

機関番号：17501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：20591921

研究課題名 (和文) 血小板活性化因子による絨毛及び脱落膜の血管新生の制御

研究課題名 (英文) Platelet-activating factor-mediated regulation of angiogenesis in the chorionic villi and the decidua.

研究代表者

檜原久司 (Hisashi Narahara)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60211447

研究成果の概要 (和文) : 血小板活性化因子 (PAF) は、着床を含め多くの生殖機構やその病態に関わっている。ヒト胚の脱落膜への侵入に際し、胚由来 PAF の絨毛および脱落膜における血管新生への役割を明らかにすることを目的として、絨毛細胞または脱落膜細胞の培養系において検討した。子宮筋腫摘出時に採取された子宮内膜を細切後、collagenase 処理後、80 μ m メッシュを通過させて間質細胞を分離。また、初期妊娠や子宮外妊娠の子宮内容除去術時に採取された絨毛または脱落膜を同様に collagenase 処理し、非連続的比重遠心法により絨毛細胞または脱落膜細胞を分離した。得られた絨毛細胞および脱落膜細胞を無血清の PRMI または IMDM の培養液で 2×10^5 cells / well で培養した。培養上清中の VEGF、basic FGF、angiogenin を ELISA 法を用いて定量した。Carbamyl-PAF (C-PAF) を絨毛または脱落膜細胞の培養系に添加し、培養上清中の VEGF、basic FGF、angiogenin を同様に定量した。C-PAF 刺激下の絨毛または脱落膜細胞培養上清中の TSP-1 蛋白質の産生量をウェスタンブロット法で解析した。上記の VEGF、basic FGF、angiogenin の産生に及ぼす PAF receptor antagonist (Y-24180, CV2086) の影響を検討した。C-PAF は、絨毛および脱落膜細胞において濃度依存性に TSP-1 以外のすべての産生を促進した。TSP-1 への C-PAF の効果は認められなかった。C-PAF によるこれら因子の産生促進作用は、Y-24180, CV2086 によって、ほぼ完全に阻害された。PKC activator である TPA も絨毛や脱落膜での血管新生因子産生をすべて促進した。TPA または PAF による血管新生因子発現促進作用は H-7 により遮断された。これらの結果から、胚由来の PAF には、絨毛および脱落膜に対して PKC を介した血管新生促進作用があることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Platelet-activating factor (PAF), a potent lipid mediator, has been implicated in a number of reproductive processes, including implantation. PAF has been shown to be produced by human embryo, which appears to be a requisite for viability. However the precise role of embryo-derived PAF in implantation has yet to be established. To investigate the role of PAF in chorionic or decidual angiogenesis, we evaluated the production of various angiogenic factors or anti-angiogenic factors by trophoblast cells (TC) or decidual cells (DC). We measured the concentrations of three angiogenic factors in the culture media of TC and DC following stimulation with an analogue, carbamyl-PAF (C-PAF). This substrate is not metabolized. These three factors were vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF) and angiogenin. Enzyme-linked immunosorbent assay was used. In addition, we evaluated the expression of thrombospondin (TSP)-1 protein in TC and DC after stimulation with C-PAF using western blot analysis. The levels of VEGF, b-FGF, and angiogenin in the culture media of the C-PAF-stimulated TC and DC rose as an increase in the amount of C-PAF added. These C-PAF-induced effects were abolished following pretreatment with PAF receptor antagonists, Y-24180 and CV2086. A PKC activator, TPA also stimulated these angiogenic factors, which was abolished by a PKC inhibitor, H-7. C-PAF had no effect on TSP-1 production in TC and DC. It is suggested that the PAF secreted by the decidual tissue and by the developing embryo stimulates via PKC the production of these angiogenic factors at the feto-maternal interface. The up-regulation of these factors in the local environment may be important in the angiogenesis during early stages of gestation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成 21 年度	600,000	180,000	780,000
平成 22 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：血小板活性化因子、絨毛、脱落膜、着床、血管新生

1. 研究開始当初の背景

受精後早期よりヒト胚から血小板活性化因子 (Platelet-activating factor : PAF) が合成、分泌されることは O'Neill ら (O'Neill et al. Fertil Steril 1987, O'Neill et al. Lancet 1989) により報告されているが、着床期における PAF の絨毛および脱落膜に対する作用はほとんど解明されていない。PAF は低濃度 (10^{-9} ~ 10^{-14} M) で生物活性を持つ脂質メディエーターであり、敗血症、喘息、アナフィラキシーショック、壊死性腸炎など数多くの病態に関与していることが知られている。生理的には、PAF が生殖機構に対して排卵、受精卵の着床、胎児の肺成熟、陣痛発来において重要な役割を担っていることが示唆されており、絨毛、脱落膜に対しても胚由来の PAF が何らかの作用を持つ可能性が考えられる。

子宮内膜は月経周期に伴って様々なホルモンや成長因子による調節を受け、形態的および機能的変化を遂げる。生殖現象の中で着床期から妊娠初期にかけての子宮内膜の変化は著しく、脱落膜へと分化し、受精卵の着床および発育、胎盤の形成さらに妊娠の維持に関して重要な役割を持つ組織である。

受精卵の着床に際し、脱落膜化および新生血管の誘導は不可欠であり、ここでは血管新生とその制御に関わる種々の因子群の相互作用が行われている。また、その破綻はその程度により、流産から妊娠中毒症など様々な病態に結びつくことが考えられる。

2. 研究の目的

ヒト胚および絨毛の脱落膜への侵入に際し、絨毛と脱落膜の接点において、胚由来の

PAF が血管新生のいかなる制御に関わっているかを明らかにすることを目的として研究を計画した。今回の研究では、絨毛細胞および子宮内膜間質細胞 (脱落膜) の培養系において、PAF による血管新生促進因子である VEGF、basic FGF、HGF、angiogenin と血管新生抑制因子である TSP-1 の産生とその発現調節を検討し、PAF が血管新生にどのような影響をおよぼしているかを検討した。

PAF 受容体は、G-protein coupling type の受容体であり、細胞内情報伝達系として、その機能に応じて種々の経路の関与が示唆されている。これらの経路のうち、血管新生の制御においてどの経路が中心的役割を担っているかを検討した。

3. 研究の方法

子宮筋腫摘出時に採取された子宮内膜を細切後、0.25% collagenase 処理し、遠心し、その後 60 μ m メッシュを通過させて子宮内膜腺細胞と間質細胞を分離した。間質細胞を MPA および db-cAMP とともに培養し、培養上清の prolactin を脱落膜化の指標として脱落膜化させた。また、初期妊娠や子宮外妊娠の子宮内容除去術時に採取された絨毛及び脱落膜を同様に collagenase 処理し、非連続的比重遠心法により脱落膜細胞を分離した。得られた絨毛細胞または脱落膜細胞を 10% FCS 加 PRMI または IMDM の培養液で 2×10^5 cells / well ずつ培養した。得られた絨毛および脱落膜細胞は、種々の細胞表面マーカーを用い、FACS によりその細胞成分の構成について評価した。

体外受精時に得られた受精卵、未受精卵、

または、胞胚の培養上清を絨毛または脱落膜細胞の培養系に添加し、その培養上清中の VEGF、basic FGF、angiogenin を ELISA 法 (R&D Systems) を用いて定量した。受精卵、未受精卵、または、胞胚の培養上清中、および、絨毛または脱落膜細胞の培養上清中の TSP-1 蛋白の産生量をウエスタンブロット法で測定した。VEGF、basic FGF、angiogenin の産生に及ぼす PAF receptor antagonist (Y-24180, CV2086) の影響について検討した。

C-PAF を時間的、濃度的変化を加えて添加し、培養ののち、培養上清中の VEGF、basic FGF、angiogenin を ELISA 法 (R&D Systems) を用いて定量し検討した。培養上清中の TSP-1 蛋白の産生量をウエスタンブロット法で解析した。PAF を添加した際の VEGF、basic FGF、angiogenin の産生に及ぼす PAF receptor antagonist (Y-24180, CV2086) の影響について検討した。

Protein kinase C (PKC) の activator (TPA : positive control) や inhibitor (H-7) を絨毛や脱落膜細胞培養系において、PAF とともに、あるいは単独で添加し、VEGF、basic FGF、HGF、angiogenin および TSP-1 の産生に変化がみられるかどうかを検討した。

4. 研究成果

C-PAF は、絨毛および脱落膜細胞において濃度依存性に TSP-1 以外のすべての産生を促進した。TSP-1 への C-PAF の効果は認められなかった。C-PAF によるこれら因子の産生促進作用は、Y-24180, CV2086 によって、ほぼ完全に阻害された。これらの結果から、胚由来の PAF には、絨毛および脱落膜における血管新生促進作用があることが示唆された。

PKC activator である TPA も、今回測定した絨毛や脱落膜での血管新生促進因子をすべて up-regulate した。TPA または PAF による血管新生促進因子群の up-regulation は、H-7 により遮断された。この結果は、PAF による血管新生因子の促進作用は PKC を介していることを示唆する。

今回の結果において、絨毛では脱落膜に比べて VEGF の発現量が多く、TSP-1 の発現量が少なかった。単純には比較できないが、この結果は、絨毛では脱落膜に比較して血管新生が活発に行われていることを示唆する。また、血管新生は一般に増殖能との関連が高く、胎児の発育に対して PAF が促進的に働くことが考えられた。

絨毛や脱落膜では、正常の子宮内膜と比較して PAF による VEGF 等の血管新生促進因子の発現量が多く、TSP-1 の発現量は変化しないという結果は、PAF による血管新生調節

のメカニズムの一端を示しているといえる。また、これらの結果は、VEGF 等と TSP-1 の発現バランスの異常が胎児発育遅延などの病態と関連がある可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Akitoshi Tsuno, Kaei Nasu, Yukie Kawano, Akitoshi Yuge, Haili Li, Wakana Abe, Hisashi Narahara, Fasudil hydrochloride inhibits the proliferation and the contractility and induces apoptosis of human endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96 (12): E1944-E1952.
- ② Yasushi Kawano, Yuichi Furukawa, Yukie Kawano, Wakana Abe, Tomoko Hirakawa, Hisashi Narahara, Cadmium chloride induces the expression of metallothionein mRNA by endometrial stromal cells and amnion-derived (WISH) cells. Gynecol Obstet Invest 2011; 71 (4): 240-244.
- ③ Noriyuki Takai, Tami Ueda, Terukazu Ishii, Naoko Kira, Masakazu Nishida, Yoshihiro Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara, Effects of bufalin on the proliferation of human choriocarcinoma cells. Int J Gynecol Cancer 2011; 21 (6): 1105-1109.
- ④ Noriyuki Takai, Terukazu Ishii, Masakazu Nishida, Kaei Nasu, Hisashi Narahara, Erucylphosphocholine induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human choriocarcinoma cells. Tumour Biol 2011; 32 (3): 569-574.
- ⑤ Sinya Karakida, Yasushi Kawano, Yufuko Utsunomiya, Yuichi Furukawa, Toshio Sasaki, Hisashi Narahara, Effect of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin on the MAP kinase-induced production of vascular endothelial growth factor by human granulosa cells. Growth Factors 2011; 29 (6): 271-277.
- ⑥ Yasushi Kawano, Yuichi Furukawa, Yukie Kawano, Kaei Nasu, Hisashi

Narahara, Thrombin-induced chemokine production in endometrial stromal cells. Hum Reprod 2010 (Epub ahead of print)

- ⑦ Kaei Nasu, Akitoshi Yuge, Akitoshi Tsuno, Hisashi Narahara, Mevalonate-Ras homology (Rho)/Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase (ROCK)-mediated signaling pathway as a therapeutic target for the treatment of endometriosis-associated fibrosis. Curr Signal Transduct Ther 2010; 5 (2): 141-148.
- ⑧ Kaei Nasu, Hisashi Narahara, Pattern Recognition via the Toll-Like Receptor System in the Female Genital Tract. Mediat Inflamm 2010; 2010: 976024.

[学会発表] (国際学会 計 5 件)

- ① 2011 16th World congress on in vitro fertilization 5th World congress on in vitro maturation Tokyo, Japan, September 10-13
Yasushi Kawano, Sinya Karakida, Yufuko Utsunomiya, Hisashi Narahara, The role of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) in human endometrial stromal cells.
- ② 2010 Society for Gynecologic Investigation 57th Annual Meeting, Orlando World Center Marriott Resort, Orlando, Florida, USA, March 24-27, 2010
Kaei Nasu, Akitoshi Tsuno, Yukie Kawano, Yasushi Kawano, Hisashi Narahara, Decidualization attenuates the contractility of endometriotic stromal cells.

Yasushi Kawano, Yuichi Furukawa, Akitoshi Tsuno, Kaei Nasu, Hisashi Narahara, The effect of angiogenic factors on human folliculogenesis.

Yasushi Kawano, Yuichi Furukawa, Yukie Kawano, Kaei Nasu, Hisashi Narahara, The regulation of chemokine production involving protease-activated receptor-1 and 2 in human endometrial stromal cells.

Yukie Kawano, Kaei Nasu, Masakazu Nishida, Yasushi Kawano, Hisashi Narahara, Application of the nuclear factor- κ B inhibitor, BAY 11-7085, for the treatment of endometriosis.

- ③ 2010 annual meeting of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology
Taichung, Taiwan March 13-14, 2010:
Terukaza Ishii, Yasushi Kawano, Yufuko Utsunomiya, Mamiko Kusumoto, Chihiro Mori, Hisashi Narahara, The modulation of vascular endothelial growth factor in amnion-derived (WISH) cells by epidermal growth factor.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜原 久司 (NARAHARA HISASHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60211447

(2) 研究分担者

河野 康志 (KAWANO YASUSHI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：40274758

奈須 家栄 (NASU KAEI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30274757

(3) 連携研究者 なし