤では認められないことから



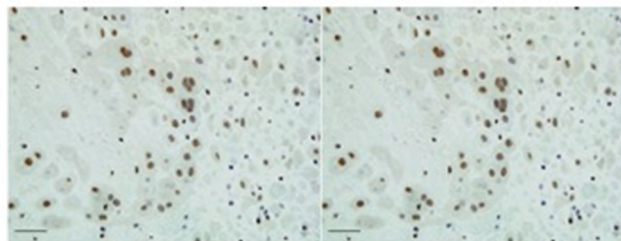
controlマウス

HDPモデルマウス

Fig1. HDPモデルマウスの妊娠初期におけるHMGA1のEVTs細胞外放出

HDP の病態に関与していることは明らかだった。そこで EVT の細胞外への HMGA1 の移行について検討を行った。

- 4) 正常妊婦と HDP 患者血漿における HMGA1 濃度を ELISA によって測定したところ、HDP 患者において HMGA1 が有意に高値を示した。この結果、胎盤内の HMGA1 は HDP において胎盤内から血管内にも放出されていることが分かった。
- 5) ヒト EVT 細胞株 (HTR8/SV40neo) を sub confluency になるまで培養し、低酸素状態で DCA を添加した。(DCA は核外に HMGA1 を放出することを確認済み) 培養上清の HMGA1 濃度を ELISA によって測定したが、低濃度であり control との間に差を認めなかった。
- 6) 同様にヒト EVT 培養し、低酸素状態で DCA を添加し、培養上清から exosome を抽出した。表面抗原によって exosome であることを確認し、exosome 内のタンパク質量を DIA proteome assay によって解析した。exosome 内の HMGA1 は著明に増加した。さらに、他の high mobility group 系タンパク質では HMGN1 が HMGA1 よりも著明な高値を示しており、HDP の病態形成に関与している可能性が考えられた。
- 7) 上述の様に上清から抽出した exosome に対して DIA proteasome assay を行い、high mobility group 系以外の蛋白の解析を行い、ハブ蛋白を抽出した。
- 8) HMGA1 による細胞内 signaling pathway を解析するために、細胞内 Wnt/ cat 系の変化について検討を行った。RT-PCR では HMGA1 siRNA によって Wnt5a mRNA が減少したことから、HMGA1 の下流に Wnt5a が存在していることが分かった。また、western blotting によって catenin の発現が DCA の刺激によって増加したことから、HMGA1 の作用には Wnt5a/ cat が重要な役割を果たしていると考えられた。



正常妊娠胎盤

HDP患者胎盤

Fig2. ヒト胎盤のEVTs内におけるHMGA1局在の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsubara K, Matsubara Y, Uchikura Y, Takagi K, Yano A, Sugiyama T	4. 巻 11
2. 論文標題 HMGA1 Is a Potential Driver of Preeclampsia Pathogenesis by Interference with Extravillous Trophoblasts Invasion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11060822	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 -

1. 著者名 松原 圭一	4. 巻 63
2. 論文標題 妊娠高血圧症候群 (HELLP症候群を含む)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 今日の治療指針	6. 最初と最後の頁 1400-1402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Matsubara K, Matsubara Y, Uchikura Y, Sugiyama T	4. 巻 22
2. 論文標題 Pathophysiology of Preeclampsia: The Role of Exosomes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052572	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 -

1. 著者名 松原 圭一	4. 巻 39
2. 論文標題 妊娠高血圧症候群 新基準とケア. 病態メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Perinatal care	6. 最初と最後の頁 12-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 松原 圭一	4. 巻 39
2. 論文標題 妊娠高血圧症候群 新基準とケア. 病態メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Perinatal Care	6. 最初と最後の頁 12-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 松原 圭一	4. 巻 4966
2. 論文標題 妊娠高血圧症候群の管理と降圧薬の使い方. 2. 妊娠高血圧症候群の管理 (病型分類ごと)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 25-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 内倉友香, 松原圭一, 松原裕子, 高木香津子, 宇佐美知香, 安岡稔晃, 井上彩, 横山真紀, 上野愛美, 丹下景子, 𠮷田文香, 井上翔太, 矢野晶子, 藤岡徹, 松元隆, 杉山隆
2. 発表標題 絨毛外栄養膜細胞の機能発現に, HMGA1はWNT系を介して関与する
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiichi Matsubara
2. 発表標題 Symposium 2: Preeclampsia and Immunology: New model mouse clarifies the immunological pathogenesis.
3. 学会等名 14th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Uchikura, Keiichi Matsubara, Yuko Matsubara, Kazuko Takagi, Takashi Sugiyama.
2. 発表標題 The Production and Role of High-Mobility Group A1 Protein on Extravillous Trophoblast.
3. 学会等名 66th Annual Scientific Meeting of Society for Reproductive Investigation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内倉 友香、松原 圭一、松原 裕子、杉山 隆
2. 発表標題 絨毛外栄養膜細胞の機能発現に、HMGA1はWNT系を介して関与する
3. 学会等名 第41回日本妊娠高血圧学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保 絢音, 松原 圭一, 内倉友香, 高木香津子, 松原裕子, 杉山 隆
2. 発表標題 Nicotinelは絨毛細胞由来exosome内のproteomeに影響を与えることによって妊娠高血圧腎症の病態形成に関与している
3. 学会等名 第31回腎と妊娠研究会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------