

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861490

研究課題名(和文) ヒト絨毛外栄養膜細胞に特異的に発現する新規蛋白 laeverin の機能解析

研究課題名(英文) Evaluation of a novel amino peptidase Laeverin especially expressed on human extravillous trophoblast.

研究代表者

堀江 昭史 (HORIE, AKIHITO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30535836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：laeverinがligandとしてEVTから放出され、免疫細胞へ結合するかの検討を行い、リコンビナントlaeverin(rLVRN)により絨毛細胞の形態に変化を認め、免疫回避できる可能性が示唆された。さらに、laeverinが妊娠高血圧症候群を予知しうるマーカーとなりうるかELISA法を用いて妊婦血清を用いて検討を行ったが妊娠高血圧症候群患者では低下する傾向を認め、予知しうるマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We made the study of laeverin which was released from EVT and combined with immune cells. As recombinant laeverin altered the morphology of villous cells, we suspected laeverin was associated with the immunological escape mechanism. And we also evaluated the possibility of laeverin could be a prospective marker for the PIH. As we detected the declining trend for the laeverin serum level of PIH patients, we suspected laeverin would be the predictive marker.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：EVT 免疫回避 血清マーカー

1. 研究開始当初の背景

ヒトの胎盤形成過程において EVT によるラセン動脈の再構築が阻害されると妊娠高血圧症候群などの合併症が発症することが知られている。このため EVT の機能解析は浸潤の制御機構と母体免疫寛容の獲得機構という2つの視点から精力的に進められてきており、最近では免疫細胞が EVT の浸潤を制御している可能性も示されつつある。本研究申請者のグループはこれまで EVT の浸潤制御機構の解明を目指し、母体血管に侵入する EVT が chemokine 受容体 CCR1 を発現して ligand の RANTES がその浸潤を誘導すること、細胞膜結合型 peptidase である DPPIV が RANTES を細胞表面で分解して EVT の浸潤を抑制すること、さらに母体血管内で活性化した血小板が RANTES などの chemokine を放出して EVT の血管内浸潤を誘導している可能性を提示してきた (Sato et al. JCEM 2002; Development 2003; Blood 2005)。これらと並行してヒト EVT を認識する単クローン抗体を作成して認識する抗原分子の解析をおこなってきたが、その過程で EVT に特異的に発現している新規の分子である laeverin を同定した (Fujiwara et al., BBRC 2004)。その後の解析で laeverin が M1-family に属する新しい膜結合型 peptidase であり、新しい peptide 結合部位を霊長類以降の進化の過程で獲得していることが見出された (Maruyama et al. JBC 2007; JBC 2009)。さらに本研究申請者によって r-laeverin によって EVT の浸潤が促進されること (Horie et al., Hum Reprod 2012)、また dendritic cell への分化が誘導されることが観察され、加えて糖鎖を有する soluble form の laeverin が EVT から分泌されていることが確認された (unpublished data)。

Laeverin は 990 のアミノ酸と分子量の約 3 分の 1 を糖鎖が占める 160kDa の M1-family に属する細胞膜結合型の peptidase で他の peptidase と異なり胎盤組織のみに検出され、その中でも EVT に発現が限局している極めてユニークな酵素である。本研究申請者のグループはヒトで初めてその存在を発見したが、遺伝子配列上では齧歯類をはじめヒト以外の動物種にもホモログ蛋白が存在する可能性が報告されている。もう一つの大きな特徴として霊長類の laeverin は他の peptidase で報告されていなかった新規の peptide 結合 motif を進化の過程で獲得しており、基質特異性が異なることが示されている。また可溶性

laeverin は N 末端に存在する細胞膜貫通部の直上で shedding を受けた 155kDa の蛋白として検出されるが、同じ糖鎖構造を有していると推察され、酵素活性も保持していると類推される (unpublished data)。

哺乳類はその生殖戦略として子宮内へ胚を着床させる道を選択した。そのためには胚存在の情報 (embryonal signal) を正確に母体に伝達する必要が生じた。現在ヒト胚の signal として同定されている液性因子に HCG が挙げられる。一方で着床後の胎盤形成期には母体は EVT を非自己であるが同種の個体であることを認識しつつ、免疫的な寛容状態を保ったまま EVT と協調して自己組織であるラセン動脈の再構築を完遂する。しかしながらこの時期の EVT 由来の embryonal signal に相当する液性因子は不明のままであった。

2. 研究の目的

今回 EVT に特異的に発現する laeverin が soluble form として EVT から分泌されることが確認されて laeverin が embryonal signal の有力な候補として登場したため、新しい展開が期待できることとなった。以上の背景のもと、本研究申請者は laeverin をこれまで不明であった EVT に特異的な液性因子 (embryonal signal) の候補として位置付け、さらに免疫学的側面や組織再構築の両側面から laeverin の機能を総合的に解析し、生理的な laeverin の役割の方向性を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

本研究では peptide 結合部、酵素活性部を変異および各種の C 端部を欠損させた遺伝子組み換え laeverin の作成指導を研究協力者の服部に依頼し、実験は代表者の堀江が大学院生杉並、松本と谷とともに同じく研究協力者の藤原、佐藤らの協力と指導を受けて担当し、以下の項目を遂行する。平成 25 年度はまず胎盤から精製した native な laeverin および r-laeverin を免疫して単クローン抗体を作成し、認識エピトープが異なる機能抗体を選別する。さらに様々な遺伝子組み換え r-laeverin も作成する。それに並行して r-laeverin の免疫細胞に対する作用を解析して laeverin の標的細胞を同定する。平成 26 年度は抗 laeverin 抗体を用いた可溶性 laeverin の測定系を確立させ、妊娠女性の血中濃度の変化を観察し、周産期疾患との関連も含めた preliminary な data を得る。また各種機能抗体や遺伝子組み換え r-laeverin を用いて laeverin の免疫細胞に対する作用、EVT や血管内皮細胞に対する作用、それらのシグナル伝達に寄与する機能構造の部位を推定し、今後の研究戦略に必要な知見を集積する。

4. 研究成果

着床後の胎盤形成期には母体は EVT を非

自己であるが同種の個体であることを認識しつつ、免疫的な寛容状態を保ったまま EVT と協調して自己組織であるラセン動脈の再構築を完遂する。しかしながらこの時期の EVT 由来の embryonal signal に相当する液性因子は不明のままであった。今回 EVT に特異的に発現する laeverin(LVRN) が soluble formとしてEVTから分泌されることが確認され、LVRN が embryonal signal の有力な候補として登場したため、新しい展開が期待できると考え、LVRN の機能解析について検討した。

リコンビナント LVRN が ligand として EVT から放出され、免疫細胞へ結合するかの検討のため、脱落膜内の免疫細胞を分離培養した上で、リコンビナントを添加した。免疫細胞への細胞膜への結合を確認するために、flow cytometry を行ったが、細胞表面に LVRN の発現は確認できなかった。また rLVRN による NK 細胞(細胞株 YT-A1)の絨毛癌細胞株 BeWo、JEG 3 に対する細胞傷害活性の変化の検討を行ったが、rLVRN により絨毛細胞の形態に変化を認め、免疫回避できる可能性が示唆された。

さらに、妊娠高血圧症候群では EVT の母体らせん動脈への置換(血管内 EVT)が乏しいことが発症原因と考えられており、それを予知しうるマーカーとなりうるか ELISA 法を用いて妊婦血清を用いて検討を行った。非妊婦、妊婦では妊娠初期、中期、末期について検討を行ったが妊娠高血圧症候群患者では低下する傾向を認め、予知しうるマーカーとなりう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。

今後は、LVRN の臨床応用も含めてさらなる検討をする予定である。

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 1 件)

Akihito HORIE, Asuka OKUNOMIYA, Tsukasa BABA, Kaoru ABIKO, Ken YAMAGUCHI, Noriomi MATSUMURA, Yukiyasu SATO, Ikuo KONISHI
Prediction of possibility of non-IVF pregnancy after laparoscopic surgery in infertile women with endometriosis using Endometriosis Fertility Index
ADVANCES ON OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, 67, 2015 印刷中

〔学会発表〕(計 5 件)

Akihito HORIE
Fertility-recovering surgery for endometriosis, adenomyosis, and diffuse leiomyomatosis
Japan-Philippines Conference for Advancement of Clinical Practice, 2014.6.26-27, Kyoto, Japan

堀江 昭史

乳がん患者の卵巣機能の評価と管理について

KYOTO Breast Cancer Summit(招請講演)
2014.6.14, 京都

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

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

第 59 回日本生殖医学会学術講演会
2014/12/04-05, 東京

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

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

第 59 回日本生殖医学会学術講演会
2014/12/04-05, 東京

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

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

第 36 回日本エンドメトリオース学会学術講演会
2015/1/25, 東京

〔図書〕(計 3 件)

堀江 昭史, 馬場 長, 小西 郁生
卵巣がんリスク低減手術(Risk Reducing Salping-Oophorectomy; RRSO)
2015, MEDICAL VIEW, 印刷中

馬場 長, 堀江 昭史, 小西 郁生

よりよい婦人科手術のための器具の使い方
～バイポーラ電気メスの使い方

2014, MEDICAL VIEW, 24-35

堀江 昭史

産婦人科-無排卵

今日の臨床サポート, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
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

堀江 昭史 (HORIE, Akihito)
京都大学大学院医学研究科
器官外科学講座 婦人科学・産科学分野
助教

研究者番号：30535836