

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670698

研究課題名(和文)胎盤におけるNeuregulin-1発現と胎児肺成熟促進作用に関する研究

研究課題名(英文)The expression of Neuregulin-1 in the placenta and its stimulating effect on fetal lung maturation

研究代表者

菊地 範彦(KIKUCHI, Norihiko)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：50447728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は胎盤絨毛内の血管内皮細胞でNeuregulin-1(NRG-1)が産生されていることを見出した。母体妊娠高血圧症候群症例(PIH群)と非PIH症例(非PIH群)で比較すると、NRG-1 1の蛋白発現はPIH群で有意に高かった。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)でのNRG-1 1蛋白発現は低酸素ほど増強していた。分娩時臍帯静脈血中NRG-1 1は母体PIH群が有意に高く、母体血中NRG-1 1もPIH群が高い傾向であった。以上から、PIHの臍帯-胎盤系では、胎盤絨毛内血管内皮細胞にNRG-1 1が強発現し、胎児に対する肺成熟促進に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found the production of NRG-1 1 in vascular endothelial cells of the placental villi. The expression of NRG-1 1 was compared between the patient's groups, with maternal pregnancy induced hypertension (PIH; PIH group) or without maternal PIH (non-PIH group), and was significantly higher in the PIH group than in the non-PIH group. Western blotting revealed that the expression of NRG-1 1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was enhanced by hypoxic condition. The blood NRG-1 1 level of umbilical vein collected at birth was significantly higher in PIH group than in non-PIH group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the maternal blood NRG-1 1 level was also higher in PIH group than in non-PIH group, but not significant. These findings suggest that NRG-1 1 is strongly expressed in vascular endothelial cells of placental villi and might be involved in fetal lung maturation.

研究分野：産婦人科学

キーワード：Neuregulin-1 胎児肺成熟 胎盤絨毛内血管内皮細胞 臍帯静脈血管内皮細胞 低酸素 妊娠高血圧症候群

## 1. 研究開始当初の背景

Neuregulin-1 は Epidermal growth factor (EGF) ファミリーに属する神経栄養因子のひとつであり、乳腺上皮細胞、グリア細胞、神経細胞、筋肉細胞などさまざまな細胞の増殖・分化・生存を活性化することが知られている。その生物学的な作用はレセプター型チロシンキナーゼの ErbB2, ErbB3, ErbB4 がリガンド結合によって二量体化してチロシンリン酸化から下流のシグナル経路を活性化することで発揮される。心臓では Neuregulin-1 は心内膜内皮と心臓組織内毛細血管内皮に限局して発現しており、ADAM ファミリーメタロプロテアーゼの作用により内皮細胞から切断されて、近傍の心筋細胞に発現する ErbB 受容体へパラクライン作用を発揮する (Pentassuglia L et al, Exp Cell Res 2009)。さらに心内膜や冠動脈血管内皮細胞から放出されている Neuregulin が、低酸素環境で虚血に陥った心筋細胞をレセプターである erbB2、erbB3 (ヘテロ二量体を形成) を介して保護する働きを持っていることも示唆されている (Hedhli N et al, Circulation 2011)。また精神神経学的領域では、Neuregulin-1 は 8 番染色体領域にその遺伝子が存在しており、統合失調症発症のリスクに関連していることが発見されている (Stefansson H et al, Am J Hum Genet 2002)。一方 Christiane らは、胎児肺組織の fibroblast に Neuregulin-1 が発現しており、Neuregulin-1 は 型肺胞上皮細胞の erbB 受容体を介してサーファクタント産生を促すことで胎児肺成熟に関与していることを報告した (Christiane E et al, Am J Respir Crit Care Med 2003)。これまでに胎盤における Neuregulin-1 産生の有無、機能については全く報告されておらず、胎児 - 胎盤系での Neuregulin-1 の機能を明らかにすることで、胎児肺成熟を促進させる治療法の開発が可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胎盤における Neuregulin-1 の発現に着目し、発現の意義と機能を明らかにすることと、Neuregulin-1 の ErbB 受容体を介した胎児 - 胎盤系における意義を明らかにすることにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織サンプル

組織切片は、あらかじめ分娩前にインフォームドコンセントを得た後、分娩時に得られた胎盤・臍帯のホルマリン固定パラフィン包埋組織検体を用いた。母体 PIH (PIH 群) 胎盤 12 例、母体非 PIH (非 PIH 群) 胎盤 12 例 (いずれも妊娠 22 週 ~ 34 週) を検討に用いた。

### (2) 免疫染色

Neuregulin-1 (NRG-1) の発現を、

間接的酵素抗体法を用いて、免疫染色で検討した。NRG-1 に関しては胎盤幹絨毛内に認められる径 100  $\mu\text{m}$  以上の血管の内皮における発現に着目した。染色結果は陰性 = 0, 弱陽性 = 1, 強陽性 = 2 として 1 標本中 10 本の血管をカウントしてスコアリングした (0 - 20 点) 発現の統計学的有意差は Mann-Whitney U-test で検定した。また胎盤幹絨毛における ErbB2、ErbB3 蛋白発現を免疫組織化学的に検討した。

### (3) 正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における発現

正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を異なる酸素環境下 (21%、5%、2% 酸素下) で 72 時間培養し、HUVEC の蛋白を抽出して Western blotting で NRG-1 発現を比較した。

### (4) 分娩時臍帯血中における NRG-1 の定量

新たに血漿における NRG-1 の定量を当院・臨床検査部と協同で確立させた (ELISA 法; 図 1)。

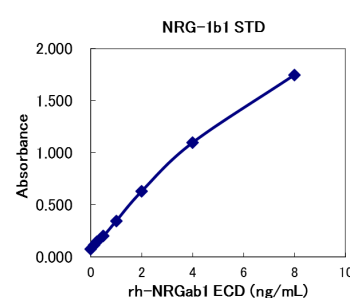


図 1 : NRG-1 定量 (ELISA 法)

あらかじめ分娩前にインフォームドコンセントを得た後、分娩時に採取した臍帯静脈血 (血漿) 中の NRG-1 を定量して PIH 群 21 例と非 PIH 群 31 例で比較した (妊娠 23 週 ~ 40 週)。統計学的有意差は Mann-Whitney U-test で検定した。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫染色結果

(ア) 胎盤幹絨毛内の血管内皮における NRG-1 の発現

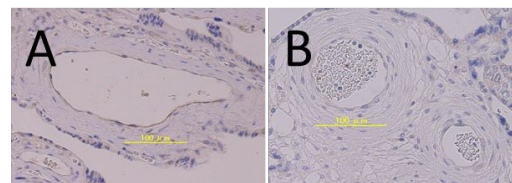


図 2 : NRG-1 免疫染色結果 A: 妊娠 23 週胎盤 (PIH 群) B: 妊娠 22 週胎盤 (非 PIH 群)

PIH 群胎盤幹絨毛内の血管内皮細胞に強く

NRG-1 1 染色を認める (図 2)。染色スコアは PIH 群が  $11.4 \pm 3.3$ 、非 PIH 群が  $7.9 \pm 2.1$  であり、PIH 群の方が有意に高く、NRG-1 1 発現が増強していた (図 3)。

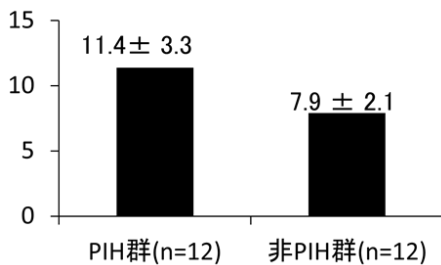


図 3 : NRG-1 1 染色スコア

(イ) 胎盤絨毛における NRG-1 1 受容体 ErbB2、ErbB3 蛋白発現

胎盤絨毛では、ErbB2 は合胞体性栄養膜細胞の絨毛間腔側表面に強く染色された (図 4)。一方、ErbB3 は合胞体性栄養膜細胞の細胞質から絨毛間腔側表面に強く染色された (図 5)。PIH 群と非 PIH 群で染色に差異は認められなかった。

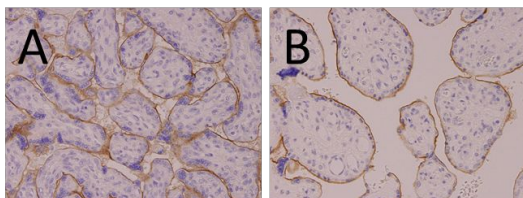


図 4 : ErbB2 免疫染色結果 A: 妊娠 28 週 PIH 群、B : 妊娠 28 週 非 PIH 群

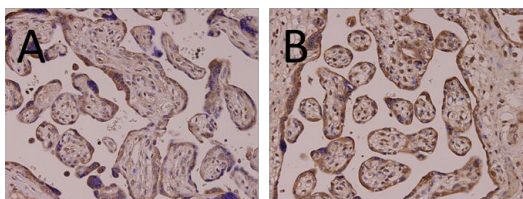


図 5 : ErbB3 免疫染色結果 A: 妊娠 28 週 PIH 群、B : 妊娠 30 週 非 PIH 群

(2) 正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における NRG-1 1 発現

Western blot で検討した、HUVEC での酸素濃度による NRG-1 1 蛋白発現は、21%酸素下よりも 5%酸素下さらには 2%酸素下で、より増強する傾向が認められた (図 6)。

(3) 分娩時臍帯血中における NRG-1 1 の定量

ELISA 法で検討した分娩時臍帯静脈血中の NRG-1 1 濃度は、母体 PIH 群が  $2.18 \pm 1.30$  ng/mL、非 PIH 群が  $1.33 \pm 0.73$  ng/mL であり、母体 PIH 群の方が有意に高値であった (図 7)。

(4) 母体血中における NRG-1 1

ELISA 法で検討した母体血中 NRG-1 1 濃度は、を PIH 群と非 PIH 群で比較したところ、PIH 群が  $1.15 \pm 1.11$  ng/mL、非 PIH 群  $0.19 \pm 0.18$  ng/mL と、PIH 群で高い傾向を認めた。

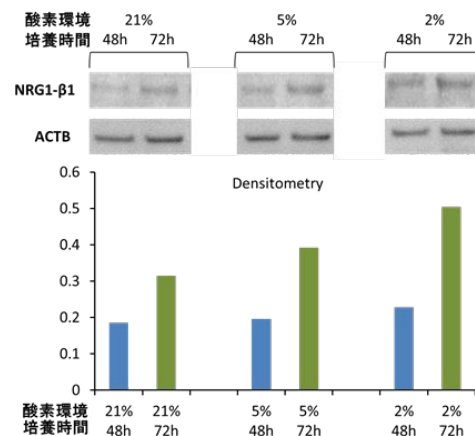


図 6 : HUVEC における NRG-1 1 発現 (Western blot)

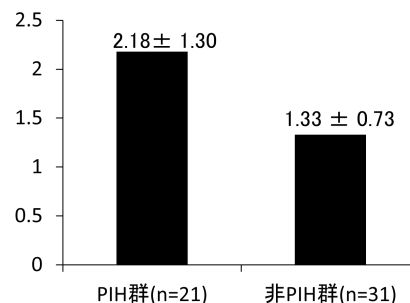


図 7 : 臍帯血中 NRG-1 1 値 (ELISA)

以上より、PIH に代表される低酸素環境の臍帯-胎盤系では、臍帯静脈血管内皮に NRG-1 1 が強発現し、胎児に対しては肺成熟促進に寄与している可能性が示唆された。また胎盤自身に対しては NRG-1 1 が低酸素環境下の絨毛細胞の保護に寄与している可能性が示唆された。

## 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)

1. 大平哲史、長野県および信州大学医学部附属病院における周産期医療の現状、長野医報 2014 年 619 号 50-53. 査読無
2. 牧内玲子、高津亜希子、石川香織、菊地範彦、大平哲史、金井誠、塩沢丹里、既往帝王切開後の経膈分娩試行 (TOLAC) 成功に関する因子の検討 信州医学雑誌 2014 年 62 号 p239-244. 査読有
3. 竹内穂高、大平哲史、大岡尚実、石川香織、古川哲平、田中恭子、高津亜希子、菊地範彦、金井誠、塩沢丹里。

Mycoplasma hominis が原因と推察された帝王切開後子宮感染の2例 関東連合産科婦人科学会誌 2014年51号 p491-496. 査読有

4. Kobara H, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kikuchi N, Ohira S, Shiozawa T. Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia. Placenta. 2013; 34: 1036-43. 査読有 doi: 10.1016/j.placenta.2013.08.004.
5. Ohira S, Ookubo N, Tanaka K, Takatsu A, Kobara H, Kikuchi N, Ohya A, Kanai M, Shiozawa T. Placental mesenchymal dysplasia: chronological observation of placental images during gestation and review of the literature. Gynecol Obstet Invest. 2013; 75: 217-23. 査読有 doi: 10.1159/000350661.

〔学会発表〕(計3件)

1. 大平哲史、塩沢丹里 . Epithelioid trophoblastic tumor . 2014年10月4日 第32回日本絨毛性疾患研究会ワークショップ(京都・京都大学内芝蘭会館)
1. 大平哲史、浅香亮一、小原久典、高津亜希子、菊地範彦、金井誠、塩沢丹里 . 妊娠高血圧症候群では臍帯および絨毛内の血管内皮に Neuregulin-1 1 が強発現する . 2014年10月3日 第22回日本胎盤学会 (京都・京都大学内芝蘭会館)
2. 大平哲史、浅香亮一、石川香織、古川哲平、小原久典、高津亜希子、菊地範彦、金井誠、塩沢丹里 . 妊娠高血圧症候群では臍帯静脈血管内皮に Neuregulin-1 1 が強発現する . 2014年4月20日 第66回日本産科婦人科学会 (東京・東京国際フォーラム)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

菊地 範彦 (KIKUCHI, Norihiko)  
信州大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号：50447728

##### (2)研究分担者

大平 哲史 (OHIRA, Satoshi)  
信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師  
研究者番号：90397315

塩沢 丹里 (SHIOZAWA, Tanri)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：20235493

(3)連携研究者：なし