

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：32659
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009 ～ 2010
 課題番号：21791044
 研究課題名 (和文) 胎盤形成におけるサイクリック AMP グアニンヌクレオチド交換因子 (Epac) の役割
 研究課題名 (英文)
 Possible role of cAMP guanine nucleotide exchange factor (Epac) in human placentation
 研究代表者 吉江 幹浩 (YOSHIE MIKIHIRO)
 東京薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：50434014

研究成果の概要 (和文)：

本研究において我々は、胎盤組織における cAMP 仲介因子 Epac の発現部位を特定し、Epac とその下流シグナル因子 Rap1 を介した cAMP シグナル伝達経路が、胎盤形成に重要な栄養膜細胞の機能的分化及びシンシチウム化と子宮内膜間質細胞の脱落膜化に関与することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we demonstrated that cAMP-mediated Epac/Rap1 signaling pathway may regulate trophoblast cell differentiation and syncytialization and endometrial stromal cell decidualization which are crucial for human placentation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：Epac、栄養膜細胞、脱落膜細胞

1. 研究開始当初の背景

胎児栄養膜 (トロホブラスト) と子宮内膜の脱落膜から構成される胎盤ユニットは、胎児-母体間の栄養代謝、ガス交換だけでなく卵巣ステロイドや成長因子等を産生・分泌する極めて特殊な多機能性組織である。栄養膜細胞は妊娠の進行とともに絨毛上皮を構成する細胞性栄養膜細胞 (サイトトロホブラスト：CTB) と合胞体栄養膜細胞 (シンシチオトロホブラスト：STB)、そして絨毛先端部か

ら子宮内膜に浸潤する絨毛外栄養膜細胞 (EVT) へと性質の異なる細胞へと分化を遂げる。STB は CTB が分化・融合 (シンシチウム化) した多核の細胞であり、妊娠維持や胎児の発育に不可欠な卵巣ステロイド、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG)、ヒト胎盤性ラクトゲン産生・分泌する内分泌細胞である。EVT は、子宮内膜 (脱落膜) 組織内の螺旋動脈血管内皮に浸潤する特徴をもつ。

子宮内膜間質細胞の分化により構築され

る脱落膜組織は、栄養膜細胞の浸潤制御や胎児-母体間の免疫寛容の役目を果たす母性胎盤である。この脱落膜の形成過程において、内膜間質細胞は線維芽細胞様の形態から敷石状の脱落膜細胞へと変化し、インスリン様成長因子結合蛋白質1 (IGFBP-1)、プロラクチン (PRL) を産生・分泌する。

胎盤形成に関わる重要なシグナル伝達経路としてサイクリックAMP (cAMP)シグナルが挙げられる。ヒト栄養膜細胞や絨毛癌細胞株を用いた検討から、cAMPアナログやアデニル酸シクラーゼ活性化薬 (フォルスコリン) による細胞内cAMP濃度の増加は、プロテインキナーゼA (PKA) の活性化を介してhCG及びプロゲステロン産生を指標とした分化を誘導することが報告されている。また、単核のCTBから多核のSTBへのシンシチウム化にもcAMPシグナル経路の活性化が関与する。ヒト子宮内膜間質細胞にプロゲステロン (P4) やcAMPアナログを処置すると、PKAの活性化を介して脱落膜マーカーであるIGFBP-1やPRLの産生が高進することから、脱落膜の形成過程にもcAMPシグナル伝達経路が深く関わる。このように胎盤形成の基盤となる栄養膜細胞の分化・融合および内膜間質細胞の脱落膜化において、cAMPを介するシグナル伝達経路は極めて重要である。

cAMPは、細胞外シグナルによるアデニル酸シクラーゼの活性化によりATPから合成されるセカンドメッセンジャーであり、細胞の増殖、分化、接着やホルモンやペプチドの産生・分泌などの多岐にわたる作用を仲介する。cAMPによる細胞内シグナル伝達経路の仲介因子としてはPKAが最も良く知られているが、1998年にde Roojiら (Nature 396: 474-477) とKawasakiら (Science 282: 2275-2279) によってcAMPにより活性化されるグアニヌクレオチド交換因子としてExchange protein directly activated by cAMP (Epac)が同定され、PKA経路とは異なるEpacによるcAMPシグナル伝達経路も注目されている。EpacにはN端の構造が異なる2つのサブタイプ (Epac1, Epac2) が存在する。cAMPがEpacの環状ヌクレオチド結合ドメインに結合すると、低分子量GTP結合蛋白質RapがEpacに結合する。その結果、不活性型 (GDP結合型) のRapは、活性型 (GTP結合型) Rapへと変換され、その下流へとシグナルが伝達される。これまで報告されてきたPKAを介したcAMPシグナルの重要性に疑いの余地はないが、Epacの関与を含めてcAMPの役割を再確認する必要がある。特に、胎盤組織におけるEpacの役割について解析した報告は今のところない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、栄養膜細胞のSTBへの分化、融合と子宮内膜間質細胞の脱落膜化におけるEpacを介したcAMPシグナル伝達経路の意義について解析し、胎盤形成におけるEpacの役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

①ヒト胎盤及び子宮内膜組織におけるEpac1とEpac2の免疫組織染色

妊娠初期 (6, 7 週) と末期 (37, 38 週) の胎盤のパラフィン包埋切片は、東京医科大学産科婦人科学教室 井坂 恵一先生より供与して頂いた。妊娠中期 (22 週) の胎盤及び分泌期子宮内膜の組織切片は購入した。

②ヒト絨毛癌細胞株 BeWo 細胞の分化に対するEpacアゴニストの作用

ヒト絨毛癌細胞株 BeWo 細胞にEpac選択的cAMPアナログ (8-(4-chlorophenylthio)-2 α -O-methyl cAMP, CPT)、PKA選択的cAMPアナログ (N⁶-Phenyl-cAMP, Phe) をそれぞれ0.5 mMずつ単独処置、またはCPTとPheを共処置し、48時間培養した。培養終了後、細胞と培養メディウムを回収し、hCG α 、hCG β 、コレステロール側鎖切断酵素 (P450scc) のmRNA発現をリアルタイムRT-PCR法にて解析した。また、培養メディウム中のhCG分泌量は抗hCG β 抗体を用いたウェスタンブロット法にて、P4分泌量はラジオイムノアッセイにて解析した。

③BeWo細胞のシンシチウム化に対するEpacアゴニストの作用とEpac1、Epac2及びRap1発現抑制の効果

BeWo細胞にCPT、Phe及びcAMP安定体 (dibutyl-cAMP, Db) をそれぞれ0.5 mMずつ単独処置し、48時間培養した。また、PKAシグナル抑制下でシンシチウム化に対する各cAMPの効果を調べるため、PKAインヒビター (H89, 10 μ M) を1時間処置した後、上記の条件でcAMPアナログを処置し、48時間培養後にシンシチウム化の評価を行った。さらに、Epac1、Epac2及びRap1特異的siRNA、対照群として非標的コントロールsiRNAをBeWo細胞にトランスフェクションし、24時間後にcAMPアナログおよびフォルスコリン (FSK) を処置し、48時間培養後にシンシチウム化の評価を行った。シンシチウム化の評価方法は以下の通りである。BeWo細胞をメタノールにて固定後、核をDAPIにて、細胞-細胞間の境界を抗デスモソーム蛋白質抗体を用いて蛍光染色した。ランダムに撮影し

た5視野における多核のシンシチウム化細胞をカウントし、全細胞数に対するシンシチウム化細胞数の割合を計算した。

④ヒト子宮内膜間質細胞の単離と培養

ヒト子宮内膜組織は、社会福祉法人 聖ヨハネ会桜町病院において、十分な説明の後、同意を得た上で、正常な月経周期を有し、ホルモン療法を受けてない子宮内膜症又は子宮筋腫の患者から手術の際に病理学的に正常な部位から採取した。なお、これらのサンプルは全て月経周期の増殖期にあたる。Satyaswaroop らの方法 (*J Clin Endocrinol Metab* 1979; **48**:639-641) を参考にして内膜間質細胞 (ESC) を単離した。内膜間質細胞株は、当研究室にて樹立した EtsT (*J Reprod Dev* 2007;**53**:525-533) を用いた。

⑤ ESC の脱落膜化に対する cAMP アナログの作用と Epac1、Epac2 及び Rap1 発現抑制の効果

ESC に CPT、Phe を 200 μ M ずつ単独処置、または Phe (200 μ M) と CPT (10、50、200 μ M) を共処置し 48 時間培養した。培養後、RNA を回収し、脱落膜マーカーである PRL と IGFBP-1 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。また、性ステロイドによる脱落膜化と Epac との関係を調べるため、ESC にプロゲステロン (P₄, 1 μ M) 及びエストラジオール (E₂, 10 nM) または、これら性ステロイドに加え CPT (200 μ M) を処置し、8 日間培養した。培養後に細胞及び培養メディウムを回収し、PRL と IGFBP-1 の発現を調べた。また、培養メディウム中の IGFBP-1 含量を ELISA 法にて測定した。さらに、ESC に Epac1、Epac2、Rap1 特異的 siRNA、また、対照群として非標的コントロール siRNA を導入した後、各 cAMP アナログと共に 48 時間培養し、PRL と IGFBP-1 mRNA 発現量及び培養メディウム内の IGFBP-1 タンパク質量を測定した。

⑥ Rap1 の活性化に対する cAMP アゴニストの作用

ESC に Phe または CPT を処置し、20 分間培養した後、活性型 (GTP 結合型) Rap1 量をプルダウンアッセイにて解析した。また、脱落膜化刺激として Phe を 48 時間処置した後、Phe、CPT またはアデニル酸シクラーゼ活性化薬 (フォルスコリン) を処置し、20 分後に同様に活性型 Rap1 の検出を行った。

⑦ 統計処理

実験結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。Turkey-Kramer 多重比較検定を行い、危険率 5 % ($P < 0.05$) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

4. 研究成果

(1) ヒト胎盤組織における Epac1、Epac2 の発現と栄養膜細胞の分化・融合 (シンシチウム化) における Epac の役割

① ヒト胎盤組織における Epac の発現解析

妊娠初期・中期の胎盤組織において Epac1 蛋白質は、サイトトロホプラスト (CTB)、シンシチオトロホプラスト (STB) と絨毛外栄養膜細胞 (EVT) に発現していた。Epac2 蛋白質は、STB、CTB、EVT の細胞質に発現しており、STB と比較して CTB と EVT に強く発現していた。また、両蛋白質ともに胎児血管内皮細胞および血管平滑筋細胞にもその局在がみられた。妊娠末期胎盤でも Epac1、Epac2 は、STB、EVT、血管に発現していた。

② トロホプラストの機能的分化における cAMP/Epac シグナルの役割

絨毛を構成する栄養膜細胞のうち、単核の CTB は、多核の STB へと分化・融合 (シンシチウム化) し、妊娠維持に不可欠な hCG やプロゲステロン (P₄) を産生する。CTB の分化とシンシチウム化に対する Epac の役割を調べるため、BeWo 細胞に Epac 選択的アゴニスト (CPT)、PKA 選択的アゴニスト (Phe) をそれぞれ 0.5 mM ずつ単独処置、または CPT と Phe を共処置し、48 時間培養後の hCG α と hCG β の mRNA 発現 (図 1A、B) と培養メディウム中の hCG 分泌量 (図 1C) を比較した。Phe 群では hCG α 、 β mRNA 発現量が顕著に増加した。CPT 処置群では、Phe 処置群に比べその作用は弱いものの hCG α 、 β mRNA 発現が上昇した。また、培養メディウム中の hCG 含量も、CPT 処置により増加した (図 1C)。一方、CPT と Phe を共処置すると hCG α 、 β mRNA 発現は、Phe 単独処置に比べやや低下した (図 1C)。

また、P₄ 分泌と P₄ の合成酵素である P450scc の mRNA 発現に対する Epac アゴニストの作用について検討した。P₄ 分泌量は、Phe 処置によって有意に増加し、CPT 処置でもコントロールと比較して有意に増加した。また、CPT と Phe を共処置した群では、Phe 単独処置に比べ、P₄ 分泌量が有意に上昇した。P450scc mRNA 発現レベルは、Phe 処置によって増加し、CPT 処置群でも弱い上昇効果が

見られた。他のヒト絨毛癌細胞株 (JEG-3 細胞) においても、CPT または Phe 単独処置により *hCG α* 、*\beta* mRNA 発現が上昇し、培養メディア中への hCG 分泌が高進すること、さらに P4 分泌量及び *P450scc* mRNA 発現も増加することを確認している。

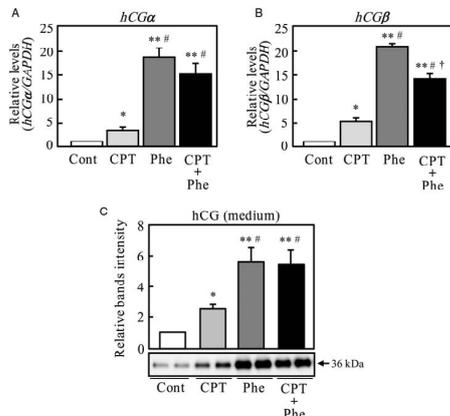


図 1、BeWo 細胞の hCG 産生に対する Epac アゴニストの作用

③トロホブラストのシンシチウム化における cAMP/Epac シグナルの役割

BeWo 細胞を用いてシンシチウム化 (細胞融合) に対する各 cAMP アナログの作用を調べた (図 2)。CPT または cAMP 安定体 (Db) の処置により多核のシンシチウム化細胞 (図中の白枠) の数が有意に増加した (図 2A,B)。しかし、Phe の処置は、シンシチウム化に影響しなかった (図 2A,B)。また、この CPT または Db によるシンシチウム化は、PKA 阻害剤 (H89) の存在下でも確認された (図 2C)。これらの結果から、cAMP による栄養膜細胞のシンシチウム化には、Epac を介したシグナル伝達経路が重要であることが示唆された。

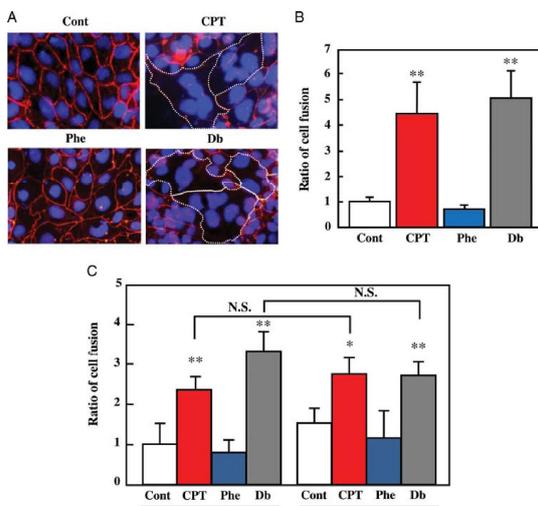


図 2. BeWo 細胞のシンシチウム化に対する Epac アゴニストの作用

そこで、Epac1、Epac2、及び Epac の標的因子として知られる低分子量 GTP 結合型蛋白質 Rap1 の発現を siRNA にてノックダウンし、Db 及び CPT によるシンシチウム化への影響を調べた (図 3)。Epac1 または Rap1 の発現をノックダウンするとシンシチウム化が抑制された。一方、Epac2 の発現をノックダウンしても、シンシチウム化には影響しなかった。このことから、cAMP シグナルの活性化に伴って起こる BeWo 細胞のシンシチウム化には Epac2/Rap1 シグナル伝達経路が重要であることが示唆された。

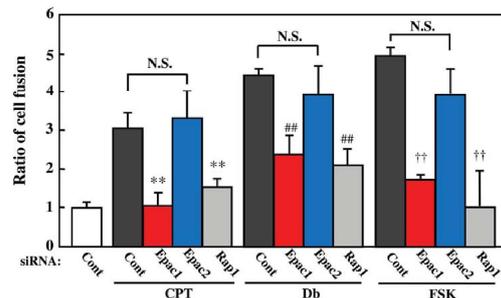


図 3. シンシチウム化に対する Epac1、Epac2、Rap1 ノックダウンの効果

以上の結果から、ヒト栄養膜細胞における cAMP を介した機能的分化とシンシチウム化には Epac シグナル伝達経路が関与することを明らかにした (図 4)。

なお、本研究成果は、*Human Reproduction*, 25:2229-2238, 2010 に掲載された。

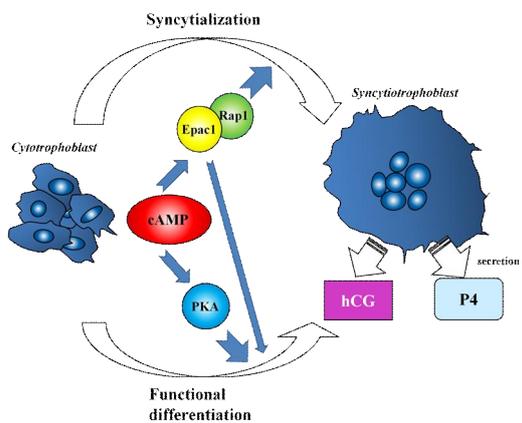


図 4. ヒト栄養膜細胞の機能的分化とシンシチウム化における Epac の関与

(2) ヒト子宮内膜の脱落膜化における **Epac1**、**Epac2** の発現と脱落膜細胞への分化過程における **Epac** シグナル伝達経路の役割

① ヒト子宮内膜組織における **Epac1** 及び **Epac2** の局在

分泌期の子宮内膜組織における **Epac1** 及び **Epac2** の局在を免疫蛍光染色法にて調べた (図 5)。**Epac1**、**Epac2** は、共に腺上皮細胞、間質細胞で発現していることが明らかとなった。また、データには示していないが、ラット子宮では、着床部位の脱落膜細胞に **Epac1**、**Epac2** が高発現していることも確認している。

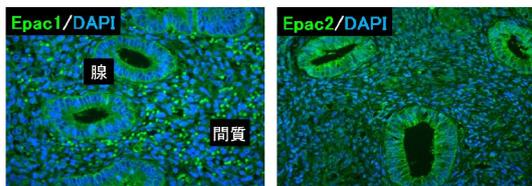


図 5. 子宮内膜組織における **Epac** の局在

② ESC の脱落膜化に対する **Epac** 選択的 cAMP アナログの効果

ヒト ESC の脱落膜化には PKA を介した cAMP シグナル伝達経路が重要であることが報告されている。そこで、この cAMP シグナルの活性化に伴う脱落膜化機構に **Epac** が関与するか否かについて検討した。子宮内膜組織より単離した ESC に、**Phe** または、**CPT** をそれぞれ 200 μ M 単独処置するか、または **Phe** (200 μ M) と **CPT** (10、50、200 μ M) を共処置 (**Phe / CPT** 群) し、48 時間培養後に脱落膜化マーカーである **PRL** と **IGFBP-1** の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した (図 6)。**Phe** 単独処置群では、未処置の対照群に比べ **PRL**、**IGFBP-1** mRNA 発現レベルが上昇したが、**CPT** 単独処置群ではこれらの発現は変化しなかった。しかし、**Phe** と **CPT** を共処置した群では、**Phe** 単独処置群と比較してこれらの発現量がさらに増加した。なお、が当研究室で樹立した ESC 株 (EtsT) においても同様の結果が得られた。

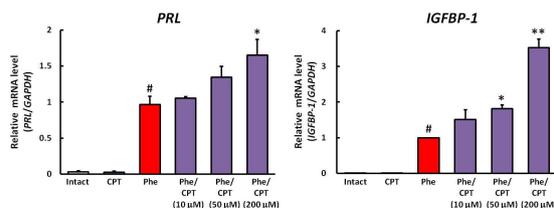


図 6. **PRL**、**IGFBP-1** mRNA 発現に対する **Epac** アゴニストの作用

③ ESC における **Epac** 下流シグナル **Rap1** の活性化に対する **Epac** の関与

cAMP / **Epac** 経路の下流シグナル伝達因子として知られている **Rap1** が ESC においても **CPT** の処置により活性化されるのか否かについて検討した (図 7)。**ESC** に **Phe** または **CPT** を処置した後、活性型 (GTP 結合型) **Rap1** 量をプルダウンアッセイにて解析したところ、**CPT** を処置しても活性型 **Rap1** 量は変化しなかった。また、**Phe** の処置も活性型 **Rap1** レベルに影響しなかった。しかしながら、予め **Phe** を処置して脱落膜化を進行させた **ESC** では、**CPT** または、**forskolin** の処置により、**Rap1** が活性化された (図 7)。**Phe** を前処置した細胞にさらに **Phe** を処置しても **Rap1** の活性化レベルは変化しなかった。データには示していないが、**Phe** を予め処置した **ESC** に **Epac1** または、**Epac2** の siRNA を処置すると **CPT** 処置後の活性型 **Rap1** のレベルが低下することも確認している。

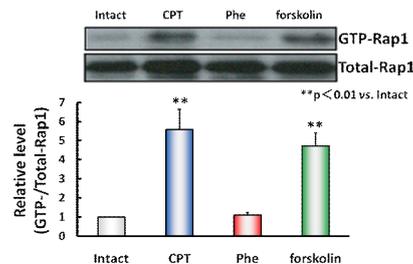


図 7. **Rap1** の活性化に対する **Epac** アゴニストの役割

④ ESC の脱落膜化に対する **Epac1**、**Epac2** 及び **Rap1** 発現抑制の効果

ESC における **Epac1**、**Epac2**、**Rap1** の発現を siRNA にて抑制した後、cAMP アナログを処置し、脱落膜化マーカーの発現を調べた (図 8)。対照群 (Cont siRNA 導入群) と比べ、**Epac1** または **Epac2** ノックダウン群では、**Phe** 単独処置及び、**Phe / CPT** 共処置後の **PRL**、**IGFBP-1** mRNA 発現レベルが低かった。また、**Rap1** ノックダウン群でも同様に **Phe** 単独処置及び、**Phe / CPT** の共処置による **PRL**、**IGFBP-1** mRNA 発現レベルが減少した。また、データには示していないが、培養メEDIUM 中の **IGFBP-1** 蛋白質量は対照群では、**Phe** 単独処置で高進し、**Phe / CPT** の共処置でさらに上昇した。**Epac1** ノックダウン群では、対照群に比べて **IGFBP-1** レベルはわずかに低下する程度であったが、**Epac2** または、**Rap1** のノックダウンにより **Phe** 単独処置群、**Phe / CPT** 群における **IGFBP-1** 分泌レベルが有意に低下した。

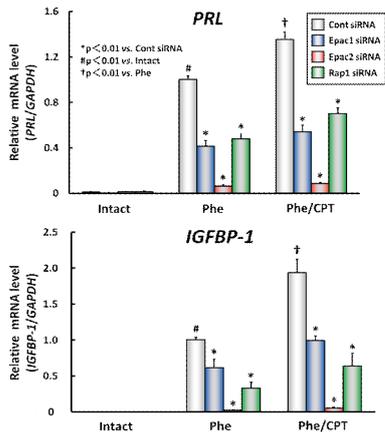


図 8. 脱落膜マーカーの発現に対する Epac、Rap1 ノックダウンの効果

⑤ 性ステロイドによる ESC の脱落膜化誘導に対する Epac 選択的 cAMP アナログの効果

cAMP シグナルの活性化を介した脱落膜化機構に、Epac1、Epac2 が関与していることが示された。子宮内膜は、性ステロイドのprogesterone (P4) とエストラジオール (E2) の作用を受けて脱落膜化する。そこで、P4/E2 処置時の IGFBP-1 発現における Epac の関与について検討した (図 9)。ESC に P4 と E2 を 8 日間処置 (P4/E2 群) すると、IGFBP-1 mRNA 発現レベルが上昇した。P4/E2 に加えて CPT をさらに処置 (P4/E2/CPT 群) すると、IGFBP-1 mRNA 発現レベルが P4/E2 群と比べて有意に高進した。また、培養メディアム中の IGFBP-1 分泌レベルも同様に P4/E2 群で高進し、P4/E2/CPT 群ではさらに上昇した。これらの結果から、性ステロイドを処置した ESC においても Epac シグナルを活性化すると脱落膜マーカーの発現が高進することが明らかとなった。

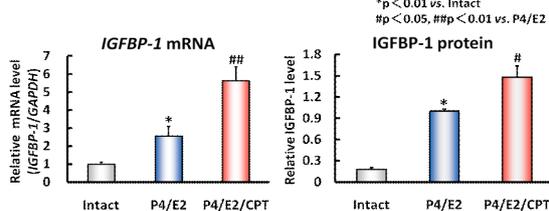


図 9. 性ステロイド誘導性の IGFBP-1 発現に対する Epac 選択的 cAMP アナログの効果

以上の結果から、ヒト ESC における脱落膜化には cAMP を介した PKA シグナルに加えて Epac/Rap1 シグナル伝達経路が関与することを明らかにした。また、ESC において Epac シグナル経路は、PKA シグナル経路と関連していることも示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Yoshie M, Kaneyama K, Kusama K, Higuma C, Nishi H, Isaka K, Tamura K. Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells. *Human Reproduction*, 25:2229-2238 2010
査読有

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一, 樋熊 千夏, 西洋孝, 井坂 恵一
ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) シグナル伝達経路の役割
第 63 回西東京内分泌代謝研究会 2009 年 7 月 6 日 東京医科大学 (東京)
- (2) 吉江 幹浩, 草間 和哉, 田村 和広, 沓掛 真彦, 井坂 恵一, 立川 英一
ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化におけるサイクリック AMP グアニンヌクレオチド交換因子 (Epac) の役割
第 14 回日本生殖内科学会学術集会 2009 年 11 月 28 日 シェーンバッハ・サボー (東京)
- (3) 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一, 樋熊 千夏, 西洋孝, 井坂 恵一
ヒト子宮内膜間質細胞の in vitro 脱落膜化過程における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) シグナル伝達経路の関与
第 64 回西東京内分泌代謝研究会 2009 年 12 月 7 日 東京医科大学 (東京)
- (4) 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 井坂 恵一, 立川 英一
子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) を介する cAMP シグナル伝達経路の関与
日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30 日 岡山コンベンションセンター (岡山)
- (5) 吉江 幹浩, 田村 和広, 大石 健介, 沓掛 真彦, 立川 英一
絨毛外栄養膜細胞における低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap1 による EGF シグナルの調節
第 123 回 日本薬理学会関東部会 2010 年 10 月 23 日 自治医科大学 (栃木)

- (6) 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一
子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) シグナル伝達経路の関与
第 15 回 日本生殖内分泌学会学術集会
2010 年 11 月 20 日 千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- (7) 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一
Epac を介したサイクリック AMP シグナル伝達経路がヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化に関与する
第 84 回 日本薬理学会年会 2010 年 3 月 22 日 パシフィコ横浜 (横浜)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
吉江 幹浩 (YOSHIE MIKIHIRO)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号 : 50434014