

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26462487
研究課題名(和文) 子宮内環境の変化に対するチオレドキシシン結合蛋白によるストレス応答システムの解析

研究課題名(英文) Stress response system by Thioredoxin binding protein-2: TBP-2/Txnip in utero during pregnancy

研究代表者
由良 茂夫 (Yura, Shigeo)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60335289
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)：妊娠高血圧症候群(PIH)は胎盤の発育障害による血流不全が原因の一つとされ、低酸素や低栄養のために胎児は発育不全(FGR)となる。チオレドキシシン結合蛋白(Thioredoxin binding protein: TBP-2:別名thioredoxin interacting protein:Txnip)は栄養や酸素環境に応じて組織・臓器の「発育」と「成熟」を切り替えるいわば細胞内スイッチのような役割を担っている。本研究により、TBP-2 / Txnipが妊娠時に胎盤・胎児の発育・成熟調節や胎児への糖輸送・脂質の利用などに関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Pregnancy induced hypertension (PIH) is a major cause of fetal growth restriction (FGR). Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2), which is identical with thioredoxin interacting protein (Txnip) is recently reported to control cellular proliferation and differentiation and to be involved in glucose and lipid homeostasis. In PIH with FGR pregnancy, TBP-2 / Txnip gene expression was significantly low compared to that in normal term placenta. In placental explant culture, hypoxia decreased TBP-2 / Txnip gene expression. In TBP-2 knockout mouse placenta, deletion of TBP-2 significantly suppressed mRNA level of Peroxisome Proliferators-Activated Receptors (PPARs), key transcriptional factors of placenta development. We demonstrated a possibility that TBP-2 might contribute to the regulation of placental development and function during pregnancy.

研究分野：産婦人科

キーワード：妊娠 胎盤 胎児 チオレドキシシン

1. 研究開始当初の背景

(1) チオレドキシン結合蛋白(TBP-2)が細胞内スイッチとして細胞増殖・代謝調節を切り替える可能性

チオレドキシンは抗酸化作用を有する生体防御因子である。チオレドキシンと結合能を有するチオレドキシン結合蛋白(Thioredoxin binding protein: TBP-2、別名 thioredoxin interacting protein: Txnip)が同定され(Nishiyama A 他, J Biol Chem. 274:21645, 1999)、チオレドキシンの作用を抑制することが判明している。一方でTBP-2はチオレドキシンへの結合とは独立して、hypoxia inducible factor(HIF)-1が血管増殖因子産生を促進する作用に拮抗するなど(Farrell MR 他, Free Radic Biol Med. 49:1361, 2010)、低酸素環境に適応する細胞機能調節に重要な役割を果たしている。さらにTBP-2は高発現により細胞増殖を抑制して細胞の増殖調節に深く関与しているほか、インスリン依存性の糖取り込みを抑制し、脂肪酸の利用を促進するなど、細胞内の代謝制御においても必須の因子であることが明らかとなっている(Oka S他, Faseb J. 2006)。以上のことからTBP-2は酸素環境や栄養環境に応じて組織・臓器の「発育」と機能的な「成熟」を切り替えるいわば細胞内スイッチのような役割を担っていると想定されている。

(2) 胎盤・胎児における「発育」と「成熟」の関連とその異常

胎盤は胎児の発育に先行して妊娠初期から中期の子宮内で急速に発育し、機能的に成熟して急速な胎児の発育に寄与している。胎盤の大きさや機能は胎児の発育速度を決定付ける最も大きな要因と考えられており、適正な胎児発育のためには適度な胎盤の発育が重要である。

妊娠高血圧症候群(PIH)の発症原因や発症機序には不明の点が多いが、胎盤の発育障害(形成不全)による血流障害や栄養供給不足が大きな要因と言われている(Silasi M他, Obstet Gynecol Clin North Am. 37:239-53, 2010)。胎盤内の細胞が傷害され、再生機転が働くため、胎盤は正常な機能的成熟を果たせない。結果的に胎児は発育が障害

されるとともに(胎児発育不全: FGR)、生存を最優先するために悪化した子宮内環境に適応し、成熟がむしろ促進する。このように胎盤と胎児では低酸素・低栄養環境におかれた際の機能的な適応方法が異なっている。

以上のような、子宮内環境の変化に対する胎児の適応現象は「予測的適応反応(predictive adaptive response)」となり、出生後長年にわたって個体の発育・成熟に関与すると考えられている(Gluckman PD 他, Pediat Res. 56:311, 2004)。

(3) 子宮内環境の変化に伴う胎盤・胎児の代謝制御機構の変化

妊娠初期の胎盤形成は子宮内の酸素濃度の変化によってダイナミックに調節されていることが明らかとなってきた(Tal R, Biol Reprod. Epub 2012)。絨毛組織はまず低酸素環境下で形成が開始されるが、HIF-1の高発現によって、血管増殖因子が活性化し絨毛細胞は活発な増殖と脱落膜への侵入を示す。正常妊娠では胎盤内の血流が次第に増加し、胎盤組織が比較的高酸素環境にさらされるようになるとHIF-1などは次第に発現低下する。絨毛細胞は増殖速度を緩め、成熟を果たす。このときにはheat shock protein (HSP)70を初めとしたストレス応答遺伝子が活性化する。このような胎盤の「発育」・「成熟」が障害されると、再生機転として胎盤内の細胞は妊娠初期の表現型を取り戻す。

一方、胎児においては「発育」と「成熟」を調節する主要な因子として従来糖質コルチコイドやインスリンとその類縁の成長因子が注目されてきたが、これら細胞外シグナルがどのようにして細胞内の増殖・代謝機能を制御しているかはまだ不明の点が残されている。

胎盤にチオレドキシンが高濃度に存在することは知られていたが、われわれの予備的検討で、胎盤にはTBP-2も高発現していることを確認した。そこで、妊娠時の胎盤・胎児の発育・成熟調節や胎児への糖輸送・脂質の利用など母児間の栄養調節にもTBP-2が関与している可能性を想定した。

2. 研究の目的

(1) 正常妊娠および病的状態における胎盤・胎児のTBP-2発現の解明

本研究ではまず正常妊娠経過およびPIH・FGRにおけるTBP-2の変動を解析し、発育・発達や代謝調節との関連を解明する。

(2) 既知の細胞機能調節因子とTBP-2の相互作用

胎盤や胎児のストレス応答に関与していると想定されているHIF-1 とTBP-2の相互作用について種々の酸素環境下でヒト胎盤組織を用いて解析する。

(3) TBP-2の発現変化が胎盤・胎児に及ぼす短期的または長期的影響の検討

妊娠動物モデルにおけるTBP-2発現の変化が、胎生期および成長後の発育・代謝変化に短期的または長期的にどのような影響を及ぼすかを解析する。TBP-2の遺伝子改変動物を用いてTBP-2が胎児発育や妊娠中の代謝変化にどのように関与するかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 正常妊娠、PIH・FGR における TBP-2 の検討

本学附属病院及び関連施設において 正常妊婦、PIH・FGR妊婦から妊娠初期の絨毛組織、妊娠中期・末期の胎盤組織を採取しTBP-2の発現変化を免疫組織化学染色および定量PCR、ウェスタンブロッティング法で検討した。

(2) 胎盤組織における低酸素環境の影響の解析

ヒト胎盤組織を用い、1%O₂の低酸素環境下での培養によりTBP-2遺伝子および蛋白発現の変化を検討する。

(3) 妊娠モデル動物におけるTBP-2発現の解析

マウスを用いた妊娠中の母体へのストレス負荷として母体24時間絶食による急性負荷を行い、胎盤におけるTBP-2発現を解析する。

また、TBP-2の遺伝子改変動物を用いてTBP-2が胎児発育や妊娠中の代謝変化にどのように関与するかを検討する。

4. 研究成果

(1) 妊娠初期絨毛では妊娠中期・後期胎盤に比べてTBP-2遺伝子発現が有意に低値を示した(図1)。またウェスタンブロッティング法による蛋白発現も同様の結果であった。

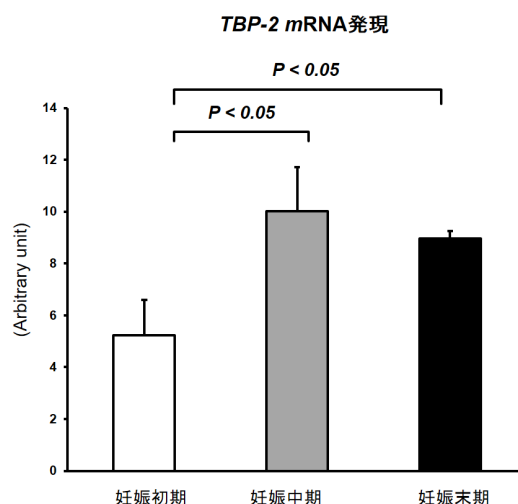


図1. 妊娠各期におけるTBP-2遺伝子発現

妊娠38週胎盤におけるTBP-2蛋白発現

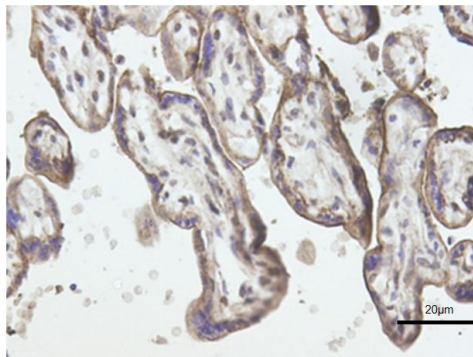


図2. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色ではTBP-2は妊娠後期の胎盤において、合胞性絨毛細胞、細胞性絨毛細胞、および血管内皮細胞での発現が認められた(図2)。PIH+FGRの胎盤では、正常およびFGRのみの胎盤に比べて、TBP-2遺伝子発現が有意に低下していた。

(2) 胎盤組織の低酸素培養(1%O₂)によりHIF-1の発現は増加し、TBP-2遺伝子発現は有意に低下した(図3)。ウェスタンブロッティング法による蛋白発現量も同様に減少した。

(3) マウス胎盤にもTBP-2 mRNAの発現が認められ、母獣の3および12時間の絶食では胎盤におけるTBP-2遺伝子発現は自由摂餌群

と差を認めなかったが、24時間の絶食により有意な発現の増加を認めた。

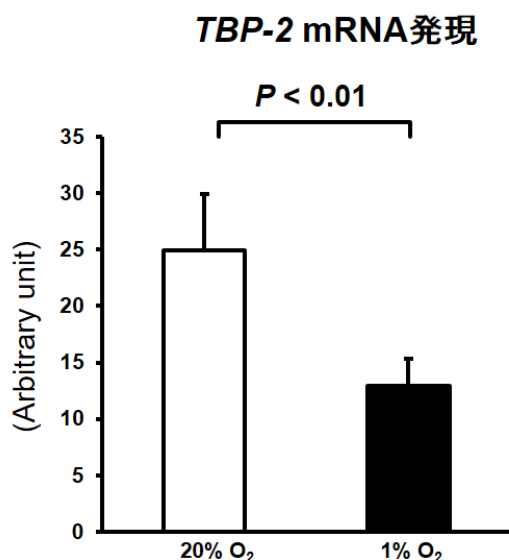


図3 . 低酸素培養による TBP-2 発現変化

TBP-2 遺伝子欠損マウスの胎盤では、胎盤の形成に深く関与する Peroxisome Proliferators-Activated Receptors (PPARs) のうち、PPAR と PPAR 遺伝子発現が低下することが判明した。

TBP-2 は高発現により細胞増殖を抑制して細胞の増殖調節に関与しているほか、インスリン依存性の糖取り込みを抑制し、脂肪酸の利用を促進するなど、細胞内の代謝制御において必須の因子である。また低酸素環境への適応にも重要で、栄養や酸素環境に応じて発育と成熟を切り替えるいわば細胞内スイッチの役割が想定されている。従って、妊娠時においても TBP-2 が胎盤・胎児の発育や成熟、母児間の栄養調節に関与している可能性が示された。

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)

Differential Expression of Thioredoxin Binding Protein-2/Txnip in Human Placenta - Possible Involvement of Hypoxia in its Suppression during Early Pregnancy. Haruta Mogami, Shigeo Yura, Eiji Kondoh, Hiroshi Masutani, Junji Yodoi, and Ikuo Konishi. J

Obstet Gynaecol Res. 2017 年 43 巻、50-56
ページ. 査読有 doi: 10.1111/jog.13149.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

由良 茂夫 (YURA, Shigeo)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号: 60335289

(2)連携研究者

近藤 英治 (KONDOH, Eiji)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 10544950

最上 晴太 (MOGAMI, Haruta)

京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40378766

(4)研究協力者

千草 義継 (CHIGUSA, Yoshitsugu)