

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09835

研究課題名(和文) 妊娠高血圧腎症発症のブラックボックス～脱落膜細胞に対するハイポキシアの影響解明～

研究課題名(英文) Study of the hypoxic effect on uterine decidua

研究代表者

久保田 海雄 (Kubota, Kaiyu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・研究員

研究者番号：70806174

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)：妊娠高血圧症候群では、胎盤において低酸素(ハイポキシア)が認められることから、このハイポキシアが発症の要因となると考えられている。本研究では、胎盤のうち、子宮側の組織である脱落膜に対するハイポキシアの影響を解析した。その結果、ハイポキシアが脱落膜における様々な遺伝子の発現を変化させ、脱落膜の機能に影響することを明らかにした。

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妊婦の20人に1人が発症する。合併症を伴い重症化しやすく、脳出血や肝機能障害を母体に引き起こし、また胎児には発育不全や致死等の重篤なリスクを伴う。現在、発症機序が不明であるために、早期分娩以外の根本的な治療法が存在しない。これまで胎盤の栄養膜に対するハイポキシアの影響が研究されてきたが、本研究では胎盤の脱落膜に対するハイポキシアの研究を行い、診断マーカーや治療法の開発のために必要な発症機序の解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：Pregnancy induced hypertension including preeclampsia affects about 5% of all pregnancy and causes fetal growth restriction, HELLP syndrome, seizures, cardiovascular diseases, liver damages and so on. Since its etiology is not yet determined, the only intervention is the early delivery, which may make other lifelong complications to the babies. Therefore, the understanding of pathophysiology is important. In this study, we investigated the effect of hypoxia on uterine decidua and found many genes were regulated by hypoxia in the decidual cells. Our findings would help to develop the diagnosis and treatment in future.

研究分野：妊娠生理、繁殖生理

キーワード：子宮脱落膜 ハイポキシア

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症とその治療法

妊娠 20 週以降に高血圧を認める妊娠高血圧症候群の中で、蛋白尿を伴う場合を妊娠高血圧腎症と呼び、合併症を伴い重症化しやすく、妊婦の約 5% が発症する。重症化すると、子癇や脳出血、肝機能障害等を母体に引き起こし、また胎児には発育不全や致死等、母児共に重篤なリスクを伴う。発症機序の全容が不明であるために、未熟児等の問題がある早期分娩以外の根本的な治療法が存在しない。そこで、妊娠高血圧腎症の早期診断マーカーや治療法の開発のために、その発症機序を解明することは社会的、学術的に重要性が高い。

現在までに明らかとなっている断片的な発症機序

妊娠 10 週以前、子宮内は低酸素状態(ハイポキシア)である。胎盤を構成する栄養膜細胞はハイポキシアにより浸潤が促進し、子宮らせん動脈の血管内皮細胞を置換、それに伴い妊娠中期以降に血管拡張・血流増大が起こり、胎児に酸素(ハイポキシア解消)や栄養が供給される。一方、妊娠高血圧腎症の胎盤では、何らかの原因により栄養膜細胞浸潤不全であり血管形成不全となり、妊娠中期以降もハイポキシアが継続される。ハイポキシアは培養栄養膜細胞の胎盤成長因子(PGF)産生を抑制し、可溶性の血管新生増殖因子受容体(sFLT)産生を促すことが知られている。PGF は血管新生増殖因子(VEGF)ファミリー - 因子であり血管新生作用を持ち、また sFLT はリガンドと競合し血管新生作用を阻害する。実際、妊娠高血圧症候群を発症した母体循環系では VEGF や PGF の値が低く、一方で sFLT の値が高い。母体循環系におけるこれらの因子のために妊娠高血圧症候群に認められる全身性血管内皮障害が起こると考えられる。以上、血管形成不全による虚血・ハイポキシアが栄養膜細胞からの炎症因子産生を促し、母体循環により妊娠高血圧腎症が発症すると考えられてきた。一方で、栄養膜細胞が産生する炎症因子だけでは病態を完全に再現できないため、更なる病態・発症機序の解明が必要である。

2. 研究の目的

胎盤は栄養膜細胞と脱落膜細胞から構成され、栄養膜細胞の浸潤には脱落膜細胞との相互作用も関与する。ハイポキシア - 栄養膜細胞 - 妊娠高血圧腎症の関連性が報告されている一方、胎盤の残り半分を構成する脱落膜細胞に対するハイポキシアの影響は不明であった。そこで、ヒト脱落膜細胞に対するハイポキシアの影響を解析することで妊娠高血圧腎症発症機序の一因解明を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 栄養膜細胞におけるハイポキシアの影響の解析

最初に本研究を始めるに当たり、胎盤検体や試薬(RNA 干渉のためのレンチウイルスコンストラクトや特異的抗体)の有用性を検証するために、既にハイポキシア研究が進んでいる栄養膜細胞を用いて種々の実験系の確認を行った。まず絨毛癌由来の栄養膜細胞株 Bewo を用いて、ハイポキシアの影響を解析し、ハイポキシアシグナルを伝達するハイポキシア誘導因子(と のヘテロ二量体から成る転写因子複合体; HIF1、2、3 および 1) に対する RNA 干渉により、ハイポキシアを仲介する HIF を特定した。また胎盤検体における HIF 因子の発現を免疫組織化学染色等により解析した。

(2) 子宮内膜脱落膜細胞におけるハイポキシアの影響の解析

次に上記で検証した実験および試薬を用いて、子宮内膜脱落膜細胞におけるハイポキシアの影響を解析した。子宮内膜脱落膜細胞は子宮内膜間質細胞の cyclic AMP 処理により誘導した。加えて、ハイポキシアおよび HIF 因子の脱落膜における標的因子を特定するために、次世代シーケンサーによる網羅的解析(RNA-seq)を行った。

(3) 流産脱落膜における転写因子 KLF5 の低発現に関する研究

最後に妊娠高血圧腎症の脱落膜検体における HIF および HIF 標的因子について解析を行う予定であったが、検体数が十分に確保できなかったため、代替として、妊娠初期の散発性流産(流産区)の発生に対するハイポキシアの影響の解析を試みた。また、人工中絶を正常妊娠の対照区として用いた。しかしながら、対照区と流産区では HIF の発現に差が認められなかった。そこで遺伝子改変マウスにおいて着床・脱落膜化に表現型が現れる妊娠に必須とされる遺伝子についてさらに解析を行い、そこで差が認められた転写因子 KLF5 について、ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化に対する機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 栄養膜細胞におけるハイポキシアの影響の解析

妊娠初期の子宮内はハイポキシアであることが分かっている。栄養膜細胞はその機能発現のために分化(合胞体化)する。本研究の結果、栄養膜細胞の合胞体化はハイポキシアによって抑制されることを明らかにした(図 1)。ハイポキシアはこの栄養膜細胞において HIF1 および 2 の発現を誘導しており、また HIF1 については通常酸素濃度下、ハイポキシアのどちらにお

いても恒常的に発現していた。RNA 干渉によりこれら HIF 因子をそれぞれノックダウンしたところ、HIF2 および HIF1 のノックダウンによってハイポキシアの影響がレスキューされたことから、ハイポキシアは HIF2 と HIF1 を介して栄養膜細胞の合胞体化抑制に作用していることが明らかとなった (図 2)。この HIF2 は妊娠初期胎盤絨毛で強く発現しており、満期にはその発現が減少しているが、一方妊娠高血圧腎症の胎盤では弱い発現を維持していた (図 3)。

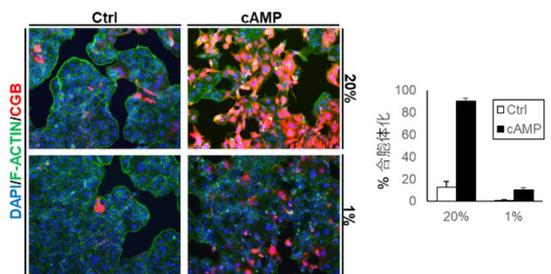


図 1、ハイポキシアは栄養膜細胞の合胞体化を抑制する

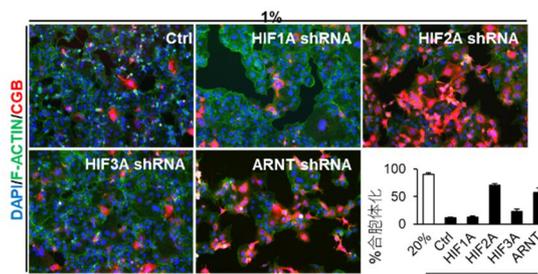


図 2、HIF2 および HIF1 のノックダウンはハイポキシアの抑制をレスキューする

これまで胎盤におけるハイポキシアは HIF1 が中心となって働くと考えられてきたが、我々の研究の結果、HIF2 が栄養膜細胞の合胞体化を抑制していることを明らかにした。今後は HIF2 が誘導するシグナル経路を解明することで妊娠高血圧症候群の発症機序の新たな側面が明らかになることが期待される。また、本研究成果については公表のために論文作成中である。

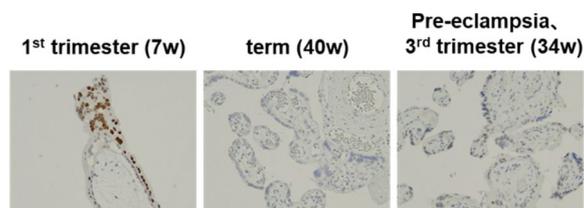


図 3、HIF2 は妊娠高血圧腎症の絨毛において発現している

(2) 子宮内膜脱落膜細胞におけるハイポキシアの影響の解析

我々は妊娠初期の子宮脱落膜が種々の HIF を発現することを明らかにした (図 4)。このことから栄養膜細胞のみならず脱落膜細胞においてもハイポキシアの影響を受けることが示唆された。培養子宮内膜間質細胞をハイポキシア下で脱落膜化誘導すると、脱落膜マーカーであるプロラクチン等の発現が上昇しないことから、ハイポキシアは脱落膜化を阻害している。この制御機構を解析するため、それぞれの HIF のノックダウンを行い、RNA-seq 解析を行った (図 5)。

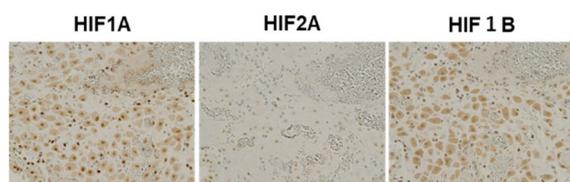


図 4、HIF1、HIF2 および HIF1 は妊娠初期脱落膜において発現している

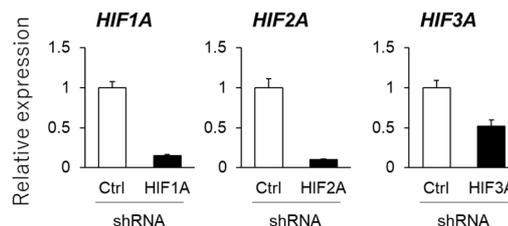


図 5、HIF ファミリー因子のノックダウン

ハイポキシアによって脱落膜細胞で 1000 以上の遺伝子の発現が変化していたが、それらハイポキシア標的因子は異なる HIF によって制御されていた。例えば、ロングノンコーディング RNA である AC026782 の発現はハイポキシアによって抑制されるが、その減少は HIF1A のノックダウンによってレスキューされることから、この因子は HIF1 の標的である (図 6)。一方、胚の成長を促す IGF1 は HIF2 に、ケモカイン CCL8 は HIF3 によってそれぞれ調節されていた。

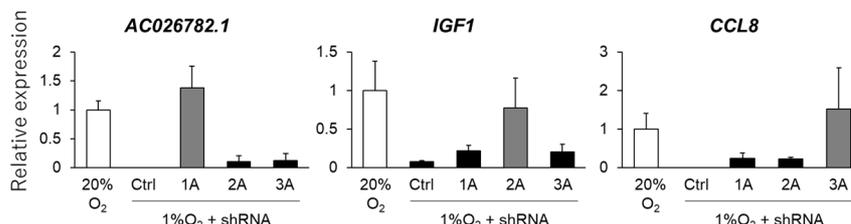


図 6、HIF1、HIF2 および HIF3 はそれぞれ別々の標的因子を持つ

妊娠高血圧腎症を含む妊娠高血圧症候群は、罹患率が高く重症化すると母子共に致死性を示すため、その発症機序の解明は重要である。これまでの研究からハイポキシアが本症の発生に重要であることが明らかであったが、今回我々の研究の結果から、妊娠初期の胎盤では栄養膜だけ

でなく脱落膜もハイポキシアの影響を受け、さらにそのシグナルは3つのHIFタンパクによって複雑に制御されていることを明らかにした。今後、これらシグナルの妊娠高血圧腎症胎盤における発現プロファイルを明らかにしていく予定である。

(3)流産脱落膜における転写因子KLF5の低発現に関する研究

約1割の妊娠で起こる散在性流産について、正常の妊娠との違いを解明するため、それぞれの脱落膜において妊娠に必要と考えられる因子のスクリーニングを行ったところ、流産の脱落膜における転写因子KLF5の低発現を発見した(図7)。このKLF5の脱落膜細胞での機能を明らかにするために、KLF5をノックダウンした培養子宮内膜間質細胞を脱落膜化誘導したが、KLF5欠損細胞は脱落膜マーカーの発現上昇が起こらず、つまり脱落膜化しなかった(図8)。以上から、脱落膜化に必須なKLF5が何らかの理由で抑制されていることが散発性流産発生の一因であることが示唆された。

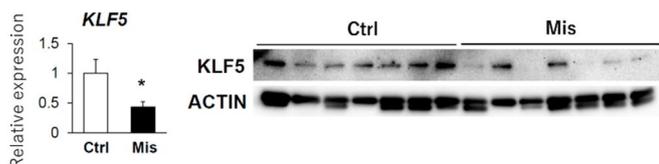


図7、流産の脱落膜ではKLF5が低発現である

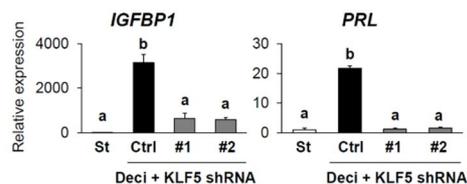


図8、KLF5は脱落膜化に必要である

散発性流産は健常な体でも起こり、その精神的・経済的損失は大きい。本研究の成果は流産の発生機序の解明、あるいは診断や治療法の開発のために必要な新知見である。本研究成果については現在論文投稿の準備を進めている。

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 Kubota Kaiyu, Iqbal Khursheed, Soares Michael J.	4. 巻 1865
2. 論文標題 SATB1 promotion of trophoblast stem cell renewal through regulation of threonine dehydrogenase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129757 ~ 129757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129757	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 該当する

1. 著者名 Moritake Tetsuya, Kojima Junya, Kubota Kaiyu, Terauchi Fumitoshi, Isaka Keiichi, Nishi Hiroataka	4. 巻 21
2. 論文標題 Kruppel-like factor 5 is upregulated and induces cell proliferation in endometrial cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12745	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 KUBOTA Kaiyu, MIWA Masafumi, HAYASHI Ken-Go, HOSOE Misa, SAKATANI Miki	4. 巻 67
2. 論文標題 Steroidal but not embryonic regulation of mucin 1 expression in bovine endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 386 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2021-087	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0件

〔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
---------	---------