

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09500

研究課題名（和文）胎盤形成不全における小胞体シャペロン-カルネキシンの発現と病態意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of expression and pathological significance of endoplasmic reticulum chaperone-carnexin in placental insufficiency

研究代表者

松川 仁登美 (Matsukawa, Hitomi)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：10816705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠高血圧腎症（Preeclampsia; PE）や胎児発育不全は母体や児の予後に大きな影響を与える妊娠合併症であり、その成因として胎盤形成不全が示唆されている。我々は、PEの胎盤組織において、カルネキシン（CNX）の発現レベルが低下しているという予備知見を得た。そこで、CNX低発現BeWo細胞を作製し、同細胞におけるシンシチウム化に関する細胞生物学的解析を行った。その結果、CNXは胎盤形成過程に重要な生理的機能をもっており、CNX発現量の低下によって、細胞表面のLHCGR発現量が低下し、-hCG生成不全となることから、CNXは胎盤形成に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回得られた結果をもとに、今後はさらにPEやFGRを含む妊婦症例の妊娠期間中の母体血および分娩時の胎盤・臍帯血におけるCNXや関連分子の解析を行い、妊娠や胎盤形成における小胞体ストレス応答、CNXが関わる絨毛細胞機能制御との関連を明らかにし、胎盤形成不全のさらなる病態解明を目指す予定である。これらの成果を統合して、胎盤形成不全におけるCNXの新たな制御分子としての役割に関する基礎医学的な知識基盤を作り出すことで、PEやFGRの新規治療開発のみならず、細胞生物学・医学生化学領域における学術発展への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Preeclampsia (PE) and fetal growth failure are pregnancy complications that have a major impact on maternal and infant prognosis, and placental hypoplasia has been suggested as a cause of this. We have obtained preliminary findings that the expression level of carnexin (CNX) is reduced in the placental tissue of PE. Therefore, CNX-low-expressing BeWo cells were produced and cell biological analysis related to syncytiation in the same cells was performed. As a result, CNX has an important physiological function in the placental formation process, and as a result of the decrease in CNX expression level, the LHCGR expression level on the cell surface decreases, resulting in B-hCG production failure, suggesting that CNX is involved in placental formation.

研究分野：産婦人科

キーワード：CNX CRT hCG placenta

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症(Preeclampsia; PE)は高血圧・タンパク尿・浮腫を主張とする妊娠合併症である。確実な治療は妊娠の終了しかなく、胎児発育不全(Fetal growth restriction; FGR), 常位胎盤早期剥離や子癇, HELLP 症候群など重篤な合併症を併発し、母体や児の予後に大きな影響を与える。PE・FGRの成因として、絨毛外栄養膜細胞(Extravillous trophoblast; EVT)の浸潤不全および細胞性栄養膜細胞(Cytotrophoblast; CTB)から合胞体栄養膜細胞(Syncytiotrophoblast; STB)への分化・細胞融合(シンシチウム化)不全などによる、胎盤形成不全が関連していると言われている。近年では酸化ストレスや小胞体ストレスの関与が示唆されているが、確立された病態メカニズムはなく、有効な治療標的分子の同定や新規治療の開発が求められている。

ヒト妊娠において、細胞小器官である小胞体(ER)の分子シャペロンであるカルレチキュリン(Calreticulin; CRT)は、妊婦の胎盤や血中で高発現していることや、PE患者の血液中でそのレベルが上昇することから、胎盤形成不全の病態機構との関連が示唆された。これまで申請者らは、CRTが胎盤形成において、接着分子インテグリンの糖鎖合成制御への関与を介してEVT細胞の接着・浸潤能を調節し、EVT浸潤不全を基盤とするPEやFGRの病態との関連を示した。さらに、CRTがhCG分泌やE-カドヘリンの膜輸送の制御を介して、胎盤形成後期のシンシチウム化や絨毛細胞融合を調整することを明らかにした。以上より、CRTが胎盤発生に重要な機能分子であり、CRT機能不全は胎盤形成不全の分子病態に深く関与することが明らかとなった(Yamamoto, Ikezaki, Iwahashi, et al., Endocrinology. 2017 / Iwahashi, Ikezaki, et al., Endocrinology. 2019)。一方、CRTの機能的パラログ分子であるカルネキシン(Calnexin; CNX)は、CRTとともにERにおいてカルネキシン/カルレチキュリン(CNX/CRT)シャペロンサイクルを補完的に制御するERの膜結合型の分子シャペロンである[図1]。CNXは神経系のミエリン形成に必須であり、多発性硬化症との関連が報告されており、CNXがCRTとは異なる特異的な生体機能をもつことも予想される。CNXはヒト胎盤組織において高発現し、タンパク分解により可溶化型分子が生成されることは報告されている。CNXはCRTの相補的機能分子であるが、その胎盤機能や胎盤形成不全の病態との関連は全く検証されていない。本研究では、CNXの胎盤正常機能や胎盤機能不全の病態における役割を明らかにすることを目的とした。

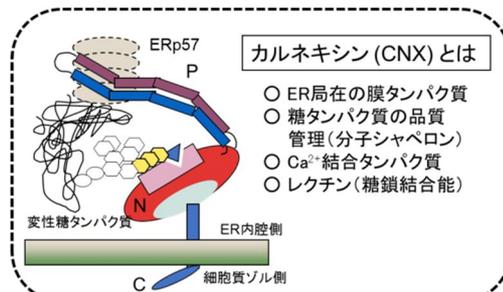


図1. カルネキシンの構造と機能

2. 研究の目的

我々は、先行研究において、CRTがヒト胎盤組織では主に脱落膜内のEVTやSTBに強発現していることを明らかにしている。さらに、CRTは胎盤形成不全を伴うFGR胎盤で発現が有意に低いことも判明しており、このことから、正常な妊娠維持にはCRTが必要であり、CRTの発現低下がPEやFGRなどの原因となる胎盤形成不全と関連する可能性が示唆された。CNXはCRTの相補的な機能的パラログ分子であるが、胎盤機能維持や胎盤形成不全の病態との関連についてはほとんど解明されていない。我々は、PEにおいてCNXの胎盤組織レベルが有意に減少しているという予備知見を得た[図2]。本研究では、我々独自の知見をもとにCNXの胎盤形成および正常な妊娠維持に対する影響について、胎盤のシンシチウム化に焦点を絞り、そのメカニズムの解明を目指す[図3]。

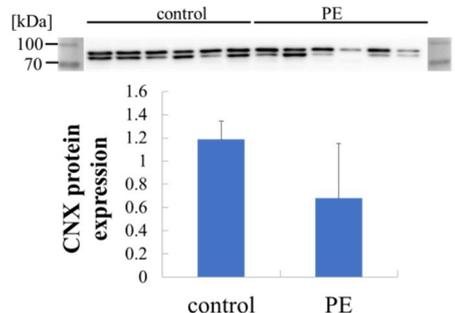


図2. PE胎盤組織におけるCNX発現の低下

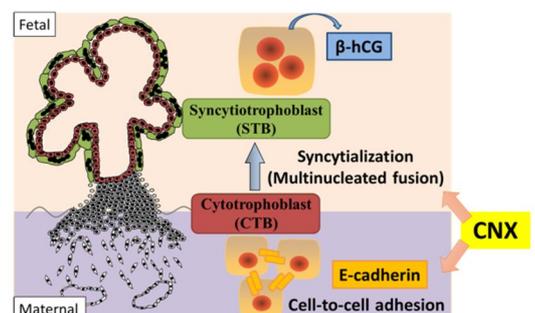


図3. 胎盤形成におけるCNXの役割「仮説」

本研究では、栄養膜細胞モデルとして絨毛癌細胞株であるBeWo細胞を用いたin vitro研究を行う。さらに臨床検体を用い、PEやFGRを含む妊婦症例の妊娠期間中の母体血および分娩時の胎盤・臍帯血におけるCNXや関連分子の解析を行い、妊娠や胎盤形成における小胞体ストレス応答、さらにはCNXが関わる絨毛細胞機能制御との関連を明らかにし、胎盤形成不全のさらなる病態解明および新たな治療法確立の基盤を構築することを目的とする。以上の成果を統合

することにより、胎盤形成異常の分子制御機構の解明に向けた分子シャペロン・CNX の新たな制御分子としての役割に関する基礎医学的な知識基盤を作り出すことに学術的独自性と創造性があり、本研究で得られる新たな知見は、胎盤形成不全の新規治療開発のみならず、広く細胞生物学・医学生化学領域における学術発展の形成に貢献するものと期待できる。

3. 研究の方法

(1) CNX 低発現 BeWo 細胞の作製

CNX 低発現 BeWo 細胞は、野生型 BeWo 細胞にヒト CNX-shRNA 発現ベクター (OriGene 社 TR314210) を導入し、ピューロマイシンによる薬剤耐性選択と RT-PCR あるいはイムノブロット法による CNX 発現抑制の確認を指標にスクリーニングした。研究分担者の井原、池崎らの準備実験において、すでに CNX 低発現 BeWo 細胞の作製に成功している [図 4]。

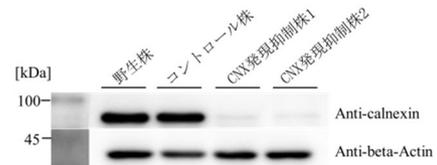


図4. CNX低発現BeWo細胞におけるカルネキシンの発現

(2) 胎盤絨毛細胞における CNX 基質糖タンパク質に関する生化学的解析

CNX の基質糖タンパク質の生合成、分子の細胞内動態の変化について詳細な生化学的解析を進めた。CNX の基質タンパク質としては、胎盤発生において重要な hCG や、これまでに細胞接着や細胞外基質接着において着目してきた E-カドヘリン、インテグリンを中心に解析した。細胞内あるいは細胞外 (培地への分泌) における CNX 標的分子の変化を、特異抗体を用いた免疫沈降とイムノブロット法や、放射線標識ラベルした細胞サンプルを用いた電気泳動とオートラジオグラフィなどの生化学実験を組み合わせ解析した。合成途上の CNX 標的分子の細胞内局在は、免疫蛍光抗体法と共焦点レーザー顕微鏡による形態学的解析とともに、超遠心による分画細胞小器官の調整と各種の特異抗体による免疫沈降を組み合わせ解析した。CNX 標的分子が小胞体からゴルジ体を経て分泌小胞までのどの小器官分画に到達しているのかその局在を解析した。さらに、様々な細胞ストレスの CNX 標的分子の産生あるいは細胞外分泌への影響についても解析した。また、糖鎖構造については種々の標識レクチン (DSA, ConA, L-PHA, WGA など) を用いたレクチンブロット法により定性的に評価した。細胞ストレスとしては、胎盤形成不全で問題とされる、酸化ストレスや小胞体ストレス、血清除去ストレス、低酸素環境などの CNX 標的分子の産生への影響についても検討した。

(3) CNX 低発現 BeWo 細胞におけるシンシチウム化に関する細胞生物学的解析

CNX 低発現 BeWo 細胞や対照細胞について、常法に従いフォルスコリン処理によるシンシチウム化モデルを作成した。細胞のシンシチウム化は、細胞上清中の -hCG 分泌を WB により解析して評価した。予備実験の結果、Forskolin 処理による hCG の細胞外分泌が、CNX 低発現 BeWo 細胞では対象の野生型 BeWo 細胞に比べて有意に抑制されることがわかった [図 5]。

また、シンシチウム化に伴う CNX 低発現 BeWo 細胞や対照 BeWo 細胞の形態学的な細胞融合像を比較検証した。形態学的解析には、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光免疫染色法を行った。さらに、シンシチウム化前後の機能的変化として、増殖能・接着能・浸潤能・遊走能などについて、種々の細胞外マトリックスタンパク質基質のコートングプレート、スクラッチ・アッセイ、インベーション・チャンバーなどを用いた In vitro アッセイで評価することにより、CNX 発現抑制のシンシチウム化への影響とその分子機構についての解析を進めた。

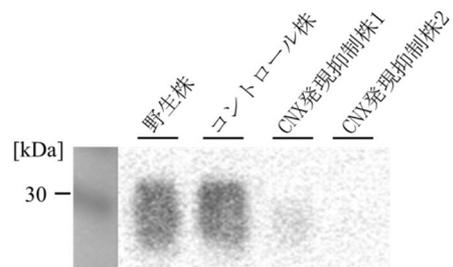


図5. CNX低発現BeWo細胞におけるForskolin誘導性hCG分泌の抑制

(4) ヒト胎盤組織を用いた CNX 発現量および臨床的特徴に関する解析

インフォームドコンセントを行い、文書にて本研究に同意を得られた症例を対象とした。妊娠初期絨毛は人工妊娠中絶時に採取し、妊娠後期症例は帝王切開時に娩出された対象群、PE 単独群、FGR 単独群、および PE/FGR 合併群の胎盤組織、母体血清、および臍帯血を用いた。絨毛細胞の CNX や種々の分子シャペロンおよび細胞接着分子の発現量などについて生化学的解析、および病理学的・免疫組織学的評価を行い、臨床的特徴との関連を検討する。

4. 研究成果

インフォームドコンセント取得のもとに得られたヒト胎盤組織において、CNX のタンパク質発現について、免疫組織化学的解析とウェスタンブロット法により検討した。ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞株に CNX-shRNA 発現ベクターを導入し、CNX 低発現安定細胞株を作製した。CNX の発現抑制がシンシチウム化に及ぼす影響について、Forskolin 誘導性の細胞融合や -hCG の発現・分泌、-hCG 受容体である黄体形成ホルモン/絨毛性ゴナドトロピン受容体 (Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor: LHCGR) の発現を指標とし、特異抗体を用いたウェスタンブロット法、免疫蛍光染色法、Real time RT-PCR (RT-qPCR) 法、LHCGR の Pull-down アッセイなどにより検討した。

(1) ヒト胎盤組織における CNX の発現の検討

ヒト胎盤において、免疫組織化学的解析により、CNX は主に STB に局在することが明らかとなった[図 6]。正常胎盤組織と PE 胎盤組織における CNX のタンパク質発現量をウェスタンブロット法で比較した結果、PE 胎盤組織において CNX の発現量の低下を認めた[図 7]。

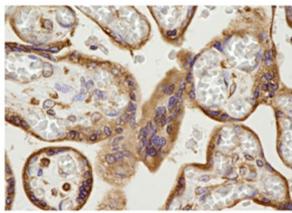


図6. CNXの局在

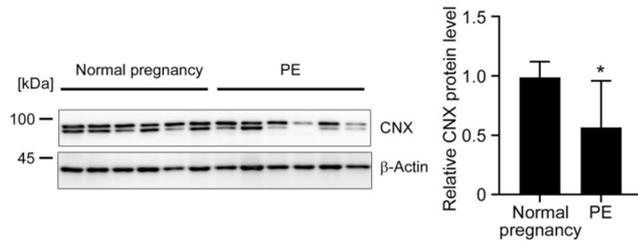


図7. PE胎盤組織におけるCNX発現量の低下

(2)CNX 低発現 BeWo 細胞株の作製

CNX-shRNA 発現ベクターの BeWo 細胞への導入により CNX 低発現安定細胞株を作製した。ウェスタンブロット法および免疫蛍光染色法による細胞解析により、タンパク質レベルで CNX の発現が抑制されていることを確認した。コントロール細胞株と CNX 低発現細胞株とで明らかな細胞形態の変化は認めなかった。また、細胞増殖に明らかな影響はみられなかった。

(3)CNX 発現抑制によるシンシチウム化能、 β -hCG の合成・分泌能への影響についての検討

Forskolin 誘導性の細胞融合については、抗-catenin あるいは抗-Zonula occludens protein-1 特異抗体を用いた免疫蛍光染色法で評価した。CNX 低発現細胞株ではコントロール細胞株と比較して、細胞融合が有意に抑制されていた[図 8]。また、 β -hCG の合成、分泌についても、ウェスタンブロット法、免疫蛍光染色法、RT-qPCR 法を用いて評価した。CNX 低発現細胞株では、コントロール細胞株と比較して、 β -hCG のタンパク質発現量が細胞内、細胞外ともに低下していた。免疫蛍光染色法、RT-qPCR において、 β -hCG 発現量、mRNA 量ともに同様に低下した。

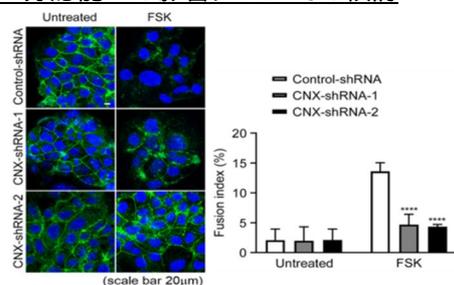


図8. CNX低発現BeWo細胞における細胞融合抑制

(4)CNX 発現抑制による細胞膜上の LHCGR 発現量の変化

β -hCG の受容体である LHCGR の総発現量および細胞膜上での発現量の CNX 発現抑制による変化を、特異抗体を用いたウェスタンブロット法および免疫蛍光染色法により検討した。CNX 低発現細胞株では、コントロール細胞株と比較して LHCGR 総発現量に有意差は認めなかった。一方、細胞表面のタンパク質をビオチン化し、アビジンビーズで回収後、LHCGR のタンパク質量をウェスタンブロット法で評価した結果、細胞膜上の LHCGR 発現量が CNX 低発現細胞株でコントロール細胞株と比較して有意に低下していた[図 9]。

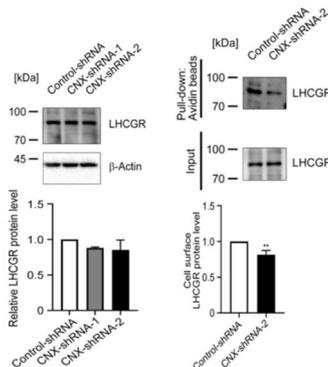


図9. CNX低発現BeWo細胞における細胞表面LHCGR発現量の低下

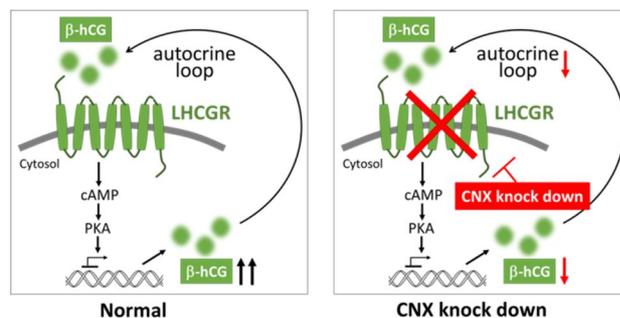


図10. CNX低発現BeWo細胞における β -hCG生成抑制機構

ヒト PE 胎盤組織では正常胎盤組織と比較して 組織抽出サンプル中の CNX のタンパク質発現量が有意に低下していたこと、CNX 低発現 BeWo 細胞株ではコントロール細胞株と比較して、Forskolin 誘導性の細胞融合能および β -hCG 合成・分泌能が有意に低下していたことから、CNX は CRT と同様に、胎盤形成過程、特にシンシチウム化に重要な機能をもつことが示唆された。また、CNX 低発現細胞株では、 β -hCG の受容体である LHCGR の細胞膜への輸送が抑制され、細胞膜上の LHCGR 発現量が低下した結果として、 β -hCG シグナルのオートクライン制御の障害が示唆された[図 10]。

以上より、CNX が胎盤形成のシンシチウム化において、LHCGR の細胞膜への輸送や β -hCG 分泌の誘導に関与することが明らかとなり、CNX 発現量の低下は PE など胎盤形成不全と関連することが考えられた。本研究結果を 2022 年に論文として報告した(Matsukawa, Ikezaki, Iwahashi, et al., Biomolecules. 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsukawa Hitomi, Ikezaki Midori, Nishioka Kaho, Iwashashi Naoyuki, Fujimoto Masakazu, Nishitsuji Kazuchika, Ihara Yoshito, Ino Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Calnexin Is Involved in Forskolin-Induced Syncytialization in Cytotrophoblast Model BeWo Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1050 ~ 1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom12081050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松川仁登美
2. 発表標題 Calnexin is involved in forskolin-induced beta-hCG expression in BeWo cells
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松川仁登美
2. 発表標題 カルネキシンはb-hCG発現誘導に寄与する：胎盤形成との関連
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松川仁登美
2. 発表標題 胎盤形成不全におけるカルネキシン発現抑制とb-hCG発現・分泌抑制機序について
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松川仁登美
2. 発表標題 胎盤形成不全においてカルネキシン低下がb-hCG発現・分泌を抑制する
3. 学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	池崎 みどり (Ikezaki Midori) (40549747)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	
研究分担者	岩橋 尚幸 (Iwahashi Naoyuki) (50750907)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	
研究分担者	井籠 一彦 (Ino Kazuhiko) (60303640)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究分担者	井原 義人 (Ihara Yoshi to) (70263241)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	

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
---------	---------