

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670728

研究課題名(和文) NMR法を用いた常位胎盤早期剥離の病態解明と新規治療方法の開発

研究課題名(英文) Analyses of pathologic conditions and development of innovative medical care for placental abruption by using NMR method

研究代表者

長島 隆 (NAGASHIMA, TAKASHI)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：40338116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、妊娠子宮におけるBMPR2に関連したシグナル伝達物質を探索することで、常位胎盤早期剥離の病態解明と治療候補因子を同定することを目的とした。研究代表者は、tag遺伝子を付けたBmpr2遺伝子をNIH3T3細胞へ導入し強発現させ、tag蛋白を利用した免疫沈降法を用いて、同細胞から高濃度のBMPR2/Tag蛋白溶液を抽出することに成功した。この精製されたBMPR2複合蛋白溶液と、妊娠マウス子宮から抽出した内膜細胞の蛋白成分を混和し、蛋白間結合を生じさせることで、BMPR2のリガンド候補蛋白を絞り込んだ。その結果、BMP4とBMP7が妊娠子宮におけるBMPR2のリガンド候補として同定された。

研究成果の概要(英文)：To clarify pathological mechanisms and clinical targets of placental abruption, we researched signal transduction concerned BMPR2 in pregnant uteri. First, we succeed to transfect mouse Bmpr2 with tag gene in NIH3T3 cells and extract high concentrated BMPR2/tag fusion protein from the NIH3T3 cells by immunoprecipitation. Second, we narrowed ligands candidate of mouse BMPR2 by mixture of the purified fusion protein solution and extracted protein solution from pregnant mouse uteri. As a result, we detected BMP4 and BMP7 as ligands candidate of mouse BMPR2 in pregnant uteri.

研究分野：生殖医学

キーワード：常位胎盤早期剥離 リガンド BMPR2 BMP4 BMP7

### 1. 研究開始当初の背景

全妊娠期間を通じ、妊婦は様々な妊娠関連疾患を発症するリスクを抱えている。中でも特に全妊婦の約 0.5~1.5%で認められる常位胎盤早期剥離は、基底脱落膜からの出血に始まり、形成された胎盤後血腫が、これに接する胎盤を圧迫・剥離することで胎盤機能を障害し、高率に子宮内胎児死亡を生じる。この子宮内出血は、増悪すると母体出血死を引き起こすこともある。さらに、同疾患の病因と病態は未だ未知の部分が多く、的確な早期診断、治療方法、予防方法が確立されていないため、依然として母体胎児死亡率が最も高い重篤な妊娠関連疾患とされている。出血の発生機序として、これまで、細菌感染を契機とした窒素酸化物や活性酸素の発生により、子宮内膜のアポトーシスが発生することで隣接血管が破綻すると考えられてきた。しかし、細菌感染を契機とした常位胎盤早期剥離はごく稀であることから、現在のところ、主たる発生機序とは考えられていない。また、高血圧疾患、過短臍帯の索引、外力による外傷なども病因とされているが、いずれもその機序は不明である。一方、発症リスク因子として、同疾患の既往歴、前期破水、高齢妊娠、多産婦、多胎妊娠、羊水過多、血栓症、喫煙、子宮筋腫などが知られているが、いずれの病態も同疾患を伴うことは稀である。よって、もともと患者に常位胎盤早期剥離を発症し易い素因が存在し、上記のリスク因子を契機として同疾患が誘発されると考えられているが、未だその機序は不明である。しかし、近年、研究代表者は、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する BMP 蛋白の受容体の一つである BMP2 に関し、子宮特異的 BMP2 ノックアウト (*Bmpr2* cKO) マウスが常位胎盤早期剥離を来すことを発見した。これまで同疾患の遺伝的背景は明らかにされていなかったため、この遺伝子改変マウスをモデルマウスとして使用することで、同疾患の病態解明につながるの着想に至った。

### 2. 研究の目的

常位胎盤早期剥離モデルマウスと各磁気共鳴法 (NMR 法) を用いて、未だ明らかとなっていない妊娠子宮内における BMP2 のリガンドと下流のシグナル伝達物質を同定し、同疾患の病態解明と治療候補因子となり得る標的因子を明らかにすることを目指した。さらに、同標的因子をターゲットとした治療候補物質の開発を行い、常位胎盤早期剥離の早期診断と治療方法、ならびにその予防方法を確立することで、同疾患の根治を目指すことを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### 試薬

抗 BMP2 抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) から購入した。抗 BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) 抗体と抗

BMP7 (Bone morphogenetic protein 7) 抗体は、Merck Millipore (Darmstadt, Germany) から購入した。pFC14K HaloTag CMV Flexi Vector と Halo Tag Mammalian Protein Detection and Purification Systems は、Promega から購入した。Lipofectamine 3000、SYBR Green Real-Time PCR Master Mixes、Oligo(dT)12-18 Primer、および SuperScript III Reverse Transcriptase は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。RNeasy Mini Kit と RNAlater RNA Stabilization Reagent は、QIAGEN (Venlo, Netherlands) から購入した。3-min Total Protein Extraction Kit (Animal Tissues) と 3-min Total Protein Extraction Kit (Animal cells) は、101Bio (Palo Alto, CA, USA) から購入した。FLAG M Purification Kit は、Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

#### 妊娠マウス子宮からの蛋白質抽出

常位胎盤早期剥離のモデルマウスである子宮特異的に *Bmpr2* を欠損した *Bmpr2*<sup>flx/flx</sup>; *Pgr*<sup>cre/+</sup> マウス (*Bmpr2* cKO) と、そのコントロールマウスである *Bmpr2*<sup>flx/flx</sup> マウス (*Bmpr2* Ctrl) を、妊孕性の確認された雄マウス (WT) と交配させることで妊娠マウスを作成した。膣栓としてプラグの確認された日を妊娠成立日とし、妊娠 9 日で同マウスから妊娠子宮を摘出したのち、実体顕微鏡下にて妊娠子宮から胎児および胎児側由来細胞である絨毛膜細胞層を肉眼的に除去することで、母体側妊娠子宮組織のみを単離した。単離された同組織を超音波ホモジェナイザーにて裁断したのち、3-min Total Protein Extraction Kit (Animal Tissues) を用いて、蛋白変性のない蛋白質溶液を抽出した。

#### BMP2 複合蛋白質の合成と精製

Halo Tag Open Reading Frame を有するプラスミドベクター (pFC14K HaloTag CMV Flexi Vector) に対し、内在する制限酵素部位 (SgfI および EcoICR1) ヘマウス *Bmpr2* の DNA 塩基配列を、さらに他の制限酵素部位 (BamHI) へ 3X-Flag Tag の DNA 塩基配列を挿入した。作成した同プラスミドベクターを、マウス由来細胞である NIH3T3 細胞へ、Lipofectamine 3000 を用いたリポフェクション法にて導入した。同 NIH3T3 細胞内で合成された BMP2/Halo-Tag/3X-Flag-Tag 複合蛋白質を、変性させないように 3-min Total Protein Extraction Kit (Animal cells) を用いて抽出したのち、FLAG M Purification Kit を用いて精製した。

#### 蛋白質間結合と蛋白質複合体の精製

前述した 2 種類の妊娠マウス子宮から抽出した蛋白質溶液に、NIH3T3 細胞内で合成し抽出した BMP2/Halo-Tag/3X-Flag-Tag 複合蛋白質溶液をそれぞれ等量ずつ混ぜ、回転ローターを用いて 4 条件下で 24 時間混和を続けた。混和後の蛋白溶液に対し、Halo Tag Mammalian Protein Detection and

Purification Systems を用いて、BMPR2/Halo-Tag/3X-Flag-Tag 複合蛋白質に BMPR2 を介して結合した全ての蛋白質を、蛋白質複合体の形で精製した。

#### 蛋白質複合体の解析

質量分析器による解析では、当研究機関における質量分析器を有する解析部門に対し、精製した蛋白質複合体を含有する溶液を提出し、その解析を委託した。さらに、2次元電気泳動法による解析では、コスモ・バイオ株式会社（東京、日本）に、同じく精製した蛋白質複合体を含有する溶液を提出し、その解析を委託した。

#### Real-Time PCR による mRNA の転写解析

妊娠 0 日、5 日、7 日、8 日、9 日、10 日、および 11 日の *Bmpr2* cKO マウスと *Bmpr2* Ctrl マウスから単離した母体側妊娠子宮組織を、RNAase による RNA 分解から保護するため、RNA later RNA Stabilization Reagent に入れ、4 にて 24 時間以上静置する。その後、同組織を超音波ホモジェナイザーにて裁断したのち、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出・精製した。精製された total RNA は、Oligo(dT)12-18 Primer と SuperScript III Reverse Transcriptase によりサーマルサイクラー（2720 Thermal Cycler ; Thermo Fisher Scientific）を用いて逆転写されたのち、リアルタイム PCR（7300 Real-Time PCR System ; Thermo Fisher Scientific）によってその発現量を解析された。

#### 4. 研究成果

BMPR2/Halo-Tag/3X-Flag-Tag 遺伝子を挿入された pFC14K HaloTag CMV Flexi Vector が、リポフェクション法にて NIH3T3 細胞へ導入されたのち、複合蛋白質として強発現しているか確認するため、マウスの BMPR2 蛋白質を認識する抗 BMPR2 抗体を用いた Western Blot を施行した（図 1）。その結果、遺伝子導入された NIH3T3 細胞（Transfected\_1 および Transfected\_2）は、非導入の NIH3T3 細胞（= Ctrl）とは異なり、内因性の BMPR2 蛋白質に加えて BMPR2/Halo-Tag/3X-Flag-Tag（= BMPR2+Tag）複合蛋白質を強発現していることが示された。

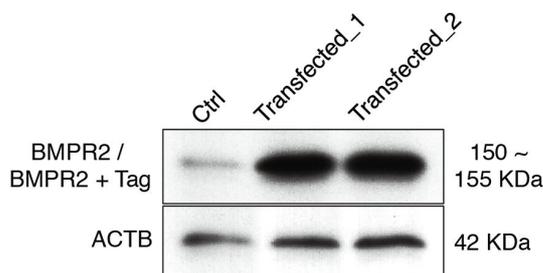


図 1. BMPR2/Halo-Tag/3X-Flag-Tag 遺伝子を挿入された NIH3T3 細胞。BMPR2+Tag 複合蛋白質が導入細胞内で強発現している。

次に、妊娠 9 日の *Bmpr2* cKO マウスと *Bmpr2*

Ctrl マウスより単離された母体側妊娠子宮組織を用いて抽出された蛋白質溶液に、BMPR2/Halo-Tag/3X-Flag-Tag 遺伝子を導入された NIH3T3 細胞を用いて抽出・精製された蛋白質溶液をそれぞれ等量ずつ混ぜて混和した。この作業により、マウスの妊娠子宮に内在する BMPR2 のリガンド候補蛋白質、または下流シグナル蛋白質などの、BMPR2 に結合する全ての蛋白質が蛋白質複合体を形成すると予想された。よって、抽出後に精製された蛋白質複合体に対し、質量分析器と 2次元電気泳動法による解析を試みた。その結果、BMPR2 に結合し以前からリガンドとして知られていた BMP 蛋白質ファミリーのうち、BMP4 と BMP7 が、マウスの妊娠子宮において胎盤形成期に BMPR2 のリガンドとして重要な機能を担っていると考えられた。

そこで、日数別にマウスの妊娠子宮から単離された母体側妊娠子宮組織を用いて、妊娠日数別に total RNA を抽出・精製した。この精製後の total RNA を用いた real-time PCR にて、マウスの妊娠初期における *Bmpr2*、*Bmp4*、および *Bmp7* の発現変化を解析した。その結果、*Bmp4* と *Bmp7* の発現変化は、*Bmpr2* の発現変化と同様に、妊娠 9 週で最も発現量が高まり、その後に発現量が低下していくことが判明した。よって、*Bmp4* と *Bmp7* の発現変化は、*Bmpr2* の発現変化と相関関係にあることが示された（図 2. 3. 4）。

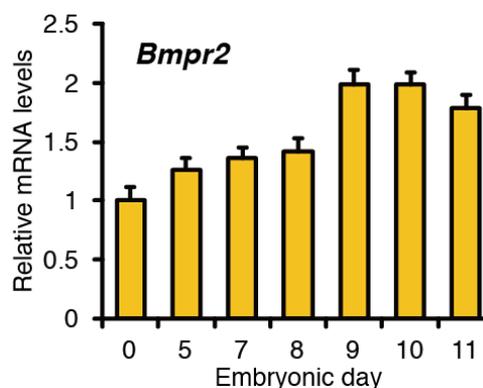


図 2. 妊娠 0 日から 11 日における子宮内膜組織での *Bmpr2* の発現変化。妊娠 9 日目で最も発現量が増大し、その後は減弱している。

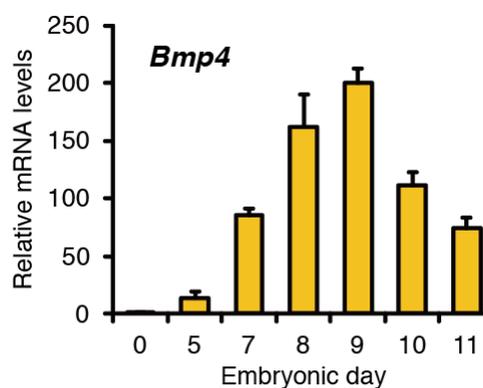


図 3. 妊娠 0 日から 11 日における子宮内膜組織での *Bmp4* の発現変化。*Bmpr2* の発現変化と

同様に、妊娠 9 日目で最も発現量が増大し、その後は減弱している。

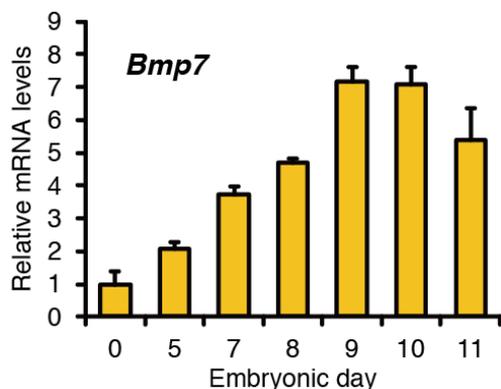


図4. 妊娠0日から11日における子宮内膜組織での *Bmp7* の発現変化。*Bmp4* や *Bmpr2* の発現変化と同様に、妊娠9日目で最も発現量が増大し、その後は減弱している。

以上の結果より、妊娠マウス子宮内における BMP2 のリガンド候補として、BMP4 および BMP7 が同定された。BMP4 および BMP7 の遺伝子欠損マウスは胎生致死であることから、今後の本研究の展開として、子宮特異的 BMP4 ノックアウト (*Bmp4* cKO) マウスと子宮特異的 BMP7 ノックアウト (*Bmp7* cKO) マウスを作成し、*Bmpr2* cKO マウスと同様に常位胎盤早期剥離の表現形を示すか検討し、その病態解明と新規治療を開発していく方針である。このマウス作成に関しては、既に米国の複数の大学および製薬機関と研究代表者との間で共同研究として実行に移すことを計画しており、次年度から開始される新たな科学研究費助成事業を基に遂行していく予定である。

#### 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)

- Masanori Ono, Takashi Kajitani, Hiroshi Uchida, Toru Arase, Hideyuki Oda, Sayaka Uchida, Kuniaki Ota, Takashi Nagashima, Hirotaka Masuda, Kaoru Miyazaki, Hironori Asada, Naoko Hida, Yo Mabuchi, Satoru Morikawa, Mamoru Ito, Serdar E. Bulun, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki, Yasunori Yoshimura, and Tetsuo Maruyama, CD34 and CD49f Double-Positive and Lineage Marker-Negative Cells Isolated from Human Myometrium Exhibit Stem Cell-Like Properties Involved in Pregnancy-Induced Uterine Remodeling., 査読有、Biol Reprod., 93(2):37, 1-9 (2015).

[学会発表](計 2 件)

- 長島 隆、BMP2 is required for postimplantation uterine function and pregnancy maintenance、第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会、2014 年 4 月 18 日、東京 (優秀論文賞受賞)

- 長島 隆、Martin M. Matzuk、丸山 哲夫、吉村 泰典、Connective Tissue Growth Factor (CTGF) は正常な卵胞発育と排卵に必須である、日本受精着床学会総会・学術講演会、2014 年 7 月 31 日、東京 (世界体外受精会議記念賞受賞)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長島 隆 (Nagashima Takashi)  
杏林大学医学部産科婦人科学教室  
講師  
研究者番号: 40338116

##### (2) 研究分担者

丸山 哲夫 (Maruyama Tetsuo)  
慶應義塾大学医学部産科婦人科学教室  
准教授  
研究者番号: 10209702

太田 邦明 (Ota Kuniaki)  
慶應義塾大学医学部産科婦人科学教室  
研究員  
研究者番号: 90424142