

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18646

研究課題名（和文）ヒト胎盤栄養膜細胞における酸化ストレス負荷によるメタボローム解析

研究課題名（英文）Metabolome analysis of human placental trophoblast cells loaded by oxidative stress

研究代表者

井上 尚実（Inoue, Naomi）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90839234

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）：合併症のないヒト胎盤絨毛組織より分離・培養した合胞体性栄養膜細胞および不死化ヒト絨毛細胞株に低酸素環境を用いて酸化ストレスを負荷した。ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて一次代謝産物の測定を行った。測定結果について、多変量解析を行い、代謝経路の変化について解析した結果、低酸素環境下では解糖系、糖新生、TCA回路が活性化していると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、晩婚、晩産が増加しており、妊娠高血圧症候群の発症リスクは高まっている。妊娠高血圧症候群の発症には種々の要因が関わっているが、その病態は胎盤虚血による低酸素が影響していると考えられている。この研究はヒト胎盤絨毛を構成する栄養膜細胞を用いて、虚血に陥った栄養膜細胞ではどのような代謝経路の変化が起こっているのかを明らかにすることで病態の更なる解明につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：trophoblast cells isolated and cultured from uncomplicated human placental chorionic tissue and immortalized human villous trophoblast cells were subjected to oxidative stress using a hypoxic environment. Measurement of primary metabolites was performed using a gas chromatography mass spectrometer. Multivariate analysis of the results suggest that changes in metabolic pathways such as glycolysis, gluconeogenesis, and TCA circuits are activated in a hypoxic environment.

研究分野：周産期医療

キーワード：胎盤 低酸素 代謝変化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群は重症度の差はあるが高頻度に認められる産科合併症である。妊娠高血圧症候群は重症になれば母体、胎児ともに危険な疾患であり、周産期医療において非常に重要な疾患である。近年、初婚年齢の上昇に伴い、出産年齢も上昇し、また、生殖補助医療の発展もあり、高齢妊娠は増加傾向である。妊娠高血圧症候群のリスク因子として、高齢、初産があり、今後妊娠高血圧症候群の発症は増加する可能性がある。

妊娠高血圧症候群の発症には種々の要因が関わっていると考えられているが、その病態には胎盤虚血・低酸素に伴い胎盤から母体血中に放出される因子が影響している。病態に関わる因子および母体の生態への影響について、母体血清や羊水、各種細胞株を用いた研究は多くなされているが、胎盤絨毛組織自体についての評価は少ない。

この研究では、胎盤絨毛組織自体に着目し、酸化ストレスにより胎盤絨毛を構成する栄養膜細胞の代謝変化について検討することとした。

### 2. 研究の目的

妊娠高血圧症候群の発症には種々の要因が関わっているが、その病態は胎盤虚血による低酸素、低栄養が影響していると考えられている。この研究ではヒト胎盤絨毛を構成する栄養膜細胞を用いて種々の手法により胎盤虚血モデルを作成し、代謝産物の網羅的解析を行う。虚血に陥った胎盤絨毛細胞では、低酸素、低栄養というストレスにより、どのような代謝経路の変化が起こっているのかを明らかにすることで、病態の更なる解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 合併症のないヒト胎盤絨毛組織より細胞を分離・初代培養を行い、合胞体性栄養膜細胞株を樹立した。

(2) 培養された細胞は合胞体性栄養膜細胞として発育することを蛍光抗体染色法にて確認した。

(3) 合胞体性栄養膜細胞に各種酸化ストレス(低酸素、低栄養、薬物など)を負荷し、ウエスタンブロット法にて低酸素誘導性因子 hypoxia-inducible factor(HIF)1 $\alpha$  および低酸素により発現誘導される N-myc downstream-regulated gene 1(NDRG1)の出現を確認した。HIF1 $\alpha$  は妊娠高血圧症候群の 1 病型である妊娠高血圧腎症の病態で発現が上昇することが確認されているため、胎盤虚血モデルの確認が可能であった。

(4) 酸化ストレス群とコントロール群(正常)の培養細胞を、Bligh & Dyer 法で分離、調整した後、それぞれの一次代謝産物をガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS/MS、TQ8040、SHIMADZU)で測定した。

(5) GC-MS で得られた結果について多変量解析(SIMCA、Umetrics 社)を行う。多変量解析で得られた結果より代謝経路の変化について検討を行った。代謝経路は代謝マップ(KEGG 等)を参照し、代謝産物の増減によりどの経路が変化しているかについて解析した。

(6) 同様に、Sw71(不死化ヒト絨毛細胞株)を用いて低酸素環境下での代謝変化について検討した。

### 4. 研究成果

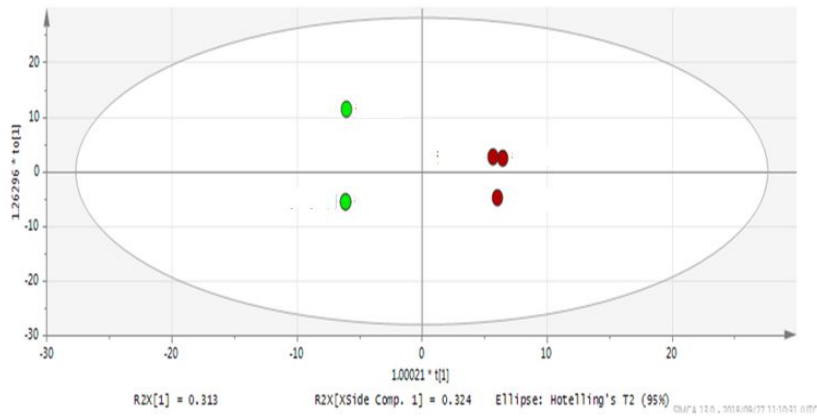
ヒト胎盤絨毛組織より採取、分離した栄養膜細胞における結果について、測定可能物質 469 項目中 63 項目(13.4%)が測定可能であった。コントロール群と低酸素負荷群では主成分分析において明確に分布が分かれていた。また低酸素負荷群において、7 代謝物が有意に減少していることが確認できた。

SW71 を検体とした実験でもコントロール群と低酸素負荷群では主成分分析において明確に分布が分かれていた。分離培養した栄養膜細胞での結果とは測定された代謝物質が異なっており、5 つの物質が有意に増加し、9 つの物質が有意に減少していた。

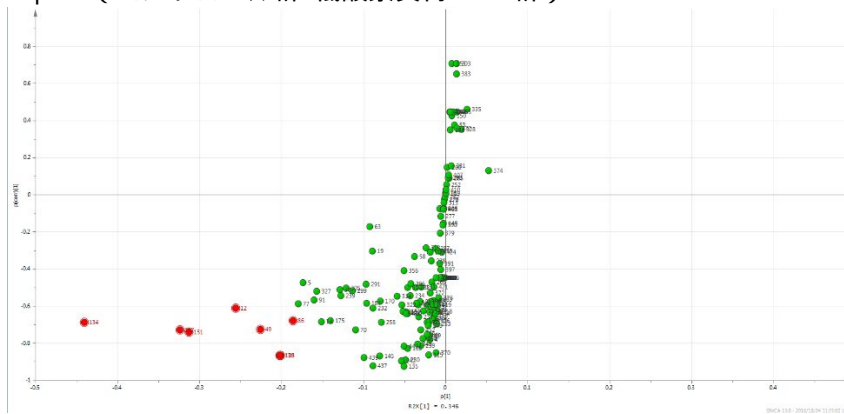
結果 (ヒト胎盤絨毛組織より採取、分離した栄養膜細胞)

# コントロール群-低酸素負荷24hr群比較

● control群  
● 低酸素負荷24hr群

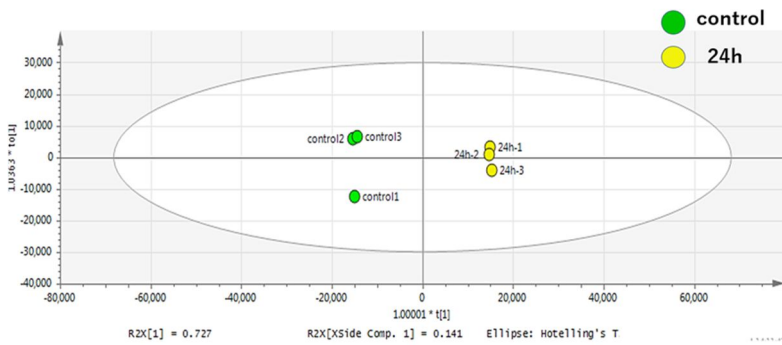


S-plot (コントロール群-低酸素負荷 24hr 群)

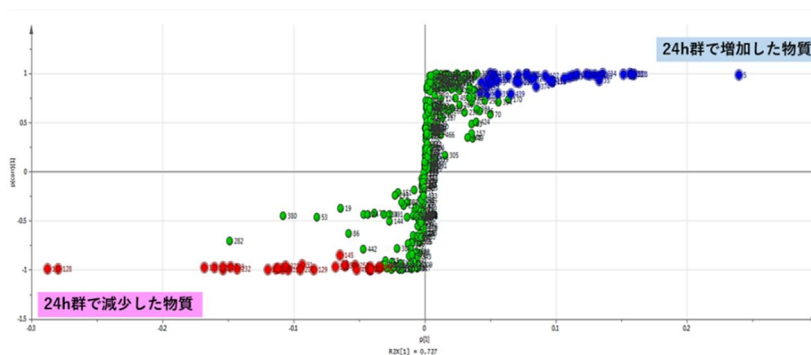


結果 (不死化ヒト栄養膜細胞 SW71 )

## コントロール群-低酸素負荷24hr群比較



S-plot (コントロール群-低酸素負荷24hr群)

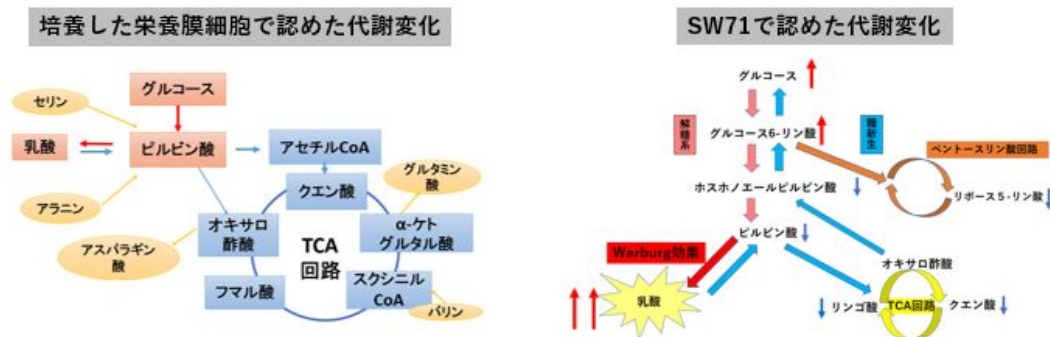


測定された物質に違いはあったが、いずれも低酸素環境下では嫌気性代謝が亢進し、ピルビン酸から乳酸が生成され、生成された乳酸から本来の代謝経路に戻すために、解糖系 ~ TCA 回路が活

性化されたと考えられた。

SW71 を用いた実験では、ペントースリン酸回路の関与も考えられた。以前に当講座で妊娠高血圧症候群の胎盤組織のメタボローム解析をした際に、ペントースリン酸回路の活性化を認めていた。

低酸素環境下では本来の代謝経路から逸脱した代謝反応が起こっていることが推測された。



上記結果について、2023年5月に日本産科婦人科学会学術集会で報告する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 尚実
2. 発表標題 ヒト胎盤における低酸素環境下での代謝変化についての検討
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------