

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461655

研究課題名(和文) 胎児胎盤羊膜系の母児連関に關与する因子と作用機構の解明

研究課題名(英文) Fetoplacental factors involved in feto-maternal communications: who and how

研究代表者

石本 人士 (ISHIMOTO, Hitoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10212937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：表題の候補因子として胎児特異的に発現するmidkine(MK)に着目し以下の結果を得た。MK蛋白質は妊娠初期の合胞体及び絨毛外栄養膜細胞に局在する、BeWo細胞で細胞融合に關与するSyncytin-2のmRNA発現をMKは用量依存性に増加し、syncytinsと同様にMKもcAMPの発現制御下にある、MK発現抑制とMK添加した絨毛細胞株の網羅的解析でMKが制御する遺伝子候補を同定した、ヒト胎児副腎皮質細胞モデル(NCI-H295A)では、MK添加で初代培養細胞と同様の増殖促進が見られたが、HSD3B2発現は抑制されず、これらの細胞でのMKシグナル経路の差異を反映していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In search for factors involved in feto-maternal communications, we studied on midkine (MK) that shows fetus-specific expression. Obtained data is as follows: 1) in contrast to mice, human placental MK mRNA and immunoreactive MK intensity showed the highest level in the first trimester and decreased dramatically thereafter. MK was localized to syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts; 2) in BeWo cells, MK significantly increased syncytin-2 mRNA, but not that of syncytin-1, and cAMP induced MK as well as the syncytins; 3) DNA microarrays and RNA-seq on MK-silenced JEG-3 and MK-treated BeWo cells identified novel genes likely induced or suppressed by MK; and 4) in NCI-H295A cells, MK did not decrease HSD3B2 mRNA, as opposed to fetal adrenocortical cells, but exerted similar proliferative effects. As we also observed a differential expression of putative MK receptors, the above-mentioned differential responses to MK likely reflect different MK signaling pathways.

研究分野：周産期医学、胎児内分泌学

キーワード：胎児シグナル 栄養膜細胞 midkine コルチゾール 妊娠維持機構

1. 研究開始当初の背景

早産の予知・防止は今日の周産期学が抱える最大の課題であり、解決のために分娩発来機構やその裏返しである妊娠維持機構の解明が不可欠だが、未だ道半ばである。妊娠維持や分娩発来は母体側要素のみがきっかけとなって起こる現象ではなく、胎児が関わる部分も大きい。1964年に Diczfalusy らが提唱した胎児胎盤系の概念は、妊娠維持が胎児と母体の共同作業であることを示すもので広く受け入れられている。ヒト胎盤は大量のエストロゲンを産生するが、酵素欠損のため *de novo* 産生ができず、前駆体である DHEA/DHEAS が胎児と母体(胎児>母体)から供給される。胎児胎盤系は当初このような胎児胎盤の一方の関連性を述べる概念であったが、近年は次第に双方向性のやりとりを示すコミュニケーションの場と考えられるようになった。例えば、分娩発来には胎盤由来 CRH の役割が重要であることが McLean の報告 (Nat Med, 1995) 以来定着しつつある。胎盤の CRH 産生は胎児副腎由来のコルチゾールにより paradoxical に促進される。さらに Jaffe らは CRH が直接胎児副腎に働き、DHEAS やコルチゾール産生を促進することを示した。すなわち胎盤 CRH 産生と胎児副腎コルチゾール産生の間には双方向性の positive-feedback 機構が成立することとなり、これが分娩発来の trigger となり得る。

一方、胎児胎盤系に加え羊膜も母体と胎児の接点として注目されている。本邦では佐川らにより (日産婦雑誌, 1994) 羊水中胎児由来物質の妊娠維持への関与を示唆する成績が示されているが、近年 Condon らにより、マウス胎仔肺由来のサーファクタント蛋白 A が羊水中のマクロファージを刺激し羊膜を経て子宮へと遊走し IL-18 を産生、直接分娩発来のシグナルとなることが示された (PNAS, 2004)。また我々は、胎児特異的な発現を示す成長分化因子 Midkine (MK) が妊娠中期羊水中に高濃度存在し、羊水中濃度に相当する MK の添加で培養羊膜上皮細胞の COX2 の発現とプロスタグランジン E2 産生が抑制されることや胎児肺が羊水中 MK の産生源である可能性を示した (日産婦学会, 2012)。すなわち妊娠維持や分娩発来のシグナルの行き交うコミュニケーションの場は、胎児胎盤系の枠を超えて胎児胎盤羊膜系として捉えるべき概念へと発展しつつある。

本研究においては、胎児胎盤羊膜系における母児連関シグナルに関して未解決の問題にアプローチする。一つは胎児内におけるコルチゾール制御機構である。前述したようにコルチゾールは CRH の増加をもたらす分娩発来に関与する可能性があるが、一方でコルチゾールに代表される糖質コルチコイドは胎児にとっては「両刃の剣」であり、肺など胎児臓器の成熟を促進する反面、過剰に

働くことと胎児発育を抑制し、また将来の成人病発症に関わるなど胎児に不利に働く可能性が指摘されている。したがって胎児副腎におけるコルチゾール産生は、胎児にとって必要となる妊娠後期に至るまで抑制されているが、この機序の詳細は不明である。我々はこれまでにヒト胎児副腎の発達や機能について血管新生 (JCEM, 2006; JCEM, 2008)、層特異的発現蛋白 (JCEM, 2003; JCEM, 2006) などにつき理解を深めてきたが、前述した胎児特異的蛋白 MK は胎児副腎において極めて興味深い作用を示している。すなわち外層細胞 (= 前駆細胞のプール) 選択的に増殖活性を示す一方で (JCEM, 2006)、コルチゾール産生の key enzyme である HSD3B2 発現と胎児副腎の主要調節因子である ACTH の受容体 (ACTHR) の発現を抑制する。したがって MK はコルチゾール産生抑制機構の一端を担っている可能性がある。またこれは胎盤由来 CRH の胎児副腎に対する作用と拮抗するもので、いわば MK の妊娠維持作用を示すものと考えられる。しかし MK の外層細胞選択的増殖促進や HSD3B2 発現抑制作用のメカニズムは明らかでない。

母児連関シグナルの候補蛋白として知られるものは未だ僅かにすぎない。MK は胎児副腎のコルチゾール産生抑制をおこすと考えられるが、最近齧歯類では逆に胎児肺 MK の発現がコルチゾールにより抑制されていることが示唆されており、まさにこの点からも MK は胎児胎盤羊膜系における母児連関を担う重要な分子候補と考えられる。

我々のこれまでの検討で MK は各胎児臓器により特徴的な妊娠経過中の発現変化を示すことが判明している。この差異は各臓器での MK の機能を反映しているはずだが、羊水中の MK が羊膜上皮細胞の COX2 発現を抑制すること以外に、胎児胎盤羊膜系の重要な構成要素(例えば胎盤)における MK の機能は今のところ不明である。妊娠後期胎盤において MK はほとんど発現していないことが知られていたが、我々の検討では妊娠初期に MK mRNA の高発現が認められた。しかし胎盤における MK の局在や機能については明らかでない。

2. 研究の目的

本研究が目指すのは胎児胎盤羊膜系の妊娠維持機構の母児連関に関わる分子の機能と作用機構の解明である

具体的には、予備的検討の成果を踏まえてまず MK から解析を進め、発現プロファイルや局在を明らかにし、また MK の機能については網羅的な発現差異解析方法を取り入れるなどして、広い視野から可能性のある機能について検討を行う。またヒト胎児副腎モデル細胞での細胞増殖促進作用や HSD3B2 発現抑制作用について解析を進める。

3. 研究の方法

臨床研究審査委員会の承認とインフォームドコンセントのもと、得られたヒト胎盤につ

いて発現プロファイル解析、局在の検討を RT-PCR、リアルタイム RT-PCR、免疫染色により行う。この結果に基づき研究を進展させ、各栄養膜細胞のモデル細胞株を用いて DNA マイクロアレイや RNAseq 解析など網羅的発現差異解析の手法も取り入れて MK の機能究明を目指す。

またヒト胎児副腎皮質細胞に対する MK の作用については、モデル細胞株である NCI-H295A 細胞を用いて細胞増殖や HSD3B2 発現に対する影響の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 胎盤における MK と受容体の発現

まずヒト胎盤における MK と受容体候補蛋白の発現と局在の検討、関連因子の発現プロファイルや MK による発現調節の検討を行った。その結果、MK 染色性は妊娠初期 > 中期 > 後期の発現パターンを示し、これまでに明らかにした mRNA レベルの推移と同様の結果を得た。この発現パターンは妊娠後期に MK 増加がみられるマウス胎盤とは異なっておりヒト特有の変化と考えられた。またヒト胎盤で MK 局在は主として妊娠初期の syncytiotrophoblasts (STB) に見られることが判明した。また extravillous trophoblasts (EVT) における局在も認められた。さらにヒト胎盤組織における MK 受容体候補蛋白の発現については、RT-PCR 法による検討で、少なくとも syndecan-1, syndecan-4, LRP1 の発現は認められた。しかし LRP6, NCAM1 の発現は明らかではなかった。

(2) CTB モデル (BeWo 細胞) を用いた検討

STB は隣接する細胞性 cytotrophoblast (CTB) が細胞融合により多核化し分化することにより形成される。そこで MK が STB に主に発現することから隣接する CTB に影響を与えているのではないかと考え、CTB のモデル細胞である BeWo 細胞を用いて検討した。近年 Syncytin-1, Syncytin-2 が CTB の細胞融合には、key regulator とされている。そこでまず MK が Syncytin-1 や Syncytin-2 の発現調節をしている可能性について検討した。BeWo 細胞を培養し rhMK を添加すると、Real-time RT-PCR による解析で、MK は Syncytin-2 の mRNA 発現を用量依存性に増加させたが、Syncytin-1 mRNA は変化させなかった。また BeWo 細胞においては cAMP 添加により細胞が融合し多核化することが知られ、STB 形成のモデルとして多くの研究で利用されている。またこの過程で、cAMP 添加は Syncytin-1 と Syncytin-2 の発現を増強させていることが知られ、cAMP の細胞融合作用の一部は Syncytin-1 と Syncytin-2 の発現増強を介しているものと考えられている。cAMP アナログである 8-Br-cAMP を BeWo 細胞に添加してみると、MK も syncytins と同様に cAMP の発現制御下にあることが判明した。したがって、我々は MK の妊娠初期絨毛における役割の一つの可能性に、MK が Syncytin-2 の発現増強を介して CTB が STB へと細胞融合・多

核化するプロセスを促進することがあるのではないかと考えている。

(3) NOTCH2 胎盤発現プロファイルの検討

MK 局在の特徴から関連性が疑われる因子として、新たな EVT マーカーである NOTCH2 に着目した。ヒト胎盤における NOTCH2 発現プロファイルは妊娠初期 > 後期の発現パターンを示しており、EVT の in vivo における活動性に矛盾しない結果であった。しかしこれまでのところ MK が NOTCH2 発現を調節する可能性については、JEG3 細胞を用いた検討では否定的である。

(4) 栄養膜細胞における MK の役割に関する検討: DNA マイクロアレイおよび RNAseq 解析による網羅的検討

これまでの検討の結果から MK 局在は STB の他、EVT における局在も認められた。これらの細胞での MK の機能は不明でありその手がかりを得るため、絨毛細胞株である BeWo 細胞、JEG-3 細胞を用いて MK 添加実験、一過性 MK 発現抑制実験を行い、次世代シーケンサーを用いた RNAseq 解析により網羅的解析を行った。BeWo 細胞に MK (100ng/uL) を添加した群とコントロール群で 2 倍以上の RNA 量変動があったのは micro RNA を含む 18 の遺伝子であり、産物が重金属解毒や抗酸化作用に関わる遺伝子が含まれていた。また JEG-3 細胞において siRNA により MK 蛋白発現を 20% に発現抑制すると、MK 発現抑制群とコントロール群で 2 倍以上の RNA 量変動があったのは、MK と micro RNA を含む 11 の遺伝子であり、前述の BeWo 細胞における MK 添加実験で 2 倍以上の RNA 量変動を示した二つの遺伝子が含まれ、BeWo 細胞実験と RNA 量は逆の挙動を示していた。

また MK 投与により発現が増減する遺伝子群について、JEG3 細胞株をモデルに DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、in silico 解析では 遺伝子産物が EVT マーカーと考えられる遺伝子などを抽出した。

以上のように、栄養膜細胞における MK の機能解明の手がかりとなる基礎的知見が得られた。

(5) ヒト胎児副腎モデル細胞株 (NCI-H295A 細胞) における MK の細胞増殖や HSD3B2 発現に対する影響の検討

MK はヒト胎児副腎皮質細胞の外層 (DZ) 細胞のみに増殖促進作用を示すが、NCI-H295A 細胞に対しても同様の増殖促進作用を示した。また MK は DZ 細胞に対し量依存的に HSD3B2 mRNA 発現を抑制するが、NCI-H295A 細胞ではこのような作用が認められなかった。また MK 受容体候補蛋白の mRNA 発現を検討すると、ヒト胎児副腎皮質細胞では発現している Versican and 4-integrin が NCI-H295A 細胞では発現していないことが示された。一方、LRP1 は両方で発現が認められた。以上より、NCI-H295A 細胞は MK の細胞増殖促進作用を検討する有用なモデルとなることが示唆された。また MK に対するヒト胎

児副腎皮質細胞とNCI-H295A細胞の反応性の相違は、MK受容体を含むMKシグナリングの差異を反映している可能性が高く、各々のMK作用の機序を理解する手がかりとなるものと考えられた。

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5件)

石本 人土: 黄体ホルモン補充療法による早産予防の理論的背景と問題点-子宮頸部・峽部に関する知見を中心に-. 産婦人科の実際 64(12)1927-1938, 2015(査読なし)

石本 人土: 子宮頸部の妊娠維持における役割~広汎性子宮頸部摘出術後妊娠から考える. 産婦人科の実際 64(12)1892, 2015(査読なし)

石本 人土: プロゲステロンとプロゲステンはどう違う?産婦人科の実際 64(12)1926, 2015(査読なし)

Asai S, Ishimoto H, Okuno S, Yabuno A, Asada H, Lin BL: Rectal injury associated with insertion of a vaginal delineator tube during total laparoscopic hysterectomy: A case report and review of the literature. Gynecology and Minimally Invasive Therapy 3: 54-56, 2014(査読あり)

亀谷美恵, 宮本あすか, 石本 人土, 和泉俊一郎エストロゲンと胎盤形成;新たな非ヒト霊長類コモンマーマセットを用いたヒト妊娠免疫モデルの提案. 比較内分泌学 40: 11-13, 2014(査読なし)

[学会発表](計4件)

石本 人土: 胎児を診る.第29回神奈川母性衛生学会(2016.2.6発表).ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)

Togo A, Kanno H, Narita A, Mitsuzuka K, Asai S, Nishimura O, Ishimoto H, Izumi S, Mikami M: Placental expression profile and regulation of midkine, a multifunctional growth/differentiation factor. 第67回日本産科婦人科学会学術講演会(2015.4.10発表). パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Togo A, Goto Y, Mitsuzuka K, Kanno H, Narita A, Asai S, Miyazawa M, Ishimoto H: Expression of midkine in the human placenta: a possible role for early placental development. IFFA 2014 Paris(国際胎盤学会)(2014.9.10発表), Paris (Paris, les Cordeliers), France

Ishimoto H, Minegishi K, Nishimura O, Sato S, Mitsuzuka K, Togo A, Jaffe RB: Effects of midkine in adrenocortical cells: differential responses in primary cells and a cell line. 95th Annual Meeting of the Endocrine Society (2013.6.4発表), San Francisco, CA, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

石本 人土 (ISHIMOTO, Hitoshi)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 10212937

(2)研究分担者

東郷 敦子 (TOGO, Atsuko)
東海大学・医学部・助教
研究者番号: 20408024

西村 修 (NISHIMURA, Osamu)
東海大学・医学部・助教
研究者番号: 80296657