

論文の内容の要旨

論文題名 絨毛細胞の機能制御に関わる分子機構と妊娠高血圧腎症 の発症機序との関連についての検討

氏名：藤井 達也

【序文】

健全な胎児発育には正常な胎盤形成が欠かせない。胎盤形成やその機能が障害されることは妊娠高血圧腎症(preeclampsia : PE)を始めとする様々な妊娠合併症を引き起こすとされている。胎盤は栄養外胚葉(trophectoderm : TE)と呼ばれる細胞塊から発生する。TE由来の未分化の栄養膜細胞(CT)が合胞体性栄養膜層(syncytiotrophoblast : ST)や絨毛外栄養膜細胞層(Extravillous cytotrophoblast : EVT)へと分化していくことで胎盤が形成されるが、この過程は局所の酸素濃度や血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を始めとした成長因子などによって管理されている。

妊娠初期における胎盤の酸素濃度は3-5%程度とされ低酸素にさらされている。低酸素下で安定化し、血管新生や細胞増殖などの制御に中心的な役割を果たすとされる低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor : HIF)が胎盤形成にとって重要な役割を果たしていることが知られている。実際に HIF1 α 、2 α のいずれが欠損しても胎生致死にいたる。

リゾフォスファジチン酸(Lysophosphatidic acid : LPA)は代表的な生理活性リゾリン脂質であり、グリセロール骨格に一本の脂肪酸とリン酸が結合した単純な構造をもつ。血管新生や細胞の増殖など、様々な生理作用をもつことがこれまでの研究から明らかにされつつある。血中の LPA は主にオートタキサン(Autotaxin : ATX)と呼ばれる酵素によって産生され、LPAR と呼ばれる LPA に特異的な受容体と結合することで作用する。LPAR1 から LPAR6 までの6個の LPAR がこれまでに同定されている。LPAR のうち、LPAR3 は主に生殖器に発現することが知られており、LPAR3 欠損マウスは着床障害をきたす。

妊娠高血圧腎症は妊娠高血圧症候群の病型の一つであり、特に発展途上国においては妊産婦死亡の主要な原因とされる重篤な妊娠合併症である。PE 発症のメカニズムとして、まず妊娠初期に胎盤形成不全がおき、妊娠中期以降に循環不全に陥った胎盤から放出される様々な因子による母体の全身症状の出現といった two stage theory が提唱されている。特に胎盤成長因子(placental growth factor : PlGF)の発現低下と可溶性 fms 様チロシンキ

ナーゼ 1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1 : sFLT-1)の発現上昇といった血管新生因子の発現異常が母体の症状出現と密接に関わっていることがこれまでの研究で知られるようになってきた。一方、その背景にある妊娠初期の胎盤形成不全の原因や PIGF の産生制御は依然として未解明である。

これまで我々の研究室では ATX-LPA 経路と PE の発症に着目した研究を行い、血中 ATX 濃度が PE 発症群では妊娠初期から低い傾向にあることを発表している。ATX-LPA を介した妊娠初期からの血管形成、血管新生が PE の胎盤では障害されている可能性がある。また HIF は胎盤形成に不可欠であることが知られているが、HIF1 α が sFLT-1 の発現上昇に関与しているとの報告もなされており、PE の病態生理への関与している可能性があるとしてされている。HIF2 α については PE の胎盤において有意に発現が上昇していることが報告されている一方、胎盤におけるその役割は十分に理解されているとは言い難い。

【目的】

妊娠初期における胎盤形成や血管新生に深く関わる 2 つのシグナル経路として HIF、ATX-LPA-LPAR 経路に着目し、以下のような課題を設定して検討を行った。

課題 1、CT が ST に分化していく過程での HIF1 α 、2 α の発現状況について絨毛細胞を用いた培養実験を行った。また ST に近い性質を持つといわれる細胞株 BeWo を用いて HIF の機能解析を行った。

課題 2、妊娠初期、後期及び PE 症例の胎盤における LPAR の発現変化をリアルタイム PCR、ウエスタンブロット、免疫染色を用いて比較検討した。

【方法】

本研究は東京大学医学部の倫理委員会によって受理された内容に基づき行った。

方法 1：既往帝王切開後妊娠、骨盤位妊娠など明らかな妊娠合併症のない妊娠 37 週から 38 週の選択的帝王切開術施行症例の胎盤を回収。パーコールによる濃度勾配及び MACS 処理により CT の単離をした。単離した CT は最大 96 時間培養した。培養は 20%酸素下のみならず、2%酸素下でも最大 24 時間培養を行った。培養液は 24 時間毎に交換し、培養上清を用いてヒト絨毛性ゴナドトロピン (Human chorionic gonadotropin : HCG)、PIGF の濃度測定を行った。HCG の濃度測定は株式会社 SRL に委託した。PIGF 濃度は ELISA サンドイッチ法にて測定した。培養した細胞からは mRNA あるいは全蛋白質を回収し、リアルタイム PCR 及びウエスタンブロットで HIF の発現を定量及び定性評価を行った。またパラフィン包埋した正常胎盤及び PE 症例の胎盤を用いた免疫染色を行うことで実際の胎盤組織における HIF1 α 、2 α の発現分布に関しても評価した。最後にリポフェクタミン法で BeWo に対する siRNA を行い HIF1 α 、2 α の機能解析を行った。

方法 2：人工妊娠中絶による妊娠 6 週から 10 週の妊娠初期の絨毛組織 20 例、及び主に既

往帝王切開後妊娠あるいは骨盤位妊娠のため妊娠 37 週から 40 週に選択的帝王切開術を施行した 18 症例、PE のため妊娠 26 週から 41 週に帝王切開術となった 24 症例から胎盤組織の一部を回収した。回収した胎盤から mRNA 及び全蛋白質を抽出し、リアルタイム PCR 及びウエスタンブロットにより LPAR1-6 の発現を評価した。また回収した胎盤をパラフィン包埋し免疫染色で LPAR の発現分布の評価も行った。

【結果】

結果 1：正常胎盤から単離した CT を培養したところ、経時的に細胞融合を認めた。また 24 時間毎に培養液上清を回収して HCG 濃度を測定したところ HCG 濃度は経時的に上昇しており特に 72 時間値、96 時間値は 24 時間値と比較して有意に上昇しており、ST への分化が十分に進んでいると考えられた。また酸素濃度の違いは HCG の分泌に影響を与えなかったことから、本培養実験において酸素濃度は細胞分化に影響をしないと考えられた。

次に分化していく過程での HIF1 α 、2 α の発現を 24 時間毎に経時的に確認した。CT が ST へと分化するにつれて HIF1 α の発現が減弱する一方、HIF2 α の発現は亢進することをウエスタンブロット法にて確認した。mRNA についても同様の結果が得られた。免疫染色を行うことで実際の胎盤組織での HIF1 α 、2 α の分布についても確認したところ HIF1 α は CT においてより著明に発現しており、ST の染色は弱かった。一方、HIF2 α は CT、ST で同程度に染色されていた。この傾向は正常胎盤、PE 症例の胎盤いずれについても共通して認められたが、PE 症例の胎盤の方がより顕著であった。

続いて低酸素が PlGF の発現に与える影響について検討した。CT が ST へと分化するに伴い PlGF の産生は増えていたが、特に ST では低酸素下で著明に PlGF の産生が抑制されていた。絨毛由来の細胞株であり未分化の栄養膜細胞に近い性質をもつとされる HTR-8/SVneo、絨毛癌由来の細胞株であり ST に近い性質をもつとされる BeWo についても同様の検討を行ったところ、BeWo においては低酸素下で PlGF の産生は抑制されていたが、HTR-8/SVneo では低酸素下でも発現変化は見られなかった。

これまでの結果から ST での HIF2 α の発現亢進が PlGF の低酸素下での発現変化に関わっている可能性が考えられた。BeWo に対して HIF1 α 、2 α を siRNA したところ siHIF2 α を施行した細胞では低酸素下での PlGF 産生低下がみられなかった。siHIF1 α を施行した細胞では PlGF 産生の変化は認めなかった。

結果 2：妊娠初期由来の絨毛細胞と、妊娠後期の胎盤由来の絨毛細胞を用いて妊娠週数における LPAR mRNA の発現をリアルタイム PCR で確認した。LPAR4 を除く全ての LPAR mRNA の発現が妊娠後期に上昇している一方、LPAR4 については妊娠初期と後期で発現変化を認めなかった。続いて PE 症例の胎盤と正常妊娠後期の胎盤を比較した。なお分娩に至った妊娠週数は PE 症例において有意に早かった。PE 症例の胎盤において

LPAR2,3,4,5 が有意に上昇する一方、LPAR1,6 には明らかな変化は見られなかった。また蛋白レベルでの発現変化についてもウェスタンブロット法にて確認したところ LPAR3 のみ PE 症例で有意に発現が上昇していた。免疫染色の結果からは、LPAR は ST を中心に発現していると考えられたが、PE 症例の胎盤では LPAR3 が特に ST で濃く染色される傾向があった。

【考察】

課題 1 として行った今回の研究結果から、CT が ST へと分化・融合していく過程で HIF1 α の発現が低下する一方、HIF2 α の発現が亢進することを明らかにした。さらに HIF2 α が PlGF の産生を抑制する作用をもつことを示した。PlGF はその名の通り主に胎盤で産生される血管新生の一種である。PlGF は妊娠中に栄養膜由来の合胞体性栄養膜から大量に分泌されるが、血管新生の促進に働くといった報告もある一方、妊娠初期においては血管新生に抑制的に働いているといった報告もなされている。本研究結果から、HIF2 α は PlGF の産生を抑制することで妊娠初期においては胎盤形成を促していると考えられる。また PE 胎盤では HIF2 α の発現が亢進していることが知られており、妊娠中期以降には PlGF の産生低下を介して PE の発症と関わっている可能性があることが考えられた。

課題 2 として行った LPAR の研究では、PE 胎盤において特に ST における LPAR3 の発現が上昇していることを明らかにした。我々のグループでは以前 PE 胎盤では ATX の分泌が低下していることを報告しており、ATX-LPA 経路が血管新生を促進することを考えると、LPAR3 は ATX の低下を反映して二次的に亢進している可能性がある。また ATX-LPA 経路の近年注目されている機能の一つに酸化ストレスの処理が挙げられる。PE 胎盤では ST に酸化ストレスにさらされていることが知られており、LPAR3 の ST での発現上昇は同細胞における酸化ストレスの蓄積を反映している可能性も考えられる。LPAR3 は LPAR の中でも特に生殖機能との関わりが深い受容体であり、LPAR3 の発現異常と PE の病態生理との関連が示唆される。LPAR3 の胎盤内における詳細な機能については今後の研究課題である。