

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790177

研究課題名（和文） ヒト羊膜上皮層のクローディンによる傍細胞経路の調節機構

研究課題名（英文） The regulatory mechanism of claudins for paracellular pathway of the human amniotic epithelium.

研究代表者

：小林 謙 (KOBAYASHI KEN)

：北海道大学・大学院農学研究院・助教

：研究者番号：30449003

研究成果の概要（和文）：羊膜上皮層は羊水と直に接する組織であり、羊膜上皮層の細胞間に存在する密着結合は羊水成分と胎盤側成分の傍細胞経路（上皮細胞間隙を通る経路）による物質移動を調節している。本研究では早産や絨毛膜羊膜炎に繋がる基礎的知見を得るため、密着結合およびその構成タンパク質であるクローディンの調節機構について調べた。その結果、密着結合の物質透過性はクローディンの挙動を介してホルモンや炎症性サイトカインなどによって調節されていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The amniotic epithelium is in direct contact with the amniotic fluid and regulates fluid flux via paracellular pathway by tight junctions. In this study, we investigated the regulatory mechanism of tight junctions and claudins as the basic research for premature birth and chorioamnionitis. The results have been shown that several physiological active substances such as hormone and inflammatory cytokines regulate the permeability of amniotic tight junctions through claudins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：羊膜、タイトジャンクション、クローディン、羊水、傍細胞経路、絨毛膜羊膜炎

1. 研究開始当初の背景

羊水と直に接する羊膜上皮層は、妊娠過程における羊水の質的・量的な調節を行い、胎児の成長や分娩を適切に誘導している組織である。この調節作用は上皮細胞内を通る経細胞経路と上皮細胞の間隙を通る傍細胞経路の物質移動によって行われることが知られている。しかし、一方で傍細胞経路を制御

する構造、タンパク質、あるいはそれらの調節因子等に関する知見は得られていなかった。一般的に上皮層の傍細胞経路は密着結合によって制御されており、密着結合の物質透過性は密着結合構成タンパク質であるクローディンの組成によって変化する。本研究に際して予備実験を行った結果、羊膜上皮層には密着結合が存在し、クローディンファミリー

一である claudin-1、-3、-4 および-7 によって構成されていることがわかった。そこで本研究では妊娠過程における密着結合の機能変化をクローディン組成の変化として分子レベルで認識し、クローディンを介した傍細胞経路の調節機構が妊娠過程で果たす役割について追及した。

2. 研究の目的

羊膜上皮層は胎盤と胎児の間に存在して相互の自由な物質移動を制御する障壁として機能している。しかしながら、妊娠末期や絨毛膜羊膜炎の場合、胎盤—母体間の物質移動は活発になり、その結果として羊水感染、早産、あるいは分娩シグナルの伝達が起こる。本研究ではこの物質移動の活発化に羊膜上皮層の密着結合が関与していると予想し、密着結合を構成してその機能性を決定するクローディンファミリーに着目して研究を行った。特に絨毛膜羊膜炎や妊娠中期から分娩にかけて羊膜周囲で濃度が増減する生理活性物質、すなわち、妊娠末期に激減するプロゲステロン、妊娠後期から次第に増加するグルココルチコイド、および妊娠末期の分娩前や絨毛膜羊膜炎の場合に増加する炎症成分に着目し、これらの生理活性物質が claudin の挙動や密着結合の透過性に及ぼす影響について調べた。

3. 研究の方法

実験 1 羊膜上皮細胞と線維芽細胞の単離

羊膜上皮細胞は羊膜を 2.5 mg/ml collagenase type I/DMEM、室温、2 時間の酵素処理を施すことによって上皮層画分を回収し、さらに上皮層画分を 0.1% Trypsin/PBS で 5 分処理することによって単細胞に分散する。得られた上皮細胞は 50 ng/ml EGF、10 µg/ml Transferrin、5 µg/ml Insulin、200 µM Ascorbic ester、10% FBS を含む DMEM/F-12 培地で高密度を維持しながら培養する。

線維芽細胞は羊膜を 2.5 mg/ml collagenase type I/DMEM、室温、2 時間の酵素処理を施すことによって得られる懸濁液から上皮層画分を 40 µm の cell strainer によって分離し、通過画分を遠心分離することによって線維芽細胞を回収する。得られた線維芽細胞は 10%FBS を含む DMEM/F-12 を培地として培養する。

実験 2 三次元培養羊膜モデルの作製

実験 1 で得られる線維芽細胞を中性の 2.0 mg/ml I 型コラーゲン溶液に懸濁した後に cell culture insert 上に滴下し、37°C、1 時間でゲル化後、ゲル表面に実験 1 で得られる上皮細胞を播種する。培地は 50 ng/ml EGF、10 µg/ml Transferrin、5 µg/ml Insulin、200 µM Ascorbic acid、10% FBS を含む

DMEM/F-12 を培地として約 2 週間培養する。

実験 3 三次元培養羊膜モデルの生理活性物質による処理

妊娠後期あるいは絨毛膜羊膜炎の生理環境を生理活性物質の添加によって *in vitro* の培養液中に再現する。添加する生理活性物質としては炎症を誘導する細菌由来のリボ多糖 (Lysophosphatidic acid)、炎症性サイトカイン (TNF-alpha、IL-1beta、IL-6)、サイトカイン阻害剤 (FK506、ラバマイシン、サリドマイド)、ホルモン (Glucocorticoid、Progesterone、Prostaglandin) を単独あるいは複数の組み合わせで加える。各成分の濃度、処理時間は各実験の目的に応じて調整する。

実験 4 羊膜モデルの密着結合関連タンパク質の免疫染色

実験 4 で使用した羊膜モデル全体を 1% PFA/HBSS、4°C、15 分で固定をおこない、クローディン-4、-7、および密着結合関連タンパク質である ZO-1、Occludin、Actin の抗体を用いて図 1 のように上皮層全体の免疫染色をおこなう。

実験 5 Tritonx-100 可溶性、不溶性画分の分画およびウエスタンブロッティング

本実験でおこなう Tritonx-100 可溶性、不溶性画分の分画はクローディンによる密着結合を評価する抽出法であり、一般的に密着結合の構造に参加しているクローディンが多いほど不溶性画分の割合が高くなることが知られている。in vivo 羊膜あるいは培養羊膜モデルの上皮層を 200 mM EDTA 処理によって剥離し、得られた上皮層は 1% Tritonx-100 を含む抽出液で処理し、可溶性、不溶性画分に分画する。得られた各画分中のクローディン-4 と-7 はウエスタンブロッティングによって検出し、その相対比を解析する。

実験 6 mRNA 発現レベルの定量

実験 5 と同様の方法で回収した羊膜上皮細胞層から mRNA を抽出、one step real-time PCR によって生理活性物質がクローディン-4、-7 を含む密着結合関連タンパク質の発現に与える影響を調べる。

実験 7 羊膜および三次元培養羊膜モデルの経上皮電気抵抗値の測定

本実験で測定する経上皮電気抵抗値は上皮層のバリア機能を非浸襲的に測定する方法であり、生理活性物質で処理した際の傍上皮経路の評価にも応用できる実験である。作製した三次元培養羊膜モデルは経上皮電気抵抗値の測定によって形成された上皮層

の密着結合の評価をおこない、実験への供試時期の決定と実験の再現性を確保する。

4. 研究成果

プロゲステロンは妊娠初期から後期にかけて血中や羊水中に多く含まれるホルモンであり、妊娠を維持する方向に働くことが知られている。本研究において、妊娠マウスにプロゲステロンの阻害剤である RU-486 を投与したところ、羊膜上皮層の透過性は上昇し、claudin-3 および-4 は密着結合の存在する apical-most region から細胞質に局在変化し、全体量も減少していた。一方、器官培養した羊膜にプロゲステロンを処理すると、claudin-3 および-4 の発現は亢進し、密着結合も堅固になった。さらに、プロゲステロンのレセプターの発現量と局在を調べたところ、妊娠 17 日目前後に羊膜上皮層から消失することが明らかになった。通常の妊娠段階においても妊娠 17 日目には密着結合の物質透過性やクロードインの劇的な局在変化が起きていることから、プロゲステロンは妊娠中期から後期にかけて堅固な密着結合を維持する為に claudin-3 および-4 の発現レベルを一定以上に維持し、その局在を密着結合の存在する apical-most region へ誘導していると考えられた。

グルココルチコイドは抗炎症作用があることが広く知られているホルモンであるとともに、妊娠末期に増加して分娩への関与が指摘されているホルモンでもある。絨毛膜羊膜炎のヒト羊膜ではクロードインが apical-most region ではなく、lateral membrane や細胞質に存在していた。これらの羊膜を抗炎症作用のあるグルココルチコイド存在下で培養すると、claudin-3 および-4 は密着結合の存在する apical-most region に局在するようになり、羊膜の物質透過性も低下した。一方でグルココルチコイドの長期処理はクロードインの発現を濃度依存的に低下させたことから、グルココルチコイドは短期的には密着結合を堅固に、長期的には脆弱化させると考えられた。すなわち、グルココルチコイドは抗炎症作用によって後述するような炎症成分による密着結合の脆弱化を防ぐが、妊娠末期にその濃度を増加させるとクロードインの発現量を低下および密着結合の脆弱化を誘導し、胎児-母体間の物質移動や羊水量の減少に関与していると考えられた。

絨毛膜羊膜炎は早産の最も多い原因であり、絨毛膜羊膜炎の際には羊水の質的・量的異常もともなうことが知られている。絨毛膜羊膜炎のモデルとして妊娠マウスに LPS を投与したところ、密着結合の脆弱化、claudin-3 および-4 の apical-most region からの減少、および発現量の低下が誘導された。絨毛膜羊

膜炎の際に増加する炎症成分である IL-6、-8、TNF、prostaglandin E2 を器官培養した羊膜に処理すると、各成分が各々で異なる時期に claudin-3 および-4 の局在変化を誘導していた。さらに、IL-6 と TNF を *in vivo* 羊水腔に注入したところ、IL-6 は apical-most region における claudin-3 および-4 の減少、TNF はアポトーシス誘導にもなった密着結合ネットワークの断片化を誘導しており、どちらの場合においても羊膜上皮層の物質透過性は上昇していた。以上のことから、羊膜周辺で炎症反応が起きた場合、複数種の炎症成分が各々に異なる経路で羊膜上皮層の密着結合を脆弱化させ、経羊膜の炎症成分や細菌類の移動が活発にさせていると考えられた。

本研究の結果を総合すると、クロードインおよび密着結合の調節機構が妊娠中に果たす役割について以下のような仮説が提案される。妊娠初期から中期にかけて claudin-3 および-4 が羊膜上皮細胞で発現し、密着結合を形成する。妊娠中期から後期にかけて羊膜周囲に存在するプロゲステロンは羊膜上皮細胞のプロゲステロンレセプターに結合し、そのシグナル伝達によって経路によって claudin-3 および-4 の発現亢進や apical most region への局在変化を誘導し、強固となった密着結合は妊娠中に求められる羊水の調節や胎盤-母体間の物質移動の制御を行っている。しかしながら、プロゲステロン/プロゲステロンレセプター経路は妊娠末期に消失し、一方でクロードインの発現を低下させるグルココルチコイドや炎症性サイトカインが羊水中に増加して密着結合を脆弱化させる。そのため、経羊膜の傍細胞経路は開放的になり、羊水量が減少し、胎児から胎盤側に拡散する分娩シグナル分子の移動も円滑に進む。また、絨毛膜羊膜炎によって羊膜周囲で炎症成分の濃度が増加した場合には、密着結合がクロードインを介して脆弱化され、経羊膜の羊水移動や炎症成分の移動が促進し、結果として胎児への影響や早産がおきると推測された。すなわち、クロードインを介した羊膜密着結合の調節機構は自然分娩や絨毛膜羊膜炎による早産に関与していると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kobayashi K, Miwa H, Yasui M (2011). Progesterone maintains amniotic tight junctions during midpregnancy in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 337, 36-42. (査読有)

2. Kobayashi K, Umezawa K, Yasui M (2011). Apoptosis in mouse amniotic epithelium is induced by activated macrophages through the TNF receptor type 1/TNF pathway. *Biology of Reproduction*, 84, 248-54. (査読有)
3. Kobayashi K, Yasui M (2010). Cellular and subcellular localization of aquaporins 1, 3, 8, and 9 in amniotic membranes during pregnancy in mice. *Cell and Tissue Research*, 342, 307-316. (査読有)
4. Kobayashi K, Miwa H, Yasui M (2010). Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. *The Journal of Physiology*, 588, 4859-4869. (査読有)
5. Kobayashi K, Kadohira I, Tanaka M, Yoshimura Y, Ikeda K, Yasui, M (2010). Expression and distribution of tight junction proteins in human amnion during late pregnancy. *Placenta*, 31, 158-162. (査読有)
6. Kobayashi K, Inai T, Shibata Y, Yasui, M (2009). Dynamic changes in amniotic tight junctions during pregnancy. *Placenta*, 30, 840-847. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 謙 (KOBAYASHI KEN)
北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：30449003

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし