

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592470

研究課題名(和文) 絨毛細胞による母体らせん動脈の浸潤機構の解明—母体血小板に着目して—

研究課題名(英文) Possible mechanism of remodeling of maternal spiral artery by trophoblast

研究代表者

佐藤 幸保 (Yukiyasu, Sato)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：00508236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究の目的は、ヒト着床部位でおこる絨毛外トロホプラスト(EVT)による母体血管リモデリングの分子機構を明らかにすることである。今回、CD9およびCD59の発現が母体血管を浸潤するEVT(eEVT)に強発現していることが明らかとなり、EVT不活化細胞株であるSwan71、絨毛癌細胞株BeWoを用いて機能解析を行った。

CD9については、ノックダウンによりSwan71細胞の管腔形成能が抑制されたことより、eEVTによる母体血管内皮置換に関与している可能性が示唆された。CD59については、Swan71細胞では強発現し、BeWoで発現していないこと以外、まだ有意な結果を得られていない。

研究成果の概要(英文)：Purpose of our research is to elucidate possible mechanism of maternal vascular remodeling by extravillous trophoblast (EVT) that takes place at human implantation sites. Here, we demonstrated that both CD9 and CD59 are highly and specifically expressed on EVT invading maternal vessels (eEVT). Accordingly, functional experiments were carried out using immotile EVT cells (Swan71) and choriocarcinoma cell line (BeWo).

As for CD9, knock down of this molecule inhibited lumen formation in Swan71, suggesting that CD9 is involved in the replacement of maternal endothelium by eEVT. As for CD59, we found that Swan71 but not BeWo expresses this molecule, and further experiments are currently in progress.

研究分野：生殖医学

キーワード：絨毛外トロホプラスト 母体血管リモデリング 血管内トロホプラスト

1. 研究開始当初の背景

ヒト胎盤において、絨毛は絨毛間腔に浮かぶ浮遊絨毛と母体面と接着する付着絨毛とに分類される。浮遊絨毛では trophoblast の幹細胞である cytotrophoblast (CTB) が細胞融合 (合胞体化) して、syncytiotrophoblast (STB) に分化する。一方、付着絨毛では CTB は重層化し、cell column を形成する。Cell column 内で CTB は浸潤能をもつ extravillous trophoblast (EVT) へと分化し、母体脱落膜 (interstitial trophoblast (iEVT)) および母体らせん動脈 (endovascular trophoblast (eEVT)) へと浸潤していく。eEVT の浸潤により母体らせん動脈は再構築され、血管径が増大し、種々の血管作動物質への反応性を失う。広範な母体らせん動脈の再構築 (母体血管リモデリング) は霊長類に特異的な現象であり、正常な胎児発育に必要な絨毛間腔への血流確保に不可欠とされる。

2. 研究の目的

eEVT による母体血管リモデリングの分子機構を明らかにすること

3. 研究の方法

母体血管リモデリングの分子機構を明らかにするために、まずは eEVT に特異的に高発現している分子を見出すことが重要と考えた。本研究代表者は、母体血小板と妊娠初期絨毛の器官培養より分離した EVT (分離 EVT) とを *in vitro* で共培養することにより、分離 EVT が *in vivo* の eEVT 様の形態変化を誘導することを見出した。平成 21-23 年度基盤研究 (C) 「母体血小板と絨毛細胞の相互作用: PIH、IUGR の病因解明をめざして」では、microarray 法を用いることにより、これら eEVT 様細胞に高発現している分子が明らかとなった。これらのうち細胞表面に発現している分子にしぼって、ヒト着床部位における発現を免疫組織染色により解析し、*in vivo* の eEVT でも高発現している分子 (eEVT マーカー) を選別した。Melanoma cell adhesion molecule (MCAM)、CD9、CD59 などが新しい eEVT マーカーとして同定された。このうち MCAM は、すでに EVT の浸潤を促進する分子であることが報告されており、CD9 および CD59 について解析を行うこととした。

4. 研究成果

CD9 について

ヒト着床部位における CD9 の発現を免疫組

織染色で調べたところ、CTB、STB、cell column および iEVT にはほとんど発現していなかったが、eEVT に強い発現を認めた。EVT を不活化した Swan71 細胞を用いてその機能解析を行い、CD9 が浸潤抑制に働いている可能性が明らかとなった。Swan71 細胞を低酸素下で培養すると CD9 の発現が減少した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)) と Swan71 細胞を共培養することで、Swan71 細胞の CD9 の発現が増加した。レンチウイルスを用いた shRNA 導入により CD9 がノックダウンされた Swan71 細胞と HUVEC とを共培養し、それぞれの細胞動態を観察した。CD9 をノックダウンされた Swan71 細胞では明らかな形態変化は認めなかったが、CTR shRNA を導入した Swan71 細胞および shRNA を導入していない Swan71 細胞では、Swan71 細胞が管状構造 (血管様構造) を形成することが観察された。以上より、eEVT に後発現する CD9 が母体血管リモデリングを促進している可能性が示唆された。現在、この知見について論文を作成中である。

CD59 について

補体は母体の自然免疫機構の一つである。補体は、古典経路・副経路・レクチン経路により活性化され、最終的に細胞表面に膜侵襲複合体を形成し、細胞溶解により細胞死をもたらす。CD59 はこの補体経路の最終産物である膜侵襲複合体の形成を阻害することが知られている。

ヒト着床部位における CD59 の発現を免疫組織染色で調べたところ、CTB、cell column および iEVT にはほとんど発現していなかったが、STB および eEVT に強い発現を認めた。分離 EVT、Swan71 細胞および絨毛癌細胞株 (JEG、JAR、BeWo) における CD59 の発現を調べたところ、分離 EVT および Swan71 細胞には CD59 の発現が確認されたが、JEG、JAR、BeWo では CD59 の発現をほとんど認めなかった。CD59 の発現のない細胞では、補体活性化により細胞溶解が進み、生細胞数が減少するのではないかと予想していたが、分離 EVT、Swan71 細胞、BeWo 細胞をそれぞれ、ヒト血清加熱群 (補体なし) あるいは非加熱群 (補体有り) の存在下に培養し、生細胞数の WST assay で評価したが、すべての細胞において生細胞数に有意差を認めなかった。以上より、通常の培養環境下では、補体による細胞障害を受けにくい可能性が示唆された。今後は、生細胞数は補体の影響 (細胞溶解) に加えて細胞増殖も影響するため、まずは補体の影響

を直接評価するアポトーシス解析を行う予定としている。加えて、実際に膜侵襲複合体が細胞表面に生じているかどうかを評価するべく、抗 C9 抗体による免疫染色を予定している。

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6件)

1. Sato Y, Fujiwara H and Konishi I. Mechanism of maternal vascular remodeling during human pregnancy. *Reprod Med Biol.* 2012;11(1):27-36.
2. Horie A, Fujiwara H, Sato Y, Suginami K, Matsumoto H, Maruyama M, Konishi I and Hattori A. Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1267-76.
3. Takahashi H, Takizawa T, Matsubara S, Ohkuchi A, Kuwata T, Usui R, Matsumoto H, Sato Y, Fujiwara H, Okamoto A, Suzuki M, Takizawa T. Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction. *Placenta.* 2014 Mar;35(3):163-70
4. Maruyama S, Sato Y, Satake Y, Mise H, Kim T. Diffusion-Weighted MRI and FDG-PET in Diagnosis of Endometrial Stromal Nodule. Case reports in obstetrics and gynecology 2015;2015:540283.
5. Mizugishi K, Inoue T, Hatayama H, Bielawski J, Pierce JS, Sato Y, et al. Sphingolipid Pathway Regulates Innate Immune Responses at the Fetomaternal Interface during Pregnancy. *The Journal of biological chemistry* 2015 Jan 23;290(4):2053-68.
6. Sakae C, Sato Y, Taga A, Satake Y, Emoto I, Maruyama S, et al. Ultrasound guided percutaneous cyst aspiration unnecessitates laparoscopic untwisting of ovarian torsion -a case of hyperreactio luteinalis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015 Mar 23.

〔学会発表〕(計6件)

1. 第 64 回日本産科婦人科学術講演会 平成 24 年 4 月 13 日～4 月 15 日 専攻医教育プログラム「多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)」 佐藤 幸保
2. 第 65 回日本産科婦人科学術講演会 平成 25 年 5 月 10 日～5 月 12 日 松本久宣、藤原 浩、佐藤幸保、杉並 興、谷 洋彦、堀江昭史、小西郁生 ワークショップ「妊娠成立と維持」CD9 はヒト extravillous trophoblast の浸潤制御因子である。
3. 第 21 回日本胎盤学会 平成 25 年 10 月 25 日～10 月 26 日 松本久宣、宮崎有美子、谷 洋彦、杉並 興、堀江昭史、佐藤幸保、小西郁生、藤原 浩 CD9 は ヒ ト extravillous trophoblast の浸潤抑制因子である。
4. 第 59 回日本生殖医学会学術講演会 平成 26 年 12 月 4 日 着床期子宮内膜における versican の発現とその機能に関する検討 宮崎有美子、堀江昭史、佐藤幸保、杉並 興、谷 洋彦、上田 匡、小西郁生
5. 第 59 回日本生殖医学会学術講演会 平成 26 年 12 月 4-5 日 子宮内膜症女性の正常腹膜では extracellular matrix の構成成分である versican の発現が増強している 谷 洋彦、堀江昭史、佐藤幸保、杉並 興、宮崎有美子、上田 匡、小西郁生
6. 第 36 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 平成 27 年 1 月 25 日 子宮内膜症の腹膜病変の形成における versican の役割とその制御因子の検討 谷 洋彦、堀江昭史、杉並 興、宮崎有美子、上田 匡、佐藤幸保、小西郁生

〔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〕 特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 幸保 (SATO, Yukiyasu)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：00508236

(2)研究分担者

藤原 浩 (FUJIWARA, Hiroshi)
金沢大学・医学研究科・教授
研究者番号：30252456

(3)連携研究者

堀江 昭史 (HORIE, Akihito)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：30535836