

機関番号： 13201  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2009-2010  
 課題番号：21791546  
 研究課題名 (和文) 妊娠高血圧症候群の病態解明—サイトカイン分泌に対するオートファジー—応答の観点から  
 研究課題名 (英文) Pathophysiology of preeclampsia- the role of autophagy treated with cytokines  
 研究代表者  
 中島 彰俊 (Nakashima Akitoshi)  
 富山大学 大学院医学薬学研究部・助教  
 研究者番号：00436792

研究成果の概要 (和文)：可溶性エンドリン (sEndoglin) は抗血管新生作用をもつことが知られているが、sEndoglin存在下の共培養によりEVTセルライン2種類においてオートファジーを抑制し、浸潤を抑制することが分かった。このことは、オートファジーがpreeclampsiaの病態と関与する可能性を示すものである。

研究成果の概要 (英文)：A decrease of extravillous trophoblast invasion was correlated with the inhibition of autophagy by soluble endoglin, which increases in serum in preeclampsia patients. This result could suggest the correlation between autophagy and pathophysiology of preeclampsia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医学薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：生殖医学

#### 1. 研究開始当初の背景

オートファジー(以下 AtP)とは、真核細胞に備わる大規模な細胞内分解系であり、飢餓応答や細胞の恒常性維持に重要な役割を担っていることが知られているが、昨今、AtP は細胞内環境の恒常性維持という細胞の生存面に関与する報告がある一方、細胞死にも関与するという幅広い役割を持つことが判明し、再度注目を浴びている。一方、妊娠とは胚の子宮内膜への着床に始まり、その後の胎盤形成と共に胎児を育む現象であるが、それらの発育の異常が流産、子宮内胎児発育遅延 (IUGR)、妊娠高血圧症候群 (PIH) に深く関与している事が知られている。アポトーシスが生物の発生過程において重要であることは

言うまでもないが、妊娠現象とオートファジーの関与を示す報告はこれまでほとんどなかった。

本研究におけるメインテーマである胎盤形成過程において、絨毛外栄養膜細胞(以下 EVT 細胞)は母体面に浸潤する細胞であり、その浸潤の深さが他の哺乳類より深く母体面に浸潤するという特徴を持つ。また先述の IUGR や PIH では、EVT 細胞の不十分な浸潤が観察される。EVT の大きな機能的特徴であるこの浸潤能は、興味深いことに細胞生存に不利となる低栄養・低酸素環境という妊娠初期脱落膜において、積極的に母体面に浸潤して行く。それでは、なぜ死なずに浸潤できるのか？この現象はヒトに特異的な点も興味深

いものであるが、その機構は全くのブラックボックスであった。そこで、細胞生存に不利な環境でも細胞の恒常性維持する機構として AtP に注目し、その機構と EVT の浸潤能との関係を明らかにすることから実験が始まった。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに EVT (絨毛外栄養膜細胞) 細胞がオートファジーを活性化させ、低酸素下で浸潤することを明らかにしてきた。しかしながら、胎盤形成不全が起因となる妊娠高血圧症候群 (PIH) の病態解明にオートファジーが如何に関与するかは全く不明であった。そこで申請者は、PIH 関連サイトカイン等の EVT におけるオートファジーへの影響、特にオートファジー抑制を起こすものがないかを初めに検討した。

## 3. 研究の方法

1) 細胞：絨毛外栄養膜細胞の Cell line である HTR8/SV40-neo (以下 HTR8) および HChEpC1b 細胞を譲渡され、使用した。また、絨毛外栄養膜細胞の Primary 細胞 (以下 Primary EVT) を分離した (同意を得た流産検体より)。

2) AtP の発生モニタリングおよびその抑制系：AtP の発生の確認には、局在パターンを変化させる分子 LC3 を使用した。具体的には、GFP を結合した GFP-LC3 発現アデノウイルスを用いることで高効率に LC3 を細胞導入可能となり、AtP を蛍光顕微鏡下に容易に可視化できる実験系を用いた。3) セルラインの確立：薬剤による抑制系より特異的に AtP を抑制するため、AtP 発生に必須の Atg 4B 分子の Dominant negative 分子を発現するレトロウイルスを用いて、恒常的に AtP が抑制された HTR8/4B 細胞を作成していたが、それに加え HChEpC1b/4B を作成し、実験に供した。4) 細胞ストレス下における絨毛外栄養膜細胞の浸潤メカニズム：マトリゲルを用いてストレス下における細胞浸潤能を評価した。

## 4. 研究成果

### 1) sEndoglin による AtP の抑制

PIH に関連するサイトカインおよび血管新生阻害因子として、TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 、sEndoglin、sFlt-1 を用いて AtP への影響を評価した。sEndoglin において AtP の抑制効果が認められた。

### 2) sEndoglin による EVT 浸潤の抑制

これまでに AtP の活性化により EVT 浸潤が増強することを報告してきた。そこで、AtP を抑制する sEndoglin 投与下における EVT 浸潤を評価した。その結果、24 時間では浸潤に影響を与えなかったが、48 時間において EVT 浸潤が約 40% 低下されることが確認された (p<0.0001) 一方で、この効果は AtP 欠損細胞には認められなかった。この結果は HTR8 細胞および HChEpC1b 細胞の両方で認められた。

また、HTR8 細胞および HChEpC1b の Wild type および AtP 欠損細胞 (4B 細胞) 間の細胞増殖能には、sEndoglin の存在は影響を与えないことから、AtP 抑制が浸潤抑制に関与することが明らかとなった。

### 3) MMP2/MMP9 発現

結果 2) と同様の条件のもとで、MMP2/MMP9 それぞれの発現量を検討した。RT-PCR および ELISA において、発現量に有意な差を認めなかった。このことは、AtP 抑制が MMP 量の調節に関与しないことを示唆すると考えられた。

4) TGF- $\beta$  が sEndoglin の浸潤抑制を解除する。TGF- $\beta$  による血管形成を sEndoglin が拮抗し、その阻害に働くことが知られている。そこで、結果 2) のように、sEndoglin 存在下に TGF- $\beta$  を濃度依存性に投与した。浸潤細胞数は濃度依存性に回復し、20ng/ml において浸潤能が Control (無処理) レベルまで回復することが分かった (p=0.008)。このことは、sEndoglin による EVT 浸潤抑制から TGF- $\beta$  がその発現を保護していることを示している。

## 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 7 件)

1. “Accumulation of IL-17-Positive Cells in Decidua of Inevitable Abortion Cases.” Nakashima A, Ito M, Shima T, Bac ND, Hidaka T, Saito S. Am. J Reprod Immunol. 64:4-11. 2010. 査読有
2. “Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy.” Nakashima A, Ito M, Yoneda S, Shiozaki A, Hidaka T, Saito S. Am. J Reprod Immunol. 63:104-9. 2010. 査読有
3. “A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour” Ito M, Nakashima A, Hidaka T, Bac ND, Ina S, Yoneda S, Shiozaki A, Sumi S, Tsuneyama K, Nikaido T, Saito S. J Reprod Immunol. 84:75-85. 2010. 査読有
4. “Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell

- paradigm in pregnancy” Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Am. J Reprod Immunol. 84:75-85. 2010. 査読有
5. “Systemic lymphadenectomy cannot be recommended for low-risk corpus cancer” Takao H, Nakashima A, Shima T, Hasegawa T, Saito S. Obstetrics and Gynecology International 2010. 査読有
  6. “Endometrioid adenocarcinoma of the vagina with a microglandular pattern arising from endometriosis after hysterectomy.” Nomoto K, Hori T, Kiya C, Fukuoka J, Nakashima A, Hidaka T, Saito S, Mikami Y, Tsuneyama K, Takano Y. Pathology International. 60:636-641 2010. 査読有
  7. “Toll-like receptor signaling in uterine natural killer cells--role in embryonic loss.” Lin Y, Nakashima A, Shima T, Zhou X, Saito S. J Reprod Immunol. 2009 83:95-100. 2009. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 「Autophagy is an indispensable mechanism for extravillous trophoblast invasion」第 69 回 日本癌学会学術総会 大阪 国際会議場 シンポジウム “Cancer and autophagy” Saito S, Nakashima A 2010. 9. 22-9. 24
2. 「The role of IL-17 in the pathogenesis of preterm labor」International symposium for immunology of reproduction, symposium “Infectious immunity “ Nakashima A, Ito M, Shima T, Yoneda S, Saito S, Osaka Aug 28th-29th, 2010
3. 「オートファジーは絨毛外栄養膜細胞

に必須の機構である」学術奨励賞 第 15 回 日本病態プロテアーゼ学会 大阪 千里ライフサイエンスセンター 2010. 8. 20~8. 21 中島彰俊

4. “T 細胞・NK 細胞と妊娠維持 “ シンポジウム 「Trophoblast に関わる免疫と臨床病態」第 17 回 日本胎盤学会学術集会 東京, 10/16-10/17, 2009 中島彰俊
5. “オートファジーは絨毛外栄養膜細胞浸潤に必須の機構である “ 学会賞 第 17 回 日本胎盤学会学術集会 東京, 10/16-10/17, 2009 中島彰俊
6. “The role of autophagy on the invasion of extravillous trophoblast” International Federation of Placenta Associations Adelaide, Australia, Oct 6<sup>th</sup>-9<sup>th</sup>, 2009 Nakashima A, Tatematsu M, and Saito S.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中島 彰俊 (Nakashima Akitoshi)  
富山大学 大学院医学薬学研究部・助教  
研究者番号：00436792

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者