

要旨

MMP 切断により生じたウシ胎盤性ラクトジェン N 末端側断片の血管新生に及ぼす影響

2012 年 3 月

先端生命科学専攻 47-106325 佐々木将武

指導教員 高橋透准教授

キーワード：胎盤性ラクトジェン、MMP、胎盤、プロラクチン

【序論】

ウシ胎盤性ラクトジェン (bovine placental lactogen ; bPL) はウシ胎盤の栄養膜二核細胞で産生される糖タンパク質ホルモンで、下垂体から分泌されるプロラクチン

(PRL) のパラログである。bPL は胎盤性 PRL ファミリータンパク質の中で唯一 PRL 様生物活性を持つが、ウシにおける bPL の生理的役割は不明な点が多い。近年、ヒト PRL はカテプシン (CTS) によって切断されて N 末端側から 16 kDa の断片が生じることが報告された (Piwnica *et al.*, 2004)。この 16 kDa 断片は PRL 様生物活性を失い、代わりに血管新生を抑制することが明らかになっている。

bPL は構造的・機能的に PRL に近縁と考えられることから、bPL も酵素切断を受けて PRL 様生物活性とは異なる生物活性を発現する可能性がある。本研究では bPL の新しい生物活性を探索することを目的として bPL の酵素切断の可能性について検討し、酵素切断で生成した bPL 断片の生物活性を評価する指標として血管新生作用に注目し、培養血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。

【結果】

1) 胎盤培養上清中の bPL の多様性及び培養上清による組換え bPL の切断

ウシ胎盤 (絨毛叢) 組織培養上清内の bPL を、抗 bPL 抗体を用いたウェスタンブロットで検出したところ、32 kDa 及び 31 kDa の bPL の他に 17-29 kDa の 5 本のバンドが認められた。また組換え bPL を胎盤組織培養上清と共にインキュベートしたところ、組換え bPL が切断されて 17-32 kDa の断片が生じることが示された。組換え bPL の断片生成は pH 3.4 の実験区で特に顕著であり、pH 5.4 及び pH 7.4 の実験区では比較的少なかった。以上の結果から、bPL は胎盤組織培養上清とのインキュベーションによって切断を受けることが示された。

2) ザイモグラフィによる MMP 活性の検出

胎盤組織培養上清を試料として、ゼラチンザイモグラフィ及びカゼインザイモグラフィを行った。MMP-2 と MMP-9 はゼラチンザイモグラフィで検出され、カゼインザイモグラフィではコラゲナーゼ活性を呈するバンドが確認された。以上の結果から、胎盤組織培養上清中にはゼラチナーゼ活性及びコラゲナーゼ活性が含まれることが分かった。

3) 組換え bPL の酵素切断

CTS : 組換え bPL を CTS-B, CTS-D 及び CTS-L で消化した。組換え bPL は CTS-B では切断されなかった。CTS-D 及び CTS-L は bPL を切断したが、N 末端側断片は生

成されなかった。

ゼラチナーゼ: 組換え bPL を MMP-2 及び MMP-9 で消化した。組換え bPL は MMP-2 では切断されなかったが, MMP-9 は bPL を C 末端側で切断して約 25 kDa の N 末端側断片を生成した。

コラゲナーゼ: 組換え bPL を MMP-8 及び MMP-13 で消化した。MMP-8 と MMP-13 は bPL を C 末端側で切断して 25 kDa の N 末端側断片を生成した。bPL を切断する活性は MMP-13 の方が MMP-8 よりも高かった。

以上の成績から, bPL は MMP-9, MMP-8 及び MMP-13 等のマトリックスメタロプロテナーゼによって切断され約 25 kDa の N 末端側断片を生成することが分かった。

4) MMP-13 の in situ ハイブリダイゼーション

MMP-13 mRNA の胎盤組織における局在を明らかにするため in situ ハイブリダイゼーションを行った。mRNA の発現は栄養膜細胞に認められ, 子宮内膜上皮細胞には観察されなかった。このことから MMP-13 は胎仔側組織である栄養膜で主に発現していることが分かった。

5) bPL 断片の PRL 様生物活性及び血管内皮細胞増殖作用

bPL の PRL 様生物活性をラットリンパ腫由来細胞株である Nb2 細胞の増殖を指標としたバイオアッセイで調べた。本研究で作製した組換え bPL は, 陽性対照として用いたヒツジ PRL (oPRL-19, NIDDK) に匹敵する生物活性が認められた。MMP-13 で切断されて生じた bPL N 末端側断片は PRL 様生物活性が著しく低下した。培養ウシ大脳毛細血管内皮細胞 (BBMC) の増殖に及ぼす, bPL 及び MMP-13 によって切断された bPL N 末端側断片の影響を検討した。完全長 bPL は BBMC の増殖に影響を与えなかったが, bPL N 末端側断片は BBMC の増殖を有意に促進した (図 1)。

【結論】

bPL は胎仔由来胎盤組織の栄養膜二核細胞から分泌されるが, 今回の実験から MMP-13 も同じく栄養膜細胞で発現していることが示された。すなわち分泌された bPL はその場で MMP-13 により切断され, 生成された N 末端側断片はパラクライン作用で近傍の血管内皮細胞に作用している可能性が考えられる (図 2)。MMPs による胎盤組織のリモデリングの場面では, bPL 断片が血管内皮細胞増殖作用により血管新生を促して MMPs による組織構築に協力的に作用していることが推測される。二核細胞は絨毛叢にのみ存在するため, bPL 断片による血管新生モデルは反芻類の胎盤がスポット状に多数形成されることと関連があるのかもしれない。

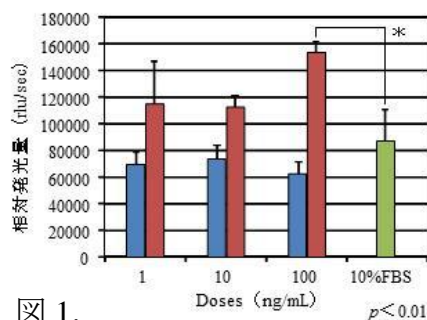


図 1.

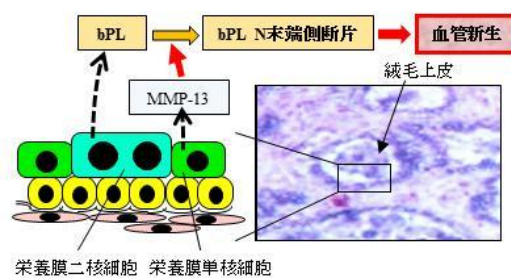


図 2.

Cleaved bovine placental lactogen stimulates the proliferation of cultured vascular endothelial cells

INTRODUCTION

Bovine placenta produces an array of molecules structurally and functionally similar to pituitary prolactin (PRL). Bovine placental lactogen (bPL) is a classical member of PRL family in the cow. bPL is expressed by placental trophoblast binucleate cells and the secreted protein is capable of stimulation in cultured mammary tissue. bPL is only placental PRL family protein that shows PRL-like bioactivity, but the physiological relevance of bPL during bovine gestation remains unclear.

Recently, it was indicated that human and rat PRLs are cleaved by cathepsin D, and 16 kDa N-terminal fragments are generated. The 16 kDa fragments lost PRL-like bioactivity. Instead, it inhibits proliferation of vascular endothelial cells.

It is thought that bPL is more similar in structure and function to PRL than any other bovine placental PRL family members. So we predict that bPL is also cleaved by metabolic enzyme, and it gets another physiological function. In this study, we examined the possibility of bPL cleavage and evaluated biological activities of resulted bPL fragments.

RESULT

Bovine cotyledonary-conditioned medium (BCCM) contained immunoreactive bPL with different molecular sizes ranging 17-32 kDa. Recombinant bPL (31-32 kDa) was cleaved by BCCM and generated N-terminal fragments ranging 17-32 kDa.

Recombinant bPL was also cleaved by matrix metalloproteinase such as MMP-8, MMP-9 or MMP-13, and generated approximately 25 kDa N-terminal fragments. Cleavage efficiency was the highest in MMP-13 than others. According to gelatin and casein zymographies BCCM contained both gelatinase and collagenase activities. *In situ* hybridization revealed that the expression of *MMP-13* was localized in trophoblast layers.

Bioactivity for angiogenesis of cleaved bPL was examined with *in vitro* model using bovine brain microvascular endothelial cells (BBMC). The cleaved bPL stimulated the proliferation of BBMC while intact bPL was incapable of stimulation of the cell.

CONCLUSION

This study suggested that bPL secreted by trophoblast binucleate cells is cleaved by MMPs possibly produced by trophoblasts. Also it is suggested that generated N-terminal fragments stimulate the proliferation neighboring vascular endothelial cells in placental villi. So, bPL fragments might contribute to development of vessel network and participate in the formation of cotyledonary placenta at its interface with the uterine caruncle in cows. Because binucleate cells only present at trophoblast tissues, the model of angiogenesis by bPL fragments is associated with the form of ruminant placenta.