

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：13201
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23791817
 研究課題名（和文）妊娠高血圧症候群とオートファジー—新視点から絨毛外栄養膜細胞浸潤不全を解明する
 研究課題名（英文） Preeclampsia and autophagy- a new perspective for invasion failure of extravillous trophoblast
 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(医学)・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(sENG)は妊娠高血圧症候群(PE)の血清中で増加し、抗血管新生作用をもつことが知られている。本研究により絨毛外栄養膜細胞(EVT)細胞における低酸素下でのオートファジー活性化を、sENGが抑制することがわかった。また、p62タンパクはオートファジー欠損株において蓄積を示し、PEにおけるEVT細胞においてもp62の蓄積を認めたことから、sENGはEVTのオートファジー抑制を介して、胎盤形成不全の一因になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Soluble endoglin, which antagonizes vascularization, is elevated in serum in preeclamptic women. This study showed soluble endoglin inhibited hypoxia-induced autophagy in extravillous trophoblasts. Additionally, p62 protein, which is a selective protein degraded by autophagosome, accumulated in extravillous trophoblasts in placental bed biopsy samples of preeclampsia as well as autophagy-deficient EVT cell lines. Taken together, soluble endoglin-mediated autophagy inhibition in extravillous trophoblast was involved in pathophysiology of preeclampsia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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

妊娠高血圧症候群(PE)の病態生理として 2step theory が有力で、初期に絨毛外トロホブラスト(EVT)が浸潤不全を起こし、後期で可溶性 Endoglin(sENG)および可溶性 Flt-1 を介して血

管内皮障害が引き起こすとされる。筆者らは、オートファジー (AtP) 欠損 EVT を作製し、低酸素下における EVT 浸潤能亢進に AtP が必須であることを証明した。これまで、可溶性 Endoglin および可溶性 Flt-1 が PIH 発症に関与することが報告

されているが、その機序は血管新生の抑制メカニズムのみであった。本研究では、sENG, sFlt-1 および PE 関連サイトカインが EVT における AtP に如何に作用するかを明らかにすることで、今までにない新しい観点で PIH 病態解明を目指すものである。

2. 研究の目的

低酸素下における EVT 浸潤能に必須である AtP が PE 関連因子 (sENG および sFlt-1, TNF- α , TGF- β 等) によって影響を受けるのか? また、影響が出た場合には胎盤形成に必須である EVT 機能 (浸潤および血管リモデリング) に如何なる影響を与えるのか? を検討する。さらに、それを発展させ実際の PE 胎盤におけるオートファジーの役割および PE 関連因子の影響を明らかにすることを最終目的とした。

3. 研究の方法

1) In vitro 実験系: EVT 欠損セルライン 2 種類における サイトカイン等によるオートファジーへの影響の検討

PE 発症に関わるサイトカインや血管障害因子 (TGF- β , TNF- α , sEndoglin, sFlt-1) を作用させ、オートファジーの活性を LC3 ドット数 (AtP 活性化でドット数増加) およびウエスタンブロットによる LC3-II/LC3-I 比 (AtP 活性化で比が増加) で評価する。

2) in vitro EVT 機能評価

EVT 浸潤能は Invasion chamber を用い、浸潤細胞数にて評価を行った。血管リモデリング能はマトリゲル上での HUVEC 細胞共培養モデルにて検討し、HUVEC (緑色色素) から EVT セルライン (赤色色素) への置換率で評価した。

3) in vitro 病態モデルへ EVT 浸潤能の評価法として、実際の脱落膜に類似した環境としてマトリゲル内への浸潤にて評価した。Invasion chamber と違い、EVT 細胞の浸潤の深さを 3 次

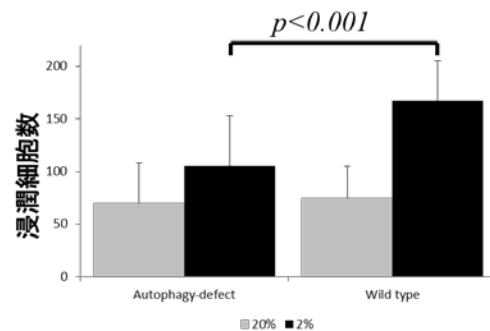
元で評価することで、EVT 浸潤を数ではなく深さで評価できる点が新しい点である。

4) in vitro 病態モデルから in vivo へ 筆者らは、これまで流産検体において浸潤表層の細胞と比較し、深層まで浸潤した EVT 細胞に AtP (LC3 の発現を用いて) 発生が観察される結果を免疫組織学的に確認してきたが、今回 p62 (AtP 抑制にて細胞質内に蓄積する) 染色により、妊娠中期あるいは後期の妊娠高血圧症候群、IUGR, 常位胎盤早期剥離などの胎盤床 EVT における、AtP 活性を評価した。

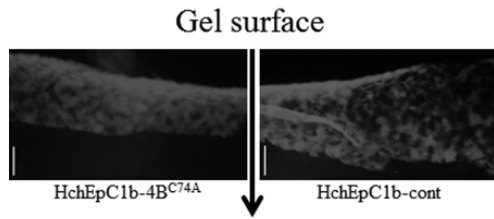
4. 研究成果

1. 絨毛外栄養膜細胞浸潤におけるオートファジーの役割

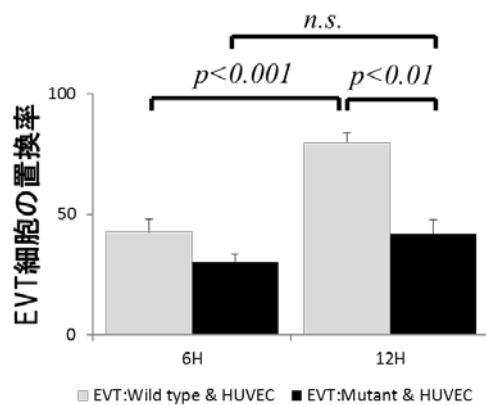
まず初めに Primary EVT 細胞が生理的低酸素 (約 2% 酸素) 下において、オートファジーが活性化することを確認した。次に、ATG4B 遺伝子変異体を発現するレトロウイルスベクター (大阪大学 吉森保教授より分与) を導入することで、恒常的オートファジー欠損 EVT セルライン (以下、AtP 欠損細胞) を作成した。その結果、以下に示すように通常のオートファジーが起こる細胞 (以下、野生型細胞) では 20% 酸素と比較し 2% 酸素刺激によって、浸潤能が亢進するのに対し、AtP 欠損細胞では 2% 酸素刺激による浸潤細胞数が有意に減少することが分かった。



同様に浸潤の深さを 3 次元培養にて評価したところ (下写真)、AtP 欠損細胞では 2% 酸素下での浸潤深度が野生型に比し有意に減少することが分かった。



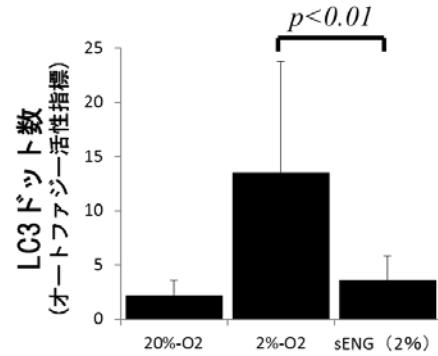
また、血管リモデリング能を評価したところ、図5Bの如く、EVTによるHUVEC細胞の置換率(12時間)は、AtP 欠損細胞において有意に低下することが明らかとなった。



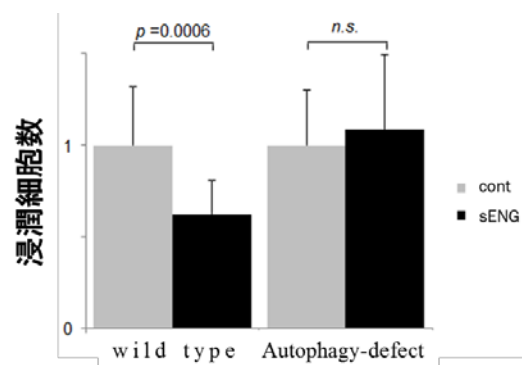
これらのことは、低酸素刺激によって活性化されるEVT機能(浸潤、血管リモデリング)にオートファジーが重要な役割を持つことを示している。

2. 可溶性エンドグリン(sENG)によるオートファジー抑制と臨床病態への影響

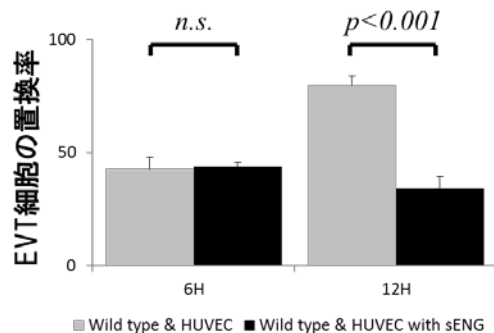
PEとオートファジーの関係を検討するため、PE関連因子(TNF- α 、TGF- β 、可溶性エンドグリン、可溶性Flt-1)のオートファジーへの影響を検討した。



上図の如く、野生型細胞におけるオートファジーは低酸素で活性化したが、sENG存在下で有意にオートファジーが抑制された。機能解析において、



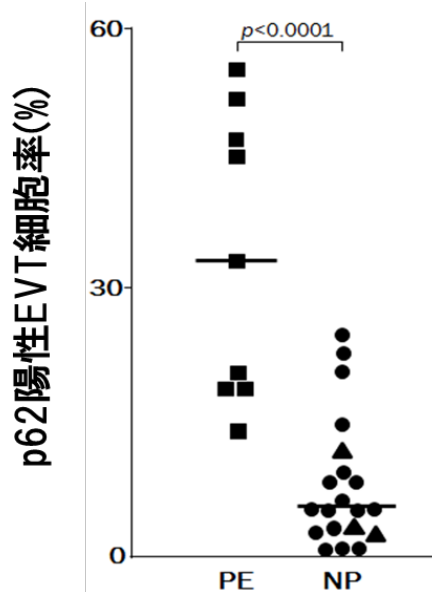
低酸素下で亢進する野生型細胞のEVT浸潤は、低酸素下sENG存在下では、浸潤が有意に抑制された(上図左)。一方で、AtP欠損細胞の浸潤にsENGは影響を与えなかった(上図右)。



さらに、野生型細胞の血管リモデリングは、sENG存在下で有意に抑制された(上図)。

次に、臨床検体とオートファジーの関与を検討するため、胎盤床(胎盤が付着している子宮筋層)のEVT細胞におけるp62タンパク発現を検討した。p62はオートファジーによって分解さ

れる基質で、オートファジー抑制により蓄積する。その発現を解析したところ、PE 症例の EVT における p62 陽性細胞率は、正常妊娠に比し有意に高値を示した。



これは、PE の EVT 細胞においてオートファジーが抑制されていることを間接的に示唆している。尚、Villous trophoblast では、このような差異は認められなかった。

PE の病態形成は、様々な因子が関与すると考えられている。その中で、第二ステップに関しては、近年血管新生阻害因子が非常に注目され、それらが原因であることが明らかとなってきた。一方で、第一ステップは胎盤形成に重要と言われながらも、不明な点が多かった。今回の検討の結果、オートファジーが第一ステップに関与することが明らかとなった

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 8 件)

1. Nakashima A, Yamanaka-Tatematsu M, Fujita N, Koizumi K, Shima T, Yoshida T, Nikaido T, Okamoto A, Yoshimori T, Saito S. “Impaired autophagy by soluble endoglin,

under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia.” *Autophagy*. 9:303-316, 2013 :査読 : 有

2. Saito S, Nakashima A. “Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia” *Placenta, Trophoblast Research*, 27:S79-S84 2013:査読 : 有

3. Saito S, Shima T, Inada K, Nakashima A. „Which Types of Regulatory T cells Play Important Roles in Implantation and Pregnancy Maintenance? “ *Am J Reprod Immunol*. 69:340-305, 2013 :査読 : 有

4. Inada K, Shima T, Nakashima A, Aoki K, Ito M, Saito S. “ Characterization of regulatory T cells in decidua of

miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content. “ *J Reprod Immunol*. 97:104-111, 2013 :査読 : 有

5. 中島彰俊、島友子、稲田貢三子、塩崎有宏、斎藤滋 “可溶性エンドグリンによるオートファジー抑制を介した妊娠高血圧症候群発症への関与” *腎と透析*, 73(5):701-706, 2012:査読 : 無

6. 斎藤滋、島友子、中島彰俊 “制御性T細胞、制御性NK細胞からみた妊娠維持機構” *Jpn. J. Clin. Immunol.*, 35(5):424-428, 2012:査読 : 有

7. Saito S, Nakashima A. Shima T. “Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies” *J Reprod Immunol*. 90:91-95, 2011 :査読 : 有

8. Saito S, Nakashima A, Ito M and Shima T. “Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology” *Expert Clin*

Immunol 7:649-657, 2011:査読：有

[学会発表] (計 11 件)

1. シンポジウム “胎児の発育異常 (overgrowthやFGR)の取り扱い” 「胎児発育遅延および妊娠高血圧症候群胎盤床ではオートファジーの活性化に違いを認める」 中島彰俊、島友子、稲田貢三子、塩崎有宏、齋藤滋 第36回日本産科婦人科栄養・代謝研究会 鹿児島 H24/8/23-8/24
2. シンポジウム “PIHとBasic Scienceの接点について” 「可溶性エンドリンによるオートファジーを介した妊娠高血圧症候群発症への関与」 中島彰俊、島友子、稲田貢三子、塩崎有宏、齋藤滋 第22回 腎と妊娠研究会 東京 東京国際交流館 H24/2/25
3. シンポジウム “生殖医学研究に役立つニューコンセプト・ニューテクノロジー” 「オートファジー抑制による胎盤形成不全：妊娠高血圧症候群と胎児発育遅延の差異の検討」 中島彰俊、島友子、稲田貢三子、塩崎有宏、齋藤滋 第27回 日本生殖免疫学会 大阪 大阪医科大学 H24/12/8-9
4. 「Preeclampsiaの胎盤形成不全には可溶性エンドリンを介したトロホブラストのオートファジー抑制が関与する」 中島彰俊、島友子、稲田貢三子、塩崎有宏、齋藤滋 第64回 日本産科婦人科学会学術講演会 神戸 神戸ポートピアホテル H24/4/13-15
5. “ Soluble endoglin inhibits EVT functions via autophagy under hypoxia, resulting in preeclampsia”
International Federation of Placenta Associations 2012, Hiroshima, Japan, Sep 17th-21th, 2012
A. Nakashima, T. Shima, K. Inada and S. Saito
6. 「可溶性エンドリンによるオートファジーを介し

- た胎盤形成不全への関与」中島彰俊、島友子、稲田貢三子、齋藤滋 第16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 平成23年8月26日～27日
7. シンポジウム「流産の原因と対策」免疫学的異常による流産原因の解明 中島彰俊 第63回 日本産科婦人科学会学術講演会 大阪 大阪国際会議場 平成23年8月29日～31日
 8. シンポジウム「細胞内ロジスティックスの融合研究」オートファジーの胎盤形成および妊娠高血圧症候群への関与 中島彰俊、島友子、稲田貢三子、齋藤滋 第84回 日本生化学会大会 京都 京都国際会館 平成23年9月21日～24日
 9. シンポジウム「胎盤にかかわる免疫の関与」オートファジーから見た胎盤形成と妊娠高血圧症候群との関連性 中島彰俊、島友子、稲田貢三子、齋藤滋 第19回 日本胎盤学会学術集会 東京 東京ステーションコンファレンス 平成23年9月30日～10月1日
 10. “可溶性エンドリンによるオートファジー抑制を介した妊娠高血圧症候群発症への関与” 学術奨励賞 中島彰俊、島友子、稲田貢三子、齋藤滋 第32回 日本妊娠高血圧学会 石川 金沢歌劇座 平成23年10月21日～10月22日
 11. Symposium “ The balance of immune system between Treg cells and NK cells in spontaneous abortion “ Nakashima A., Shima T., Inada K., Saito S.. American Society for Reproductive Immunology, The First Clinical Reproductive Immunology Symposium. Providence, RI, USA. November 18-20, 2011
- [その他]
ホームページ等
なし

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(医学)・
助教

研究者番号：00436792

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし