

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592416

研究課題名(和文) 絨毛細胞障害のCD44細胞内シグナル伝達系を介した修復制御機構の検討

研究課題名(英文) Repair of the damaged trophoblast cells through CD44-mediated signaling

研究代表者

杉村 基 (Sugimura, Motoi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：30273189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：胎児発育遅延の主なる原因である胎盤絨毛細胞障害の、妊娠中の自己修復制御機構は知見が乏しい。合胞体栄養細胞は絨毛間腔を形成し、細胞膜表面にはヘパラン硫酸/ヘパリンといった陰性荷電を有する糖鎖が豊富に存在している。ヘパラン硫酸/ヘパリンはその受容体であるCD44および各種増殖因子受容体を介しPAK、Stat3、Aktといった細胞内シグナル伝達系分子により細胞遊走を促し、創傷治癒にかかわることを不死化絨毛細胞株(TCL-1)を用いて検討した。その結果、絨毛細胞がheparin/HSにより他の増殖因子のシグナリングを直接的には介さず、CD44v3を介して細胞移動を促進し組織修復を行うことを示した。

研究成果の概要(英文)：The function of CD44v3 and heparin/heparan sulphate (HS) signaling was investigated during trophoblast cell migration. We evaluated the effect of heparin/HS/CD44v3-mediated processes during scratch wound closure in TCL-1 cells. An in vitro scratch wound healing assay showed enhanced migration of trophoblast cells in a dose-dependent manner in the presence of heparin compared with controls. Conversely, an anti-CD44 function blocking antibody and CD44siRNA suppressed the migration of trophoblast cells in the presence of heparin in a similar scratch assay. Both heparin treatment and in vitro scratch wounding induced the phosphorylation of p21-activated kinase 1 (PAK1), while the anti-CD44v3 antibody suppressed the heparin-induced phosphorylation of PAK1. These results indicate that heparin/heparan sulphate/CD44v3-mediated signaling, in the absence of growth factor networks, enhances the direct repair of the damaged trophoblast layer through the migration of trophoblast cells.

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：絨毛細胞 CD44 シグナル伝達 再生

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内胎児発育遅延 (IUGR) は前期破水等による早産とならんで母体胎児適応による人工早産の大きな原因となっており、重度の IUGR 例では子宮内胎児死亡に至る例もある。新生児医療の向上とともに早産例における生命予後は改善しつつあるが、現在においても IUGR を伴う場合、脳質周囲白質軟化症 (PVL) や脳出血に関連した脳性小児麻痺の大きな原因となっている。妊娠高血圧症候群 (PIH) 合併妊娠、抗リン脂質抗体症候群 (APS) 合併妊娠では比較的多くの例で IUGR を合併することから、これ等合併症妊娠での IUGR 機序の解明はそのまま新生児医療における児の予後改善に大きく寄与すると考えられる。

その胎盤病理所見は主として PIH に見られる絨毛壊死、合胞体結節の増加を示す虚血性病変と、APS にみられる母体面のフィブリンが梗塞像を示し合胞体栄養膜細胞にフィブリン沈着を示す特徴的な所見が見られる。そのため古くよりこうした胎盤病理所見から絨毛間腔を構成する絨毛細胞障害が胎児-胎盤-母体間の栄養ガス交換不良を惹起すると考えられてきた。

現在においても PIH 合併妊娠例では妊娠初期における絨毛の子宮筋層へ浸潤不良の結果、血管構築が十分行われず、胎盤内循環の不良が引き起こす絨毛細胞障害が IUGR の原因であるとする説と胎盤所見は一致、APS 合併妊娠においては過凝固状態による胎盤内フィブリン沈着が IUGR の原因とする説と一致している。また、胞状奇胎合併妊娠に伴う絨毛細胞異常、染色体異常に伴う絨毛細胞異常、サイトメガロウイルス感染に伴う絨毛細胞障害による IUGR など、こうした病理学的観察に基づき、機序の本体は絨毛細胞障害であると考えられ多くの研究がなされている。

一方、APS 合併妊娠で妊娠初期からのヘパリンによる抗凝固療法の導入後、IUGR の改善と生児獲得率の大幅な改善が報告され、血栓形成抑制による絨毛細胞障害の改善が理由と考えられている。

ヘパリン硫酸/ヘパリンはグルクロン酸またはイズロン酸に N-アセチルグルコサミンが結合したグリコサミノグリカンで糖鎖としてコアプロテインに結合している。生理的に血管内皮をはじめとして大量に細胞膜表面に存在し、局所での生理活性発現に関与している。特にヘパリンは負に帯電した硫酸基を多く含み種々の生理活性物質との相互作用や、アンチトロンビンと結合しトロンビンを抑制するといった抗凝固作用を示す。また、ヘパリン様物質は古くより創傷治癒に関与すると言われ、インスリンと並んで血管内皮細胞の増殖が観察されてきている。hepatocyte growth factor (HGF)、epidermal growth factor (EGF)-like EGF などの増殖因子に結合し、その受容体-シグナル伝達系 (Stat3、Akt、Fak など) を介して、増殖、分化、浸潤、移動に関与していることが示されてきている。こうした中で、ヘパリンによる過凝固惹起マウス IUGR モデルでの改善を示す観察と並んで、絨毛細胞障害を惹起した SOCS-knockout mouse モデルにおいてマウス絨毛細胞幹細胞により機能を再生した実験は絨毛細胞障害が修復されうるものであることを示唆する興味深い実験である。ヒト絨毛外絨毛細胞(EVT)株を用いた *in vitro* 浸潤実験ではヘパリン-hepatocyte growth factor (HGF)-c-met が抑制、トロンビン-protease-activated receptor 刺激により促進と絨毛細胞浸潤については矛盾する結果が示されてきているものの、これら研究報告に基づき、母体血と直接接する合胞体栄養膜細胞のヘパリンによる修復と病

態改善の可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

子宮内胎児発育遅延の主なる原因として胎盤絨毛細胞障害があるが、障害後の修復過程の制御機構については知見が乏しい。合胞体栄養細胞は絨毛間腔を形成し、細胞膜表面にはヘパラン硫酸/ヘパリンといった陰性荷電を有する糖鎖が豊富に存在している。ヘパラン硫酸/ヘパリンは各種増殖因子とともに Stat3、Akt、Fak といった細胞内シグナル伝達系分子を介して細胞の遊走を促し、創傷治癒にかかわると考えられる。母体血と直接接し栄養ガス交換に関与する障害を受けた胎盤絨毛細胞の自発的修復の制御機構、並びにその修復障害について細胞内シグナル伝達系の異常に注目し、その機序について解明することを目的とする。

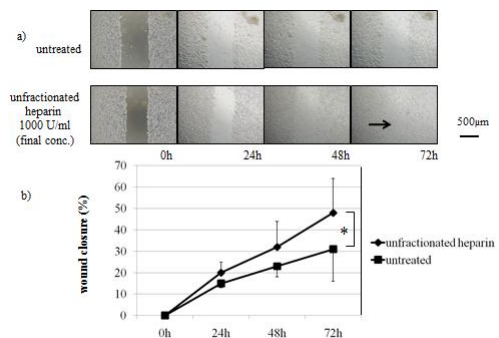
## 3. 研究の方法

1) 6 穴培養プレートに胎盤由来ヒト不死化細胞 TCL-1 細胞を播種、フルシートののち 24 時間無血清培養を行い、heparin 存在下、抗ヒト CD44 多クローン抗体、siRNA CD44 を添加し、各種条件で in vitro scratch assay をおこなった。0 時間、6 時間、12 時間、24 時間での経時的閉創率を画像解析 software を用いて検討した。2) Western blot (WB) 法により TCL-1 細胞膜上の CD9、cytokeratin-7、CD44、CD44v3、syndecan-4、EGF 受容体、HGF 受容体、FGF 受容体の発現を検討した。3) heparin/HS 並び scratch による PAK1 リン酸化、及び抗 CD44v3 抗体存在下でのヘパリン誘発 PAK1 リン酸化を、リン酸化 PAK1(Thr423)ならびにリン酸化 PAK1(Ser199/204)に対する多クローン抗体を用いて WB 法により検討した。4) Lipofectamine 法による siRNA CD44 処理後、TCL-1 細胞における CD44 経時的発現を MultiGauge software を用いて検討した。用いた CD44 target sequence は

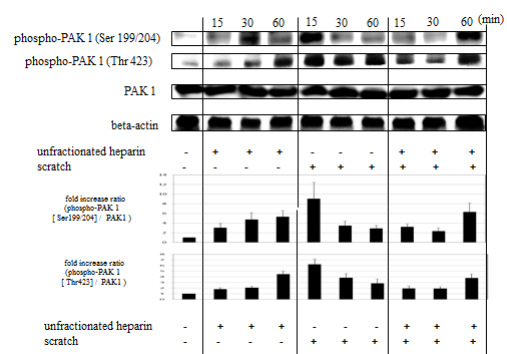
(5'-AATATAACCTGCCGCTTTGCA-3')、と a scrambled sequence (5'-AAGAGAAATCGAAACCGAAAA-3') である。5) TCL-1 細胞に in vitro scratch を加えたのち、heparin/HS 存在下で経時的に CD44 発現の変化を免疫組織染色法により検討した。統計は Student's t-test、repeated measure ANOVA を用いて検定した。

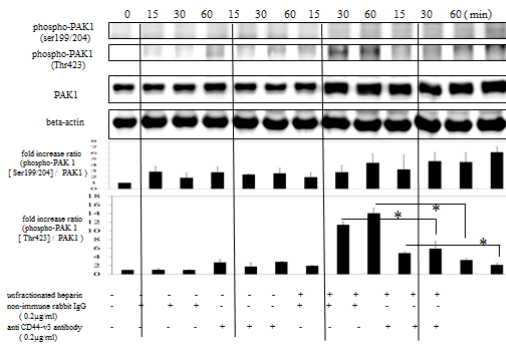
## 4. 研究成果

1) heparin/HS 存在下で閉創率がコントロール（無添加）と比較して有意に上昇した。一方、抗ヒト CD44 多クローン抗体または siRNA CD44 存在下では、Heparin/HS 存在下での閉創率と比較して有意に低下していた。

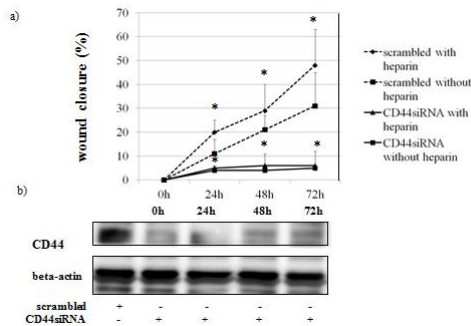


2) CD9、cytokeratin-7、CD44、CD44v3、EGF 受容体の発現を認めるも syndecan-4、HGF 受容体、FGF 受容体の発現を認めなかった。3) Heparin/HS 並び scratch による PAK1 リン酸化 (Ser199/204 および Thr423) を認めた。抗 CD44v3 抗体存在下でヘパリン誘発 PAK1 リン酸化(Thr423)は抑制された。





4) siRNA CD44 感染 TCL-1 細胞は CD44 発現が抑制された。



5) heparin/HS 存在下では非存在下と比較して scratch 部位での CD44 発現の増加が有意に認められた。

以上より絨毛細胞が heparin/HS により他の増殖因子のシグナリングを直接的には介さず、CD44v3 を介して細胞移動を促進し組織修復を行うことを示した。こうした機序の検討は heparin が絨毛細胞構築の機械的損傷に対し、遊走能を亢進し創閉鎖を促すことで構築の再生に關与する可能性を基礎的に示したといえる。

## 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 2 件)

- ① Heparin/heparan sulfate/CD44-v3 enhances cell migration in term placenta-derived immortalized human trophoblast cells. Suga N, Sugimura M, Kshiishi T, Yorifuji T, Makino S, Takeda S. Biol. Reprod. 134; 1-8 2012
- ② Inagaki T, Makino S, Yorifuji T, Sugimura

M, Takeda S. Effectiveness of heparin during long-term tocolysis ISRN Obstet Gynecol.

27:650532. 2013

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉村 基 (Motoi Sugimura)

浜松医科大学医学部・教授

研究者番号: 30273189

### (2) 研究分担者

田中利隆 (Toshitaka Tanak)

順天堂大学医学部准教授

研究者番号: 30407283

牧野真太郎 (Shintaro Makino)

順天堂大学医学部准教授

研究者番号: 70570894

依藤崇志 (Takasi Yorifuji)

順天堂大学医学部助教

研究者番号: 10597058