

論文の内容の要旨

論文題目

リゾフォスファチジン酸シグナル経路を介した絨毛細胞機能への影響及び
妊娠高血圧症候群の病理機序との関連

氏名 市川 麻祐子

ヒト細胞膜は、主に脂質とタンパク質が非共有結合で集合した構造を持ち、総重量の約50%を脂質が占めている。近年、膜タンパク分子と同様に脂質においても、特異的受容体や産生酵素が発見され、生理活性シグナル分子としても役割を果たしていることが明らかとなってきた。この生理活性シグナル分子として働く脂質を「脂質メディエーター」と呼ぶ。

リゾリン脂質は、エイコサノイド類に続く新規の脂質メディエーターであり、その代表格がリゾフォスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid:LPA) である。LPA は生体膜より産生され、特異的受容体を介して血管新生、免疫細胞の遊走、細胞増殖など多様な生理機能に関与する。その産生は、主に酵素オートタキシン (ATX)により調節されている。LPA は、生体内で速やかに代謝されるため正確な測定が困難であるのに対し、ATX は安定した構造を持つ蛋白であり、測定法が確立している。また、血液中の ATX と LPA には強い正の相関関係があり、ATX は生体内の LPA 産生動態を見るマーカーとして使用できることが報告されている。動物を用いた幾つかの先行研究では、正常な生殖における LPA 代謝の役割が示されている。しかし、ヒトの生殖や妊娠における ATX-LPA 系の役割については、まだほとんど研究がなされていない。

妊娠高血圧症候群 (以下 PIH) は、妊産婦の約 3~7%に発症し、産科領域における代表的疾患の一つである。「妊娠 20 週以降、分娩後 12 週までに高血圧が見られる場合、または高血圧に蛋白尿を伴う場合のいずれかで、かつこれらの症状が単なる妊娠の偶発合併症によるものではないもの」と定義される。重症化すると、母体に肝機能障害、凝固線溶系異常、呼吸循環障害および中枢神経系異常を含む致死的な多臓器障害を引き起こす。また、子宮内胎児発育遅延 (fetal growth restriction:FGR) を合併することも多く、母体のみならず胎児においても予後不良となり得る。

PIH の病因についてはこれまで多くの議論がなされてきており、“disease of theories 学説の疾患”と呼ばれてきた。しかし近年の研究により、妊娠初期の胎盤形成異常とそれに伴う母体の血管内皮障害が生じることによって PIH に特徴的な症状が現れるという” two

stage disorder “と言われる仮説が、PIH の病因としてほぼ確立してきている。しかし、two stage disorder の first stage である初期胎盤形成異常の成因については、未だ不明な点も多い。PIH の病因を解明することは、新たな治療法の開発へとつながる可能性があり、現代周産期医療にとって有益であると言える。

我々はこれまでに、妊娠女性の末梢血中 ATX 濃度と LPA 濃度は妊娠週数が進むにつれて上昇し、妊娠が終了すると妊娠前のレベルにまで急激に低下すること、ヒトの胎盤で妊娠全期間において ATX が発現していることを示した。これらは、胎盤内で ATX が産生され、ATX-LPA 経路がヒトの妊娠期間に何らかの機能を果たしていることを示唆している。また我々は、妊娠女性の末梢血中 ATX 濃度が、PIH を発症した妊婦では正常妊婦に比べて有意に低下していることを報告した。このことから、ATX-LPA 代謝経路の異常が PIH 妊婦における胎盤の形成異常に関与しているのではないかという仮説を立てた。

そこで、我々は LPA 特異的受容体の一つである LPAR3 に着目した。LPAR3 は、マウスにおいて子宮内膜細胞に発現し性周期でその発現が変化すること、その欠損マウスでは着床遅延や仔胎数の減少が生じることなどが報告されており、生殖分野への強い関与が報告されている受容体である。以上より、ATX-LPA-LPAR3 経路が絨毛細胞において果たす機能と、PIH の病因との関連について検討した。

研究の目的を以下に示す。

- ① 胎盤内における生理的な ATX 産生および LPAR3 の発現を検討する。
- ② 絨毛細胞株を用いた LPAR3 強制発現系を確立する。
- ③ LPA-LPAR3 経路が絨毛細胞の遺伝子発現に与える変化を解析する。
- ④ PIH の胎盤における ATX-LPA シグナル変化に関して検討する。

尚、東京大学医学部附属病院研究倫理委員会の承認の下、患者の同意を得て行った。

結果①-1

妊娠初期、中期、後期での胎盤における ATX 発現量を定量的 Real timePCR 法にて測定した。胎盤での ATX 発現量は、妊娠女性の末梢血中と同様、妊娠週数が進むにつれて上昇していることが分かった。

結果①-2

LPAR3 のヒト胎盤における発現パターンを免疫組織化学染色を用いて検討した。ヒト胎盤における LPAR3 の発現は、絨毛細胞内側の cytotrophoblast には認めず、絨毛細胞表面の syncytiotrophoblast と子宮脱落膜内に侵入する extra-villous trophoblast に限局していた。ヒト胎盤における ATX の発現が全ての絨毛細胞に認められた一方で、LPAR3 は分化の進んだ絨毛細胞にのみ発現しており、ATX-LPA-LPAR3 経路は絨毛細胞の機能分化に関与している可能性が示唆された。また、ヒト胎盤における LPAR3 の発現を、正常胎盤と PIH を合併する胎盤で比較検討したところ、免疫染色においては双方に明らかな発現の差を認めなかった。

結果②

LPAR3 を遺伝子導入した HTR8/SVneo 細胞（以下 HTR-LPAR3）と、コントロールベクターを遺伝子導入した HTR8/SVneo 細胞（以下 HTR-mock）を作成し、LPAR3 が強制発現していることを定量的 RT-PCR 法と免疫染色法にて確認した。

結果③

HTR-LPAR3 と HTR-mock を、LPAR3 特異的アゴニストである T13 にて刺激し、発現変化している遺伝子群を DNA マイクロアレイ法によって網羅的に解析した。

T13 刺激によってシグナル比が 2 倍以上亢進した遺伝子は、27456 遺伝子中 480 個あり、互いに機能的な関連の強い遺伝子群を抽出した Pathway 解析では 14 種類の pathway に明らかな変化を生じていた。この中には、胎盤形成、妊娠維持との関連が深いことが報告されている *cox2*、*PGE2* 受容体などのイコサノイド産生関連遺伝子、*IL-6*、*IL-8*、*SDF-1* などのサイトカイン、ケモカイン、そして絨毛細胞の分化に関与することが知られる *BMP4*、*EOMES* が含まれている。この結果は、絨毛細胞における ATX-LPA-LPAR3 経路が、絨毛細胞の分化、免疫調節機能の制御に関与している可能性を示唆している。

結果④

妊娠後期での胎盤における ATX 発現量を、正常妊婦と PIH を発症した妊婦で比較した。PIH 妊婦の胎盤での ATX 発現量は、正常妊婦に比較して有意に低下していた。すなわち PIH では ATX-LPA 経路が減弱している可能性が示唆された。PIH 胎盤を、発症時期によって早発群（early onset type:E0）、遅発群（late onset type:L0）に分けて解析すると、より胎盤形成不全が病態の中心を成す E0 群では、L0 群に比較して ATX 発現量がさらに低い傾向にあった。このことは、PIH では ATX-LPA 産生の低下が絨毛細胞機能に影響を与え、その結果胎盤形成異常を生じて PIH の発症に関与している可能性を示唆している。

以上より、ATX-LPA-LPAR3 経路は、絨毛細胞において分化誘導や母児免疫調節に関与している可能性が示唆された。この経路の減弱は、PIH の病態形成における first stage での胎盤形成不全の誘因のひとつである可能性を示している。また絨毛細胞由来の ATX 発現量は、胎盤機能を評価するための新たなバイオマーカーとして臨床応用できる可能性が考えられる。