

博士論文

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

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

所属：東京大学大学院 博士課程 医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官：藤井 知行

申請者：市川 麻祐子

## 目次

・略語一覧	4
・要旨	6
・序文	8
リゾリン脂質について	8
リゾフォスファチジン酸 (LPA) について	8
LPA 産生酵素 ATX について	10
LPA 受容体について	11
妊娠高血圧症候群について	13
研究の目的	15
・実験方法	16
実験検体	16
免疫組織学的検査	17
絨毛細胞由来株 (HTR8/SVneo) への LPAR3 強制発現	18
DNA マイクロアレイ検査	19
胎盤組織からの RNA 分離	19
Real time Q-RT-PCR 法	20
統計学的解析	21
・結果	22
1) 胎盤内における生理的な ATX 産生および LPAR3 の発現の検討	22
2) 絨毛細胞株を用いた LPAR3 強制発現系の確立	23
3) LPA-LPAR3 経路が絨毛細胞の遺伝子発現に与える変化の解析	24
4) PIH の胎盤における ATX-LPA シグナル異常に関する検討	25
・考察	28
・謝辞	34
・引用文献	36
・図表	46

## 略語一覽

ATX: autotaxin  
BMP4: *bone morphogenetic protein 4*  
cDNA: complementary DNA  
COX2: cyclooxygenase-2  
Enpp2: ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase2  
EO: early onset type  
EOMES: eomesodermin  
FGR: fetal growth restriction  
GPCR: G protein-coupled receptor  
HOXA10: homeobox A10  
IL-6: interleukin-6  
IL-8: interleukin-8  
IVF: in vitro fertilization  
LO: late onset type  
LPA: lysophosphatidic acid  
LPAR1: lysophosphatidic acid receptor 1  
LPAR2: lysophosphatidic acid receptor 2  
LPAR3: lysophosphatidic acid receptor 3  
LPAR4: lysophosphatidic acid receptor 4  
LPAR5: lysophosphatidic acid receptor 5  
LPAR6: lysophosphatidic acid receptor 6  
LPC: lysophosphatidyl choline  
lysoPLD: lysophospholipase D  
NPP: nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase  
ORP150: oxygen regulated protein 150  
PCR: polymerase chain reaction  
PG: prostaglandin  
PGE2: prostaglandin E2  
PGF2 $\alpha$ : prostaglandin F2 $\alpha$   
PGI2: prostaglandin I2  
PIH: pregnancy induced hypertension  
PLA2: phospholipase A2  
PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$

real-time qRT-PCR: real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction

SDF-1: stromal cell-derived factor 1

sFlt1: soluble fms-like tyrosine kinase-1

sVEGFR1: soluble vascular endothelial growth factor receptor 1

TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$

Th17: T helper 17 cell

VEGF: vascular endothelial growth factor

## 要旨

新規の脂質メディエーター、リゾフォスファチジン酸 (LPA) と、その産生酵素オートタキシン (ATX)、LPA の特異的受容体 LPAR3 に着目し、ATX-LPA-LPAR3 経路が妊娠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。

ヒト胎盤における LPAR3 の発現は、cytotrophoblast には認めず、syncytiotrophoblast と extra-villous trophoblast に限局していた。

LPAR3 を遺伝子導入した HTR8/SVneo 細胞を作成し、LPAR3 特異的アゴニスト T13 にて刺激し、発現変化している遺伝子群を DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析した。Pathway 解析で 14 種類の pathway に明らかな変化があり、胎盤形成、妊娠維持との関連が深い 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、BMP4、EOMES が含まれていた。胎盤の 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た。妊娠後期での胎盤の ATX 発現量は、正常妊婦に比較して PIH 妊婦で有意に低下していた。PIH 胎盤を発症時期を分けて解析すると、早発群では遅発群に比較して ATX 発現量がさらに低い傾向にあった。

ATX-LPA-LPAR3 経路の減弱は胎盤における絨毛細胞の分化や母児免疫調節

機構の異常を通じて妊娠初期の胎盤形成不全をもたらし、**PIH** の発症につながる可能性が示された。

## 序文

### リゾリン脂質について

リゾリン脂質は、細胞膜の主要成分であるジアシル型リン脂質から 1 または 2 位に結合する長鎖脂肪酸のうち 1 本が酵素により切断されたリン脂質の総称である。高濃度で界面活性作用を発揮し、細胞膜の破壊と細胞の溶解作用 (lysis) を持つことからリゾリン脂質 (Lysophospholipid) と命名された。疎水性尾部が 1 本であるため疎水性が低下しており、膜間移動に適した構造を持つため、細胞膜から容易に遊離しシグナル伝達物質として機能する。作用後は脱リン酸化や脱アシル化を受けて速やかに消去される。近年リゾリン脂質は、ステロイドホルモンやエイコサノイド類[1]に次ぐ、第二世代の脂質メディエーターとして注目が集まっている。リゾリン脂質は、構造による分類としてグリセロール骨格とスフィンゴシン骨格を有するものの 2 種類に大別される。それぞれに結合する極性基とアシル基の組み合わせにより多数の分子種が存在する。リゾフォスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: 以下 LPA) はグリセロール骨格を有する代表的なリゾリン脂質メディエーターである。

### リゾフォスファチジン酸(LPA)について



LPA は、グリセロール骨格にリン酸と脂肪酸が一つずつ結合した、最も単純なリン脂質である（図 1）。しかしシンプルな構造にも関わらず、その生理的・病理的作用は多岐に渡る[2]。LPA は血清中に豊富に存在し、細胞増殖を刺激することから、かつては血清中の増殖因子であると考えられていた。しかし近年の研究では、LPA が脂質メディエーターとして機能することが分かってきた。

LPA の生合成経路は、かつてはフォスファチジン酸 (PA) がホスホリパーゼ A2 (PLA2) によって直接 LPA に変換される経路が有力視されていたが、生体内でこの反応を触媒する PLA2 分子種は未だ確定されていない。より重要な LPA 産生経路として、血中に存在するリゾホスファチジルコリン（以下 LPC）がリゾホスホリパーゼ D 活性をもつ酵素オートタキシン (Autotaxin, 以下 ATX) によって LPA に変換される経路が注目されている（図 2）。

LPA は、受容体、産生酵素の遺伝子改変動物やヒト遺伝病の解析から、近年その生理学的役割が明らかとなってきた。中枢神経系の発達[3]や神経因性疼痛[4]、体毛形成[5, 6]、血管新生[7, 8]、免疫系の調節[9]、腫瘍増殖[10]などに関与するとされる。最近では、肺線維症への関与[11, 12]が、治療医学的応用の観点から注目を集めている。

LPA は LPC の分解によって生じる一過性の代謝産物であり、産生に関与している血小板が *in vitro* で活性化してしまうこと、血漿中には基質の LPC も酵素

ATX も共存していることから、血漿や血清検体を室温や 37℃でインキュベーションすると LPA 濃度が時間依存的に上昇してしまう。よって、血漿 LPA 濃度の正確な測定には、抗血小板・抗凝固剤の使用により血小板活性化を最小限にすること、遠心分離から測定までの作業を 4℃で行うことが必要となり[13]、非常に煩雑である。一方でその産生酵素である ATX は非常に安定であり、37℃でのインキュベーションや凍結融解を繰り返してもその濃度や酵素活性はほとんど変化しない。近年、血清 ATX 濃度は自動分析装置を用いた免疫学的測定法により、簡便に定量することが可能となっている[13]。また、血清 ATX 濃度と血漿 LPA 濃度との間には非常に強い正の相関関係あることが示され[14, 15]、ATX を測定することで、検体採取・処理工程が煩雑な血漿 LPA 濃度を推定することが可能であることが分かった。そこで、本研究では ATX 量を組織内での LPA 産生のマーカーとして利用することで LPA シグナル動態について検討を進めた。

### **LPA 産生酵素 ATX について**

ATX は、別名 ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase2(Enpp2)として知られる lysophospholipase D 活性をもつ 125KDa の蛋白酵素である。ATX は NPP family に属し[16]、オートクライン運動性促進因子としてメラノーマ細胞の上清より分離された[17]。1986 年に徳村らが、LPA は 37℃で長時間培養すると血漿

中で産生され、この反応は血漿中に数百  $\mu\text{M}$  の濃度で存在する lyso PLD という酵素によって LPC が加水分解されて起こることを報告した[18]。2002 年、2つの研究グループがヒトの血漿と仔牛の血清から lyso PLD を精製し、このアミノ酸配列の一部が、メラノーマ細胞上清より分離されていた ATX と一致することを発見した[19, 20]。これにより、癌の転移・浸潤に ATX-LPA 系が重要な役割を有していることが初めて示唆された。ATX はリゾリン酸から活性型の LPA を産生する過程で作用し、具体的にはリゾホスファチジルコリン (LPC) を加水分解して LPA にする[21]。ATX ヘテロ欠損マウス (Enpp2<sup>+/-</sup>) では、血漿中の ATX 濃度が半分になり、また抗 ATX 抗体を用いて血中の ATX を除去すると LPA 産生が完全に抑制される[22]ことから、細胞外の LPA 産生は、ATX を介した経路にほぼ依存することが示唆される。

## LPA 受容体について

LPA は特異的な受容体に結合して様々な生理的機能を発揮することが知られている。これまで見つかっている受容体は 6 種類あり、すべて形質膜上に存在する G 蛋白共役型受容体 (GPCR) である[23]。一方、LPA は細胞内の受容体を介して作用を発揮する可能性も示唆されている。核内受容体 PPAR $\gamma$  はプロスタグランジン J2 や脂肪酸を内在のリガンドとしていることが知られているが、

LPA も PPAR $\gamma$  に結合・作用することが明らかとなった[24]。しかし、生体内で産生される LPA が PPAR $\gamma$  を介した生理機能を持つかどうかは未だ不明である。

LPAR1、LPAR2、LPAR3 は EDG family に属しており[25-27]、互いに強い相同性を持ち、発現している組織は限局している。一方、LPAR4[28-30]、LPAR5[31, 32]、LPAR6[5, 6]は構造的に核酸受容体である P2Y receptor family に属し、生体組織に幅広く発現しているが、発現レベルは LPAR1～LPAR3 に比べて低い[2]。

LPAR1 は 1996 年に発見された最初の LPA 受容体であり、マウス的大脑皮質の脳室に発現し、脳の発達に関与する[3]。LPAR2 は胸腺・脾臓などの免疫系組織に発現し、免疫細胞の遊走などに関与する[26]。LPAR3 は、精巣・子宮などの生殖器において特異的に発現している[33]。LPAR4 は卵巣に比較的多く発現するが、その機能は未だ明らかではない[29, 34]。LPAR5 は小腸、脾臓、神経節、胚性幹細胞に発現が認められている[31]。LPAR6 は毛包に発現し、ヒトの先天性貧毛症・縮毛の原因遺伝子として同定されており、既存のリゾリン脂質受容体の中で唯一ヒトの欠損患者が知られている[5, 6]。このように LPA シグナルの作用は各組織における受容体の発現特性により決定されていると推定される。

LPA-LPAR3 シグナル経路は着床において重要な働きを担うことが動物モデルにおいて示されている。LPAR3 ノックアウトマウスの雌は受精卵の着床が遅

れて着床部位が不均一となるという表現型を示す[33]。その機序として LPAR3 は着床直前期の子宮内膜上皮細胞で特異的に発現しており、それを介したシグナル経路がシクロオキシゲナーゼ-2 の発現を誘導して着床に重要な局所因子であるプロスタグランジンの産生を生じることが確認されている。一方で、着床期以降について LPA-LPAR3 シグナル経路が胎盤形成や妊娠維持において果たしている生理的役割については不明である。

### 妊娠高血圧症候群について

妊娠高血圧症候群（pregnancy induced hypertension, 以下 PIH）は、「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[36]。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、PIH ではしばしば子宮内胎児発育遅延（fetal growth restriction;FGR）を合併し、母体のみならず胎児においても予後不良となり得る疾患である。PIH の発症率は国や民族間で様々であるが、一般的には全妊娠の約 3-7%に発症すると言われている[37]。PIH の危険因子としては、母親の加齢、初産婦[38]、多胎妊娠、レニン・アンギオテンシン系の遺伝子多形[39]、アフ

リカン-アメリカン民族[40]、IVF 妊娠[41]などが挙げられる。

近年の研究において、PIH の病因については” two stage disorder”と言われる基本的概念がほぼ確立してきている（図 3）。すなわち、first stage で遺伝的因子や免疫学的異常[42]などにより妊娠初期の胎盤形成不全、胎盤虚血が生じ、second stage として酸化ストレスを受けた胎盤より産生された抗血管新生因子が母体血中に流入して母体の全身性炎症反応や血管内皮障害を惹起し、PIH の病態を形成するという仮説である。発症が早期で胎児発育遅延を伴う重症例では、特に胎盤の形成異常が PIH の病態の根幹を成していると考えられる[43]。extra-villous trophoblast と呼ばれる機能分化した絨毛細胞集団が子宮内膜に浸潤し、子宮壁内のらせん動脈の構造的変化（リモデリング）を生じることで胎盤内への母体血を導くことが初期胎盤形成に必須の過程である[44]。病理学的検討で、PIH 女性の胎盤では extra-villous trophoblast の子宮壁への浸潤が浅く、リモデリングの過程が障害されていることが知られている[43-45]。そのため、妊娠初期の絨毛細胞機能を制御する分子生物学的機構の理解が PIH の根本的な病態解明に重要となる。

## 研究の目的

これまで藤井知行らの研究室においてヒト妊娠における ATX-LPA 系の果たす役割に関して検討を進めてきた。これまでに、①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 [46]、②ヒトの胎盤で、妊娠全期間において ATX 蛋白が産生されていること [47]を確認している。これらの結果から、LPA シグナルシステムが妊娠期間を通じてヒトの胎盤内で何らかの機能的役割を果たしていることが推測される。そこで本研究では、LPA シグナルシステムが胎盤形成において果たす役割を解明することを目的とし、また胎盤の形成異常に起因した病理機序が指摘されている PIH と LPA シグナルとの関係に着目して検討を行った。特に、生殖過程との関係が強い LPAR3 受容体を介したシグナル経路に着目して解析を進めた。その上で研究課題として以下を設定して解析を行った。

1. 胎盤内における生理的な ATX 産生および LPAR3 の発現を確認する。
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 シグナル変化について調査する。

## 実験方法

### 実験検体

研究に用いた胎盤検体は、初期絨毛組織、中期胎盤、後期胎盤の 3 種類である。初期絨毛組織については、宇田川産婦人科、池下レディースチャイルドクリニックにて、母体保護法に基づく人工妊娠中絶症例から採取した。中期胎盤検体、後期胎盤検体は、東京大学医学部附属病院にて、経膣分娩または帝王切開によって娩出された胎盤から採取した。これらの胎盤は通常、胞衣処理会社に引き渡されて全て廃棄されるものである。病理検査に提出される場合は、それ以外の廃棄される部分のみを提供して頂いた。

合併症を持たない妊婦から採取した正常胎盤は、初期絨毛が 30 例（妊娠 6 週から 10 週）、中期胎盤が 6 例（妊娠 15 週から 20 週）、後期胎盤が 20 例（妊娠 37 週から 40 週）であった。中期胎盤は、中期中絶により経膣分娩によって娩出されたものであり、中絶の適応はすべて児の染色体異常である。後期胎盤は、すべて選択的帝王切開によって娩出されたものであり、主な帝王切開の適応は、骨盤位や既往帝切、子宮手術後妊娠である。

PIH の診断は、日本妊娠高血圧学会の提唱する診断基準、病系分類（表 1,2,3）に基づいて行った。PIH を発症した妊婦から採取した PIH 胎盤は、後期胎盤 21 例であった（妊娠 32 週から 41 週）。PIH の発症時期による分類に基づくと、早発型は 8 例、遅発型は 13 例、PIH 重症度分類に基づくと、重症 10 例、軽症 11



例であった。子宮内胎児発育遅延（FGR）を合併するものは 12 例、合併しないものは 9 例であった。以上は表 6 にまとめた。

全ての検体は、東京大学医学部倫理委員会の承認を得ており（承認番号 3502）、患者の文書による同意を得た上で回収されている。

#### 免疫組織学的検査

約 5mm 大に切除した検体をティッシュテック O.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン、東京、日本）にて包埋した後、液体窒素にて凍結し、7  $\mu$  m の凍結切片を作成し-80℃で保存した。室温に戻して乾燥させた後、4%パラホルムアルデヒドにて固定した。1%過酸化水素水にて室温 30 分間、Biotin-Blocking System(DAKO Japan、東京、日本)にて室温 10 分間、ウサギ血清にて室温 30 分間プロテインブロッキングを行った。その後、4℃下でラット抗ヒト LPA3 抗体（EDG7,1mg/ml,800 倍希釈）（東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野 青木淳賢先生のご厚意により供与）を用いて一晩一次染色を行い、ビオチンで標識されたウサギ抗ラット二次抗体（500 倍希釈）（DAKO Japan、東京、日本）にて室温で 60 分間二次染色し、アミノエチルカルバゾール基質（ニチレイ）を用いて発色させた。1 次抗体のネガティブコントロールとして、ラット抗ヒト IgG1  $\lambda$  抗体（0.5mg/ml）（BD Biosciences Pharmingen、USA）を用い

た。対比染色としてヘマトキシリン染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。

#### 絨毛細胞由来株（HTR8/SVneo）への LPAR3 強制発現

絨毛細胞由来株 HTR8/SVneo は、10%FBS 添加した GIBCO®RPMI1640 培地（ライフテクノロジー、東京、日本）を用いて 12well culture plate に  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$  の細胞密度で継代培養を行った。

LPAR3 発現プラスミドベクターの精製、HTR8/SVneo への導入は以下の手順で行った。Competent Quick DH5 $\alpha$ （東洋紡、大阪、日本）を用いて、大腸菌に humanLPAR3(Edg7)-pCAGGS（1mg/ml）（東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野の青木淳賢先生のご厚意により供与）を heat shock 法にて導入し、アンピシリンにてセクションした後、LB 培地で 37°C、一晚培養した。大腸菌のコロニーを 3ml の LB 培地+アンピシリン 100  $\mu\text{g/ml}$  の入ったチューブに入れ 37°C で攪拌しながら一晚培養し、Plasmid DNA Extraction Midi Kit（FAVORGEN、台湾）を用いてプラスミド DNA を抽出し、約 70%コンフルエントになった HTR8/SVneo に、Lipofectamine®2000 Transfection Reagent（ライフテクノロジー、東京、日本）を用いて LPAR3 を導入したプラスミド DNA を遺伝子導入した（図 4）。コントロールベクター（pCAGGS）についても、同様の方法で HTR8/SVneo に遺伝子導入した。

遺伝子導入の確認は、定量的 PCR 法及び細胞免疫染色法にて行った。

#### DNA マイクロアレイ検査

LPAR3 を遺伝子導入した HTR8/SVneo（以下 HTR8-LPAR3）と、コントロールベクターを遺伝子導入した HTR8/SVneo（以下 HTR8-mock）を、各々 12-well dish に播き、LPAR3 特異的アゴニストである T13 10nM を添加し刺激した。添加 6 時間後に、Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (FAVORGEN、台湾) を用いて全 RNA を抽出した。3D-Gene® (TORAY、東京、日本) の全遺伝子型 DNA チップを用いて解析した (図 5)。

#### 胎盤組織からの RNA 分離

胎盤組織は、胎盤母体面中央部より採取した約 2mm 四方角の絨毛組織を、RNA later® (ライフテクノロジー、東京、日本) に浸透させ、一晩 4℃ 静置後、-80℃ 保存した。解凍した組織を、MagNA Lyser Green Beads (ロシュ・ダイアグノスティックス、東京、日本) に入れ、MagNA Lyser instrument (ロシュ・ダイアグノスティックス、東京、日本) を用いて、室温、65,000rpm の速度で 60 秒間ホモジェナイズし、Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit

(FAVORGEN、台湾)を用いて全 RNA を抽出した。分光光度計を用いて波長 260nm の吸光度を測定し、抽出された全 RNA を定量した。RNA の持ち込み量を 800ng に揃え、ReverTraAce qPCR RT MasterMix (東洋紡、大阪、日本)を用いて逆転写反応を行い、相補的 DNA (以下 cDNA) を生成した。

real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction

(以下 real time Q-RT-PCR)

Real time Q-RT-PCR は、Light Cycler®480 (ロシュ・アプライドサイエンス、東京、日本)、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡、大阪、日本)、及び下記のプライマー (シグマ・アルドリッチジャパン) を用いて、cDNA を増幅した。

ATX :forward 5'-GTTGCAAGGAAACCTTTGGA-3', reverse  
5'-CATGGTTGGCCTGAAGGTAT-3'(amplicon size 273bp),

LPAR3:forward 5'-CTGATGTTTAACACAGGCCC-3', reverse  
5'-GACGTTGGTTTTCTCTTGA-3'(amplicon size 402bp),

βactin :forward 5'-CGACAACGGCTCCGGCATGTGC-3',reverse  
5'-CGTCACCGGAGTCCATCACGATGC-3'(amplicon size 442bp)。

ATX については、95℃の denaturing を 10 分間行った後、95℃の denaturation を 10 秒間、57℃の annealing を 10 秒間、72℃の extension を 11 秒間の過程を 45

サイクル行った。LPAR3 については、95℃の denaturing を 10 分間行った後、95℃の denaturation を 10 秒間、58℃の annealing を 10 秒間、72℃の extension を 17 秒間の過程を 45 サイクル行った。ATX、LPAR3 各々の発現レベルを、あらかじめ作成した各種標準の検量線から、 $\beta$ actin を内部標準として誤差を補正し、解析した。

#### 統計学的解析

表の正常群と PIH 群の比較は、t 検定または Mann-Whitney U 検定を用いて行った。分娩週数と ATXmRNA 量については、単回帰分析を用いた。最小二乗法で測定した回帰線の妥当性は、F 検定で評価した。正常群と PIH 群での ATXmRNA 量の解析は、Mann-Whitney U 検定を用いた。ATXmRNA 量の PIH 発症時期による違いの解析は、Steel-Dwass 検定を用いて解析した。

$P < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。全ての解析は、JMP10 software (SAS インスティテュート ジャパン、日本) を用いて行った。

## 結果

### 1) 胎盤内における生理的な ATX 産生および LPAR3 の発現の検討

#### 1-1. 正常妊娠中の胎盤における ATX 発現量の推移

合併症を持たない妊婦の、妊娠初期、中期、後期胎盤における ATXmRNA 量を、real time Q-RT-PCR を用いて比較した。ATX 発現量は、妊娠週数が進むにつれて上昇し、妊娠初期と中期の比較では中期が ( $P=0.0048$ )、妊娠初期と後期の比較では後期が ( $P<0.0001$ )、それぞれ有意差を持って高値を示した(図 6A) (初期  $n=30$ 、平均値  $0.31 \pm 0.25$ ) (中期  $n=6$ 、平均値  $0.68 \pm 0.35$ ) (後期  $n=20$ 、平均値  $0.81 \pm 0.35$ )。また、分娩週数による胎盤の ATX 発現量の比較では、分娩週数とそれに対応する ATX 発現量が一次方程式で表せることが示された (図 6B) ( $Y=0.19+0.017 \cdot X$ 、 $P<0.0001$ )。

#### 1-2. 胎盤における LPAR3 の発現

LPAR3 特異的抗体を用いた免疫染色法にて妊娠時期毎の胎盤内における LPA 受容体 LPAR3 の発現について検討を行った。LPAR3 は、ATX と同様、妊娠初期、中期、後期全ての期間で発現が確認された (図 7A,B,C)。絨毛細胞は主に 3 種類の細胞集団に分類される。Cytotrophoblast は、胚盤胞が 2 層の栄養膜に分化したうち、内層 (胚側) の単核細胞である。Cytotrophoblast は、絨毛外層に位置し

母体血とのガス・物質交換を行う多核の syncytiotrophoblast および、絨毛の先端より母体脱落膜内へ浸潤していく extra-villous trophoblast の2つに分化していくことが知られている。この発現分布を詳細に観察すると、絨毛内部に存在する cytotrophoblast には発現を認めず、syncytiotrophoblast と、extra villous trophoblast に特異的染色を確認した（図 8 正常胎盤）。この発現様式は妊娠時期によらず一定であった。つまり、LPAR3 の絨毛細胞における発現は機能分化とともに誘導される可能性が示唆された。正常胎盤における ATX、LPAR3 の発現状況を図 9 にまとめた。一方、PIH 胎盤における LPAR3 の発現を同様に調べた。免疫染色法では正常胎盤と PIH 胎盤を比較して、明らかな LPAR3 発現の差は認めなかった（図 8PIH 胎盤）。

## 2) 絨毛細胞株を用いた LPAR3 強制発現系の確立

代表的な絨毛細胞由来株 HTR8/SVneo、JEG3、BeWo を用いて、各々における ATX、LPAR3 の発現様式を mRNA レベル、蛋白レベルで調べた（図 10）。絨毛細胞由来株 HTR8/SVneo 細胞（以下 HTR）は、未分化な cytotrophoblast に類似した性質を持つことが知られている。この HTR は LPAR3 を発現しておらず、免疫染色で確認した cytotrophoblast の性質と一致していた。そこで、LPA-LPAR3 経路が絨毛細胞細胞機能に与える影響について解析するための実験モデルとし

て、HTR に LPAR3 の遺伝子導入を行う強制発現系を確立した。

LPAR3 を遺伝子導入した HTR（以下 HTR-LPAR3）と、コントロールベクターを遺伝子導入した HTR（以下 HTR-mock）を作成し、各々の LPAR3 mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて確認した。HTR-LPAR3 では、HTR-mock に比較して顕著に LPAR3 発現量が増加していた（図 11A）。蛋白発現について確認するため免疫染色法を行い、HTR-LPAR3 では LPAR3 特異的染色を認め、一方で HTR-mock では染色を認めなかった。（図 11B）。

### 3) LPA-LPAR3 経路が絨毛細胞の遺伝子発現に与える変化の解析

HTR-LPAR3 と HTR-mock のそれぞれを、LPAR3 特異的アゴニスト T13 (10nM) で刺激し、6 時間後に mRNA を回収して DNA マイクロアレイ法を用いて発現変化を生じる遺伝子群の網羅的な解析を行った（図 12）。27,456 遺伝子中 480 遺伝子が T13 による LPAR3 刺激に反応してシグナル比が 2 倍以上亢進した。機能的な関連性の強い遺伝子群をまとめた Pathway 解析では、特に 18 種類の pathway を中心とした遺伝子発現上昇が生じていることを見出した。その中で妊娠維持や胎盤形成と関連の深いものとして、COX-2、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連することが知られる BMP4、EOMES などが同定された（図



13)。

#### 4) PIH の胎盤における ATX-LPA シグナル異常に関する検討

##### 4-1. 後期胎盤における正常妊娠と PIH の比較

次に、合併症のない正常妊婦の後期胎盤と、PIH を発症した妊婦の後期胎盤における ATX 発現量を比較した。正常群(n=20)と PIH 群(n=21)における背景因子は表 4 に示した。母親の年齢、身長、妊娠中の体重増加は、2 群で有意な差を認めなかった。平均の分娩週数は、正常群と比較して PIH 群の方が有意に早かった(正常群 平均値  $38.2 \pm 0.65$ 、PIH 群 平均値  $35.9 \pm 2.9$ 、 $P=0.0040$ )。これは、PIH の増悪を避けるために早期に妊娠を終了させる治療方針を反映している。胎児出生体重、胎盤重量も同様に、PIH 群のほう有意に低値を示した(胎児出生体重：正常群 平均値  $2913 \pm 306\text{g}$ 、PIH 群 平均値  $2036 \pm 753\text{g}$ 、 $P=0.0003$ ) (胎盤重量：正常群 平均値  $549 \pm 135\text{g}$ 、PIH 群 平均値  $372 \pm 125\text{g}$ 、 $P=0.0004$ )。これは、PIH 群のほう早産の傾向が強いこと、胎児発育と胎盤発育に障害があることを反映していると考えられる。

PIH 胎盤と正常胎盤における ATXmRNA 発現量を比較すると、PIH 胎盤のほう有意に低値であった(正常群 n=20、平均値  $0.81 \pm 0.35$ 、PIH 群 n=21、平均値  $0.56 \pm 0.36$ 、 $P=0.0210$ ) (図 14A)。しかし、ATXmRNA 発現量は妊娠週数が進むにつれて上昇していき、正常群よりも PIH 群では分娩週数が 4.4 週早くな

っているため、この 2 群を正確に比較するためには、ATX 発現における分娩週数に依存した差を考慮する必要がある。そこで我々は、胎盤における ATX 発現量は妊娠週数が進むにつれ増加するため、分娩週数を横軸に取り、単回帰分析を用いて正常群と PIH 群の ATXmRNA 量を比較した。

正常群（●）の推移は 1 次直線（赤線）となったが、PIH 群（□）では分娩週数との有意な相関は認めず（青点線）、正常群よりも低値を示すものがほとんどであった(図 14B)。従って、同じ分娩週数では、PIH 群の方が正常群に比べて、胎盤における ATXmRNA 量が低値であることが示唆された。

#### 4-2. PIH 発症時期による ATX 発現量の比較

次に PIH 群の検体をより重篤な胎盤障害があると考えられる早発型（early onset type : EO）と、比較的軽症の遅発型（late onset type : LO）に分けて、ATX 発現量を比較した。“EO”群と“LO”群の背景因子を表 5 に示した。20 名の正常群、13 名の遅発群（LO）、8 名の早発群（EO）を対象として、real time Q-RT-PCR 法を用いて ATXmRNA 量を測定し、Steel-Dwass 検定を用いて検討した。EO 群における ATXmRNA 量は、正常群に比較して有意に低値を示した（ $P=0.013$ ）。また、有意差は認めないものの、EO 群の方が LO 群よりも低い傾

向を示した（図 15A）。

分娩週数との関係を見ると、EO 群の ATX 発現量(□)は、ほとんどばらつきなく低値であったが、LO 群の ATX 発現量(+)はばらつきが大きかった(図 15B)。

## ・ 考察

本研究では、以下を明らかにした。①LPA 産生酵素である ATX と LPAR3 受容体は妊娠期間を通じて胎盤内で発現していた。②LPAR3 は機能分化した絨毛細胞に局限した発現を示していた。③LPAR3 を介したシグナル刺激を行った絨毛細胞内では胎盤形成に関連の強い遺伝子群の発現増強が生じた。④PIH 女性の胎盤内では ATX の発現が低下していた。

正常妊婦の末梢血中の血清 ATX 量は、妊娠週数が進むにつれて増加し、分娩後急激に低下することが知られており[46]、ATX が胎盤で豊富に産生されてそれに伴い LPA シグナルが胎盤内で活性化していることが推測されていた。本研究で胎盤内の ATX mRNA 発現を確認したことはそうした推測に矛盾しない。また、妊娠進行に伴う末梢血中の ATX の上昇は胎盤重量の増加の因子以外に、個々の細胞レベルで mRNA 発現量が妊娠の進行とともに増加することに起因していることが明らかとなった。我々の研究グループの先行研究で岩澤らは、ヒト胎盤の免疫染色により、ATX 発現は絨毛細胞を含めた胎盤内全体で生じていることを確認している[47]。これらの所見は ATX を介して産生された LPA の作用が胎盤形成および機能維持に関与していることを示唆している。

本研究では、**LPAR3** の発現は、絨毛細胞の機能分化に伴い誘導されていることが明らかとなった。ヒトの絨毛細胞は前駆細胞である未分化な **cytotrophoblast** から主として 2 つの方向性の機能分化を生じる。絨毛外層に位置し母体血とのガス・物質交換を行う多核の **syncytiotrophoblast** への分化と、付着絨毛の先端より母体脱落膜内へ浸潤する **extra-villous trophoblast** への分化である。**LPAR3** が **cytotrophoblast** には発現せず、**syncytiotrophoblast** と **extra-villous trophoblast** に発現することから、**LPA-LPAR3** シグナルの作用が細胞分化や、分化後の機能制御に関与することが予測される。本研究の、絨毛細胞株を用いた強制発現系による **LPAR3** 刺激実験におけるマイクロアレイの結果はこの予測を肯定するものであった。**Pathway** 解析では絨毛細胞の分化や、血管形成、免疫調整などの胎盤機能維持に密接な関連を有することが過去に報告された遺伝子群が同定された。

細胞分化に関与する遺伝子群の中で **LPAR3** シグナル刺激に伴い **BMP-4**、**EOMES** の発現誘導が生じていた。**BMP-4** (**Bone morphogenetic protein-4**) は **TGF- $\beta$**  スーパーファミリーに属し、ヒトの胚性幹細胞から絨毛細胞への分化を誘導することで知られる[48, 49]。また、**EOMES** は **T-boxbrain protein2** としても知られる転写活性因子であり、初期胚の発生に関わることが知られている。また免疫細胞 **Th17** の分化を抑制するとの報告もあり免疫系の調節において重要な役割を

果たす[50]。また、本研究では LPAR3 刺激により誘導される遺伝子の 1 つに SDF-1(stromal cell-derived factor-1)を確認した。SDF-1 は、特異的 GPCR に結合するケモカインで、細胞の走化性や増殖、血管新生、細胞内 Ca 上昇、遺伝子の転写に関連するシグナル経路を細胞内で誘導する[51]。絨毛細胞においては、SDF-1 シグナルは抗アポトーシス経路を刺激し、妊娠中の絨毛細胞の発育を促進するとの報告がある[52]。特に妊娠初期の絨毛細胞には機能的な SDF-1 の発現が認められており、オートクライン的に絨毛細胞の増殖や分化を刺激するような形で妊娠の維持に重要な役割を果たしている[53]。LPA-LPAR3 シグナル経路により、BMP-4、EOMES、SDF-1 を介して誘導される絨毛細胞の分化の方向性やその調節機構については将来的な検討課題である。

LPAR3 シグナル刺激はイコサノイド産生関連遺伝子である、COX-2、PGE2 受容体の発現を亢進した。LPA シグナル作用とエイコサノイド合成経路との相互的関連は複数報告されており、その点で本研究の結果は過去の報告と一致している。LPAR3 欠損マウスの雌では、着床の障害が生じるが、これは着床の時期の子宮内膜で COX2 発現は低下しているためである[33]。COX2 の産物である PGE2、PGI2 を LPAR3 欠損マウスに投与すると、着床遅延は改善される。また、LPAR3 と細胞質ゾル中のホスホリパーゼ A2 $\alpha$ 、COX2 のヒト子宮内膜での発現は、正常女性に比べて、着床障害を繰り返している女性では低下しているとい

う報告もある[54]。不妊の原因疾患として代表的な子宮内膜症の患者の子宮内膜組織を免疫組織化学検査で解析した研究では、健常者に比べて、分泌期子宮内膜における LPAR3、HOXA10 などの着床関連マーカーの発現が低下していることが示された[55]。つまり LPAR3 依存性の PG 合成は、着床において鍵となるシステムである可能性が示唆される。LPA は、PGF2 $\alpha$  の産生を阻害することで PGE2 合成の上昇を引き起こし、子宮内膜で PGE2 優位の環境を形成する。また、本研究では LPAR3 を介した刺激により絨毛細胞の PGE2 受容体発現が増強した。PGE2 は従来、妊娠初期の母児免疫応答の調節に深く関与していることが知られている。脱落膜の PGE2 は、リンパ球活性を低下させて脱落膜マクロファージの抗原提示能を減弱させることで、母児間の免疫寛容を誘導する[56, 57]。絨毛細胞に対する PGE2 の作用については本研究では明らかではないが、絨毛細胞は ATX を分泌して胎盤局所における PGE2 産生酵素 COX-2 の発現と同時に PGE2 受容体の発現を増加することで母児間免疫応答の調節に関与している可能性がある。

本研究において胎盤における ATX mRNA 発現量は、正常妊娠と比較して PIH 妊娠で有意に低下していた。これは、増田らが報告した「妊婦の末梢血中の ATX 濃度が正常妊婦に比較して PIH 妊婦で有意に低下している」という結果[46]を考えると、PIH では胎盤における ATX 産生量が低下し、その結果として末梢血中

の ATX と LPA が低下している可能性がある。さらに我々は、早発型の PIH では、遅発型に比べてより ATX 発現量の低下が著しい傾向があることを示した。PIH による胎盤形成異常は、遅発型よりも早発型でより重篤であることが報告されており [58]、これは ATX 発現量の変化と胎盤形成異常の程度が相関するという我々の仮説と矛盾しない。本研究で示すように LPA-LPAR3 シグナル経路は絨毛細胞の分化・機能の重要な制御機構である。今回示された ATX の産生低下は LPA シグナルの減弱を生じることにより、Two stage disorder としての PIH 病理機序における初期の胎盤形成障害のトリガーとなっている可能性が示唆された。

今回の研究で未解決な点は、末梢血の ATX 量低下が、PIH で母体に生じる症候（高血圧、蛋白尿を伴う腎障害、肝障害など）に直接的に影響しているのか、ということである。母体の血管内皮障害は、PIH による母体合併症の多くに見られる病理学的所見であることを考慮すると、PIH 妊婦の内皮細胞の機能を直接阻害している因子が、他に存在している可能性がある。PIH の病態を明らかにする上でひとつの重要な発見であったのが、VEGF 関連分子が PIH の病態成立に関与すると特定されたことである。可溶性 VEGF 受容体 1（以下 sVEGFR1）は、sFlt1 とも言われ、VEGF のアンタゴニストとして働く。胎盤における sVEGFR1 の産生が増加することによって、VEGF シグナルは減弱し、PIH における血管機能異常につながる [59, 60]。ATX-LPA 系と VEGF システムの関与は、すでに報告



されている。卵巣癌由来株を用いた *in vitro* の研究では、アンチセンス形態のオリゴマーによる ATX 分泌の低下を起こすと、sVEGFR1 分泌の増加と VEGFR2 発現の低下が誘導された[61]。LPA は、蛋白の折りたたみを起こす小胞体シャペロンである ORP150 を介した転写後メカニズムを通して、間葉系幹細胞において VEGF 産生を促進する[62]。これに基づく、PIH 胎盤での局所の ATX 産生低下は、VEGF シグナルを阻害し、PIH の症状を引き起こす血管内皮細胞機能の阻害につながっている可能性も考えられる。

今回の研究の結果により、ATX-LPA-LPAR3 経路が、ヒト絨毛細胞において分化や母児間免疫機構の調節に関与している可能性が示唆された。また、PIH の胎盤では ATX 産生が低下していること、胎盤形成異常を背景因子とされる PIH において ATX の低下が著しいことが明らかとなった。これは、ATX-LPA-LPAR3 経路の減弱が、絨毛細胞機能の障害を生じて 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。その上で、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の可能性が考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の立案から実験手技、結果の解釈、学会発表、論文執筆まで、あらゆる面において終始御指導・御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 産婦人科学講座の永松健講師に深く感謝の意を表します。また、東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 産婦人科学講座の藤井知行主任教授、大須賀穰教授には、当教室の教授として、研究に御指導・御支援をいただきました。東京大学医学部付属病院検査部の矢富裕教授、増田亜希子先生には、研究の立案から、検体の測定、実験手技、論文執筆まで御支援・御指導をいただきました。東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野の青木淳賢教授、奥平真一先生、可野邦行先生には貴重な抗体の御提供、実験手技、研究内容についての御意見・御指導をいただきました。東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 産婦人科学講座の山下隆博准教授、川名敬准教授には、研究内容について貴重な御意見・御指導をいただきました。ミズーリ大学の Danny J Schust 先生には、研究内容、論文執筆の際に多大なる御指導をいただきました。この場を借りて深甚なる謝意を表します。

研究室でともに実験をして参りました東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 産婦人科学講座の佐山晴亮先生、板岡奈央先生、保谷茉

莉先生には、カンファランスや実験の際に、様々なアドバイスや御協力をいただきました。改めて感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E Receptors*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(16): p. 11613-11617.
2. Okudaira, S., H. Yukiura, and J. Aoki, *Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin*. Biochimie, 2010. **92**(6): p. 698-706.
3. Contos, J.J.A., et al., *Requirement for the lp(A1) lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(24): p. 13384-13389.
4. Inoue, M., et al., *Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 712-718.
5. Pasternack, S.M., et al., *G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 329-334.
6. Shimomura, Y., et al., *Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p.

335-339.

7. Tanaka, M., *Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(35): p. 25822-25830.
8. van Meeteren, L.A., et al., *Autotaxin, a Secreted Lysophospholipase D, Is Essential for Blood Vessel Formation during Development*. Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**(13): p. 5015-5022.
9. Nakasaki, T., et al., *Involvement of the Lysophosphatidic Acid-Generating Enzyme Autotaxin in Lymphocyte-Endothelial Cell Interactions*. The American journal of pathology, 2008. **173**(5): p. 1566-1576.
10. Mills, G.B. and W.H. Moolenaar, *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(8): p. 582-591.
11. Tager, A.M., et al., *The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 45-54.
12. Hama, K., *Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(17): p. 17634-17639.

13. Nakamura, K., et al., *Suppression of lysophosphatidic acid and lysophosphatidylcholine formation in the plasma in vitro: Proposal of a plasma sample preparation method for laboratory testing of these lipids*. Analytical Biochemistry, 2007. **367**(1): p. 20-27.
14. Nakamura, K., et al., *Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation*. Clinica Chimica Acta, 2008. **388**(1–2): p. 51-58.
15. Masuda, A., et al., *Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma*. British Journal of Haematology, 2008. **143**(1): p. 60-70.
16. van Meeteren, L.A. and W.H. Moolenaar, *Regulation and biological activities of the autotaxin–LPA axis*. Progress in Lipid Research, 2007. **46**(2): p. 145-160.
17. Stracke, M.L., *Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(4): p. 2524-2529.
18. Tokumura, A., *Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma*. Biochimica et biophysica acta, 1986. **875**(1): p. 31-38.

19. Umezū-Goto, M., et al., *Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production*. The Journal of Cell Biology, 2002. **158**(2): p. 227-233.
20. Tokumura, A., et al., *Identification of Human Plasma Lysophospholipase D, a Lysophosphatidic Acid-producing Enzyme, as Autotaxin, a Multifunctional Phosphodiesterase*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(42): p. 39436-39442.
21. Aoki, J., *Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(50): p. 48737-48744.
22. Allende, M.L., T. Yamashita, and R.L. Proia, *G-protein-coupled receptor SIP1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation*. Vol. 102. 2003. 3665-3667.
23. van Corven, E.J., et al., *Lysophosphatidate-induced cell proliferation: Identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins*. Cell, 1989. **59**(1): p. 45-54.
24. Spiegel, S. and S. Milstien, *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 397-407.

25. Hecht, J.H., *Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex.* The Journal of Cell Biology, 1996. **135**(4): p. 1071-1083.
26. An, S., *Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid.* The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(14): p. 7906-7910.
27. Bandoh, K., *Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid.* The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(39): p. 27776-27785.
28. Lee, C.-W., *LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation.* The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(7): p. 4310-4317.
29. Noguchi, K., *Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family.* The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(28): p. 25600-25606.
30. Yanagida, K., *LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line.* The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(8): p. 5814-5824.



31. Kotarsky, K., *Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2006. **318**(2): p. 619-628.
32. Lee, C.-W., *GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(33): p. 23589-23597.
33. Ye, X., et al., *LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 104-108.
34. Lee, Z., et al., *Role of LPA(4)/p2y9/GPR23 in Negative Regulation of Cell Motility*. Molecular Biology of the Cell, 2008. **19**(12): p. 5435-5445.
35. Eiland, E., *Preeclampsia 2012*. Journal of pregnancy, 2012. **2012**(3): p. 586578.
36. 日本妊娠高血圧学会, *妊娠高血圧症候群(PIH)管理ガイドライン 2009*. 2009: メジカルビュー社. 221p.
37. Zhang, J., *Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States*. Hypertension in Pregnancy, 2003. **22**(2): p. 203-212.
38. Roberts, J.M. and C.W.G. Redman, *Pre-eclampsia: more than*

- pregnancy-induced hypertension*. The Lancet, 1993. **341**(8858): p. 1447-1451.
39. Benedetto, C., et al., *Synergistic effect of renin-angiotensin system and nitric oxide synthase genes polymorphisms in pre-eclampsia*. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, 2007. **86**(6): p. 678-682.
  40. Lo, J.O., J.F. Mission, and A.B. Caughey, *Hypertensive disease of pregnancy and maternal mortality*. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 2013. **25**(2): p. 124-132 10.1097/GCO.0b013e32835e0ef5.
  41. Thomopoulos, C., et al., *Assisted reproductive technology and pregnancy-related hypertensive complications: a systematic review*. J Hum Hypertens, 2013. **27**(3): p. 148-157.
  42. Chaouat, G., et al., *Implantation: can immunological parameters of implantation failure be of interest for pre-eclampsia?* Journal of Reproductive Immunology, 2003. **59**(2): p. 205-217.
  43. McMaster, M.T., Y. Zhou, and S.J. Fisher, *Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia*. Seminars in Nephrology, 2004. **24**(6): p. 540-547.
  44. Lim, K.H., *Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia*. The American journal of pathology, 1997. **151**(6): p. 1809-1818.
  45. Granger, J.P., et al., *Pathophysiology of Preeclampsia: Linking Placental*

- Ischemia/Hypoxia with Microvascular Dysfunction*. Microcirculation, 2002. **9**(3): p. 147-160.
46. Masuda, A., et al., *Serum autotaxin measurements in pregnant women: Application for the differentiation of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension*. Clinica Chimica Acta, 2011. **412**(21–22): p. 1944-1950.
  47. Iwasawa, Y., et al., *ORIGINAL ARTICLE: Expression of Autotaxin, an Ectoenzyme that Produces Lysophosphatidic Acid, in Human Placenta*. American Journal of Reproductive Immunology, 2009. **62**(2): p. 90-95.
  48. Xu, R.-H., *BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast*. Nature biotechnology, 2002. **20**(12): p. 1261-1264.
  49. Li, Y., *BMP4 regulation of human trophoblast development*. The International journal of developmental biology, 2014. **58**(2-4): p. 239-246.
  50. Ichiyama, K., et al., *Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- $\beta$  Is Mediated by Suppression of Eomesodermin*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 741-754.
  51. Teicher, B.A., *CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer*. Clinical cancer research, 2010. **16**(11): p. 2927-2931.
  52. Jaleel, M.A., *Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signalling regulates human*

- placental trophoblast cell survival*. Molecular human reproduction, 2004. **10**(12): p. 901-909.
53. Wu, X., *The expression of CXCR4/CXCL12 in first-trimester human trophoblast cells*. Biology of Reproduction, 2004. **70**(6): p. 1877-1885.
  54. Achache, H., *Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization*. Fertility and sterility, 2010. **94**(4): p. 1271-1278.
  55. Wei, Q., *Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis*. Fertility and sterility, 2009. **91**(5): p. 1686-1691.
  56. Parhar, R.S., S. Yagel, and P.K. Lala, *PGE2-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential anti-trophoblast activity*. Cellular Immunology, 1989. **120**(1): p. 61-74.
  57. Nagamatsu, T., *The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface*. Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.), 2010. **17**(3): p. 209-218.
  58. Roberts, J.M. and C. Escudero, *The placenta in preeclampsia*. Pregnancy

Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health, 2012.

**2**(2): p. 72-83.

59. Levine, R.J., *Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia*. The New England journal of medicine, 2004. **350**(7): p. 672-683.
60. Nagamatsu, T., *Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia*. Endocrinology (Philadelphia), 2004. **145**(11): p. 4838-4845.
61. Ptaszynska, M.M., *Positive feedback between vascular endothelial growth factor-A and autotaxin in ovarian cancer cells*. Molecular cancer research, 2008. **6**(3): p. 352-363.
62. Wei, H., *Lysophosphatidic acid promotes secretion of VEGF by increasing expression of 150-kD Oxygen-regulated protein (ORP150) in mesenchymal stem cells*. Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids, 2013. **1831**(8): p. 1426-1434.

## 図 表

表 1. 妊娠高血圧症候群の病型分類

①妊娠高血圧腎症	妊娠 20 週以降に初めて高血圧が発症し、かつ蛋白尿を伴うもので分娩後 12 週までに正常に復する場合。
②妊娠高血圧	妊娠 20 週以降に初めて高血圧が発症し、分娩後 12 週までに正常に復する場合。
③加重型妊娠高血圧腎症	<p>(1) 高血圧症が妊娠前あるいは妊娠 20 週までに存在し、妊娠 20 週以降蛋白尿を伴う場合。</p> <p>(2) 高血圧と蛋白尿が妊娠前あるいは妊娠 20 週までに存在し、妊娠 20 週以降、いずれかまたは両症状が増悪する場合。</p> <p>(3) 蛋白尿のみを呈する腎疾患が妊娠前あるいは妊娠 20 週までに存在し、妊娠 20 週以降に高血圧が発症する場合。</p>
④子癇	妊娠 20 週以降に初めて痙攣発作を起こし、てんかんや二次性痙攣が否定されるもの。

表 2. 妊娠高血圧症候群の重症度分類

軽症	<p>血圧：次のいずれかに該当する場合</p> <p>収縮期血圧：140mmHg 以上、160mmHg 未満の場合</p> <p>拡張期血圧：90mmHg 以上、110mmHg 未満の場合</p> <p>蛋白尿：<math>\geq 300\text{mg/日}</math>、<math>&lt; 2\text{g/日}</math></p>
重症	<p>血圧：次のいずれかに該当する場合</p> <p>収縮期血圧：160mmHg 以上の場合</p> <p>拡張期血圧：110mmHg 以上の場合</p> <p>蛋白尿：蛋白尿 <math>2\text{g/日}</math> 以上の場合</p>

表 3. 妊娠高血圧症候群の発症時期による分類

早発型 (early onset type;E0)	妊娠 32 週未満に発症するもの
遅発型 (late onset type;L0)	妊娠 32 週以降に発症するもの

表 4. 正常群、PIH 群の臨床的特徴

	正常群(n=20)	PIH群 (n=21)	P 値
母体年齢 (歳)	33.5±5.4	34.8±5.4	n.s.
分娩週数(週)	38.2±0.65	35.9±2.9	<0.01
母体身長(m)	1.58±0.04	1.60±0.05	n.s.
非妊時母体体重(kg)	51.1±9.2	58.8±14.0	n.s.
妊娠中の母体体重増加(kg)	10.1±3.8	7.7±4.8	n.s.
胎児出生体重(g)	2913±306	2036±753	<0.01
胎盤重量(g)	549±135	372±125	<0.01

n.s. ; not significant

表 5. PIH 群における早発型症例、遅発型症例の臨床的特徴

	早発型(n=8)	遅発型(n=13)	P 値
母体年齢 (歳)	34.88±3.87	34.77±6.31	n.s.
分娩週数 (週)	33.18±1.20	37.54±2.31	<0.01
母体身長 (cm)	160.13±4.85	160.59±4.74	n.s.
非妊時母体体重 (kg)	60.38±15.99	57.86±13.16	n.s.
妊娠中母体体重増加 (kg)	7.48±3.77	7.83±5.44	n.s.
出生体重 (g)	1362.38±320.32	2451.08±628.38	<0.01
胎盤重量(g)	256.00±61.02	443.46±96.29	<0.01

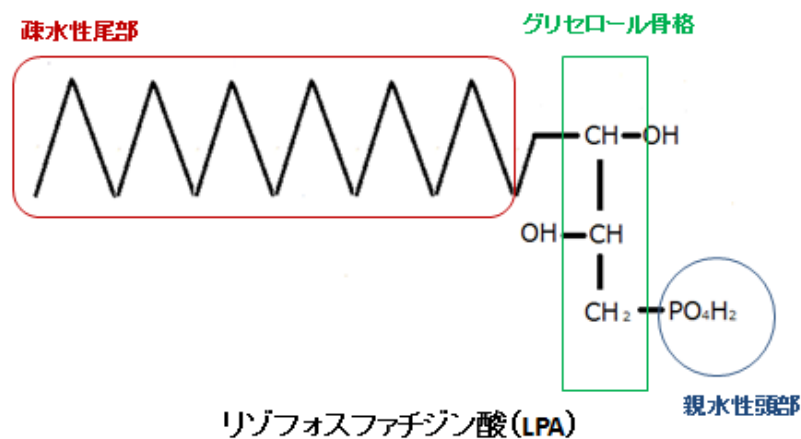
n.s. ; not significant

表 6. PIH 群における発症時期・重症度・子宮内胎児発育遅延の内訳

発症時期による分類	早発型 8 例	遅発型 13 例
重症度分類	重症 10 例	軽症 11 例
子宮内胎児発育遅延の有無	有 12 例	無 9 例

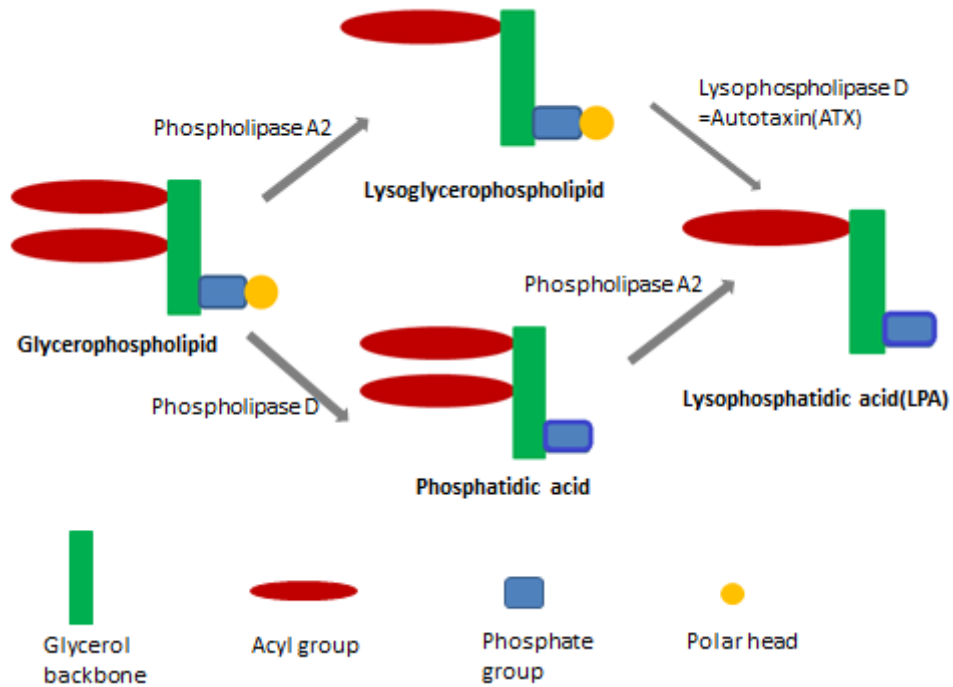


図 1. LPA の構造



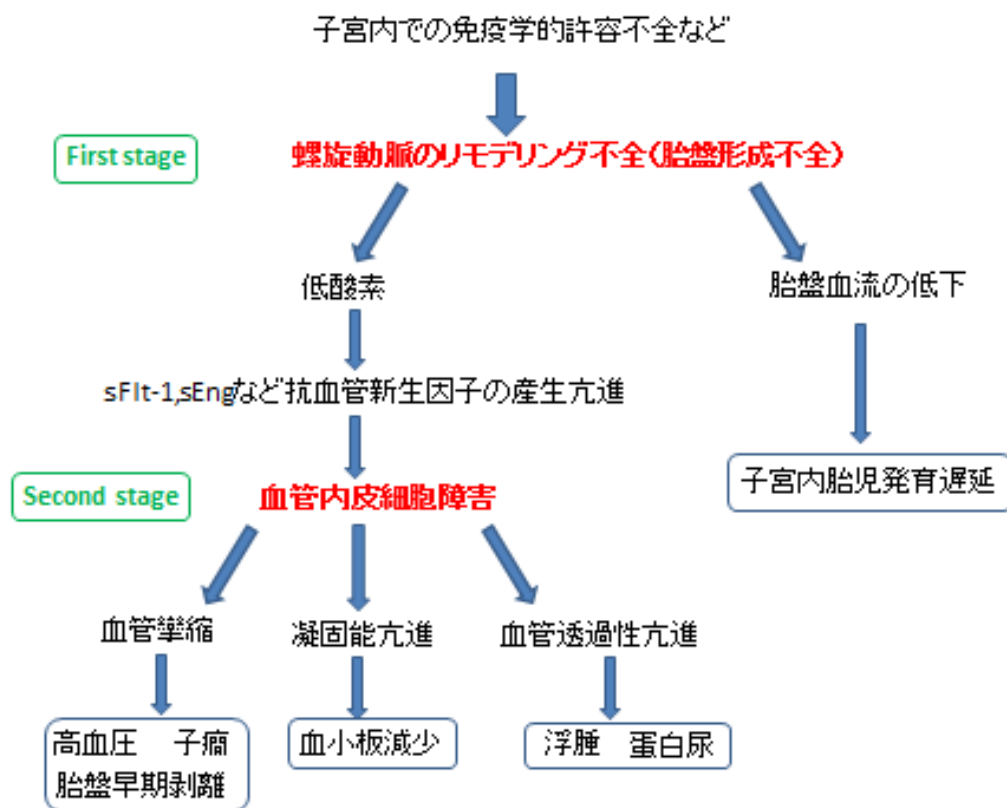
リゾリン脂質は、第二世代の脂質メディエーターであり、構造による分類としては、グリセロール骨格とスフィンゴシン骨格を有するものの 2 種類に大別される。リゾフォスファチジン酸 (LPA) は、グリセロール骨格にリン酸と脂肪酸が一つずつ結合した、リゾリン脂質の代表格である。(図は、増田亜希子著「生理活性脂質リゾフォスファチジン酸産生酵素としてのオートタキシン～臨床検査への応用に向けて～」より一部改編して引用)

図 2. LPA の産生経路



LPA の主な生合成経路は、上図の通り 2 種類報告されているが、血中に存在する リゾフォスファチジルコリン (LPC) がリゾホスホリパーゼ D 活性を持つ酵素オートタキシン (ATX) によって LPA に変換させる経路が、特に注目されている。

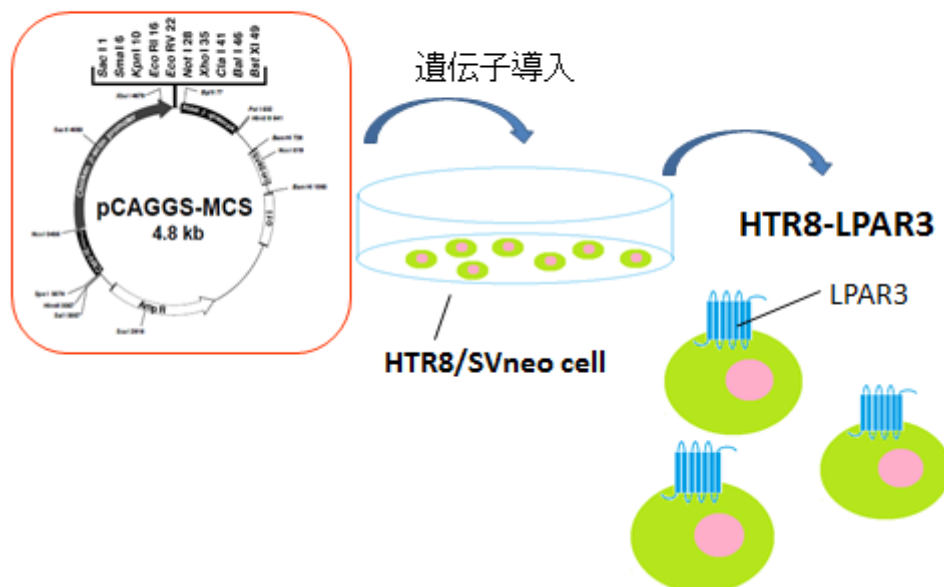
図 3. PIH の発症メカニズム (two-stage disorder)



PIH の病因については「two stage disorder」と言われる基本的概念が確立してきている。First stage で、遺伝的因子や免疫学的異常などにより妊娠初期の胎盤形成不全、胎盤虚血が生じ、Second stage で酸化ストレスを受けた胎盤より産生された抗血管新生因子が母体血中に流入し、母体の血管内皮障害を惹起し、それに基づく様々な症状が出現するとの説である。

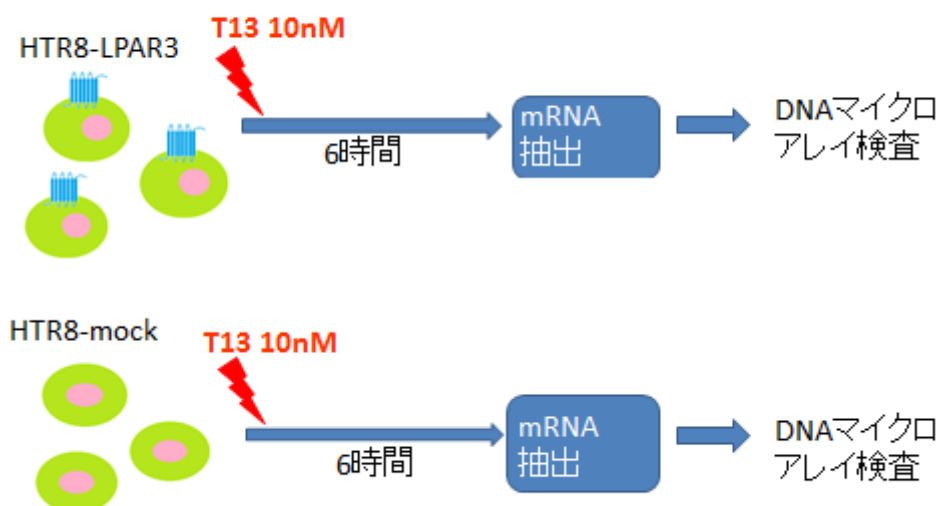
図 4. 絨毛細胞株への LPAR3 遺伝子導入

### Human LPAR3 vector



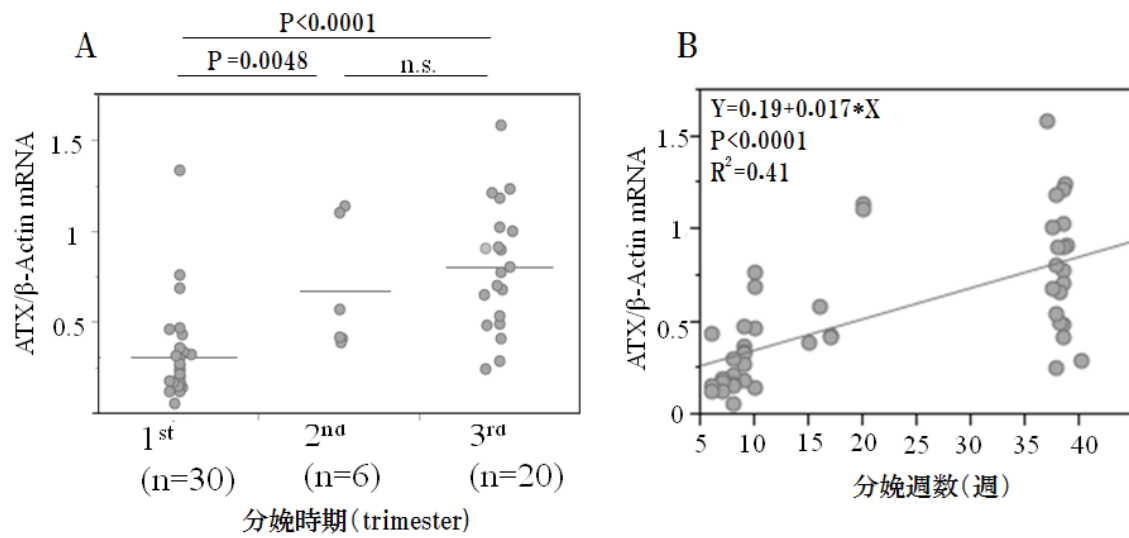
大腸菌に導入した humanLPAR3(Edg7)-pCAGGS(1mg/ml)を培養したのち、プラスミド DNA を抽出した。約 70%コンフルエントになった HTR8/SVneo 細胞に、Lipofectamine®2000Transfection Reagent を用いて LPAR3 を導入したプラスミドを遺伝子導入した。

図 5. 実験プロトコール



LPAR3 を遺伝子導入した HTR8/SVneo(HTR8-LPAR3)とコントロールベクターを遺伝子導入した HTR8/SVneo(HTR8-mock)に、LPAR3 特異的アゴニスト T13 10nM を添加し刺激した。添加 6 時間後に全 RNA を抽出し、全遺伝子型 DNA チップを用いて解析した。

図 6. 正常妊婦の胎盤における ATX 発現量の推移



A, 妊娠初期、中期、後期における正常妊婦の胎盤での ATX 発現量の推移

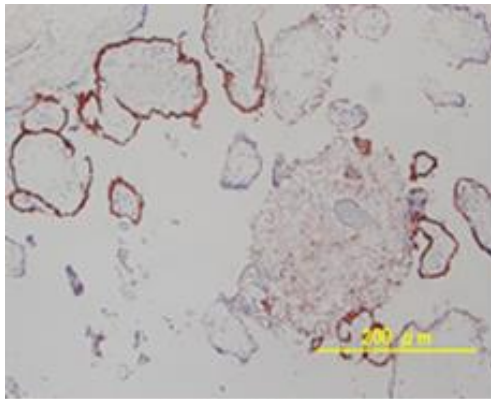
B, 分娩週数による正常妊婦の胎盤での ATX 発現量の推移

A の 3 群各々に引かれた bar は平均値を示す。n.s.; not significant

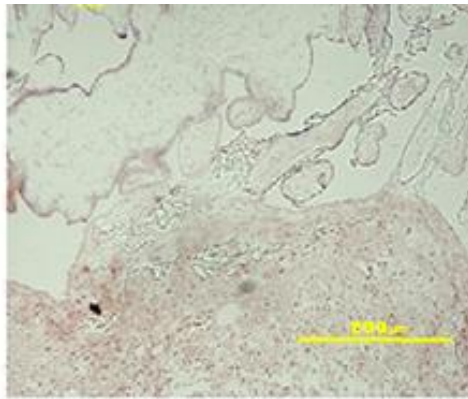
B では、分娩週数とそれに対応する ATX 発現量が一次方程式で表せることを示している。

図 7. 妊娠初期、中期、後期における胎盤の LPAR3 発現

A



B



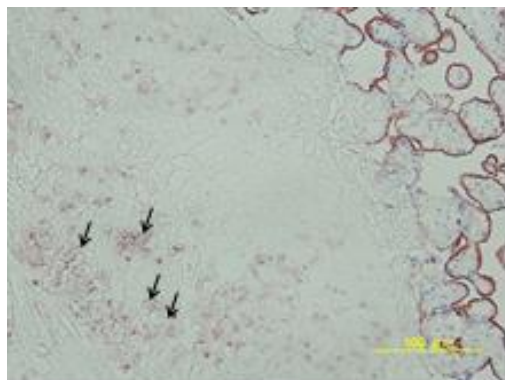
C

妊娠初期 (A 妊娠 9 週)、妊娠中期 (B 妊娠 18 週)、妊娠後期 (C 妊娠 38 週) のヒト胎盤を、ラット抗ヒト LPAR3 抗体 (EDG7 抗体、1mg/ml) にて免疫染色した。絨毛細胞はラット抗ヒト LPAR3 抗体 (800 倍希釈) で染色され、ネガティブコントロールとしてアイソタイプ抗体を用いて確認した。それぞれの群で代表的なスライドを図に示した。

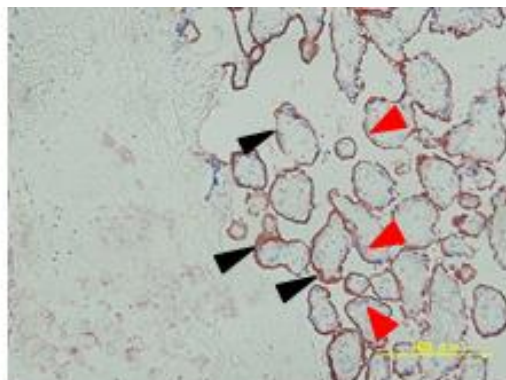
図 8. 妊娠後期の胎盤における LPAR3 の発現（正常胎盤と PIH 胎盤）

正常胎盤

脱落膜

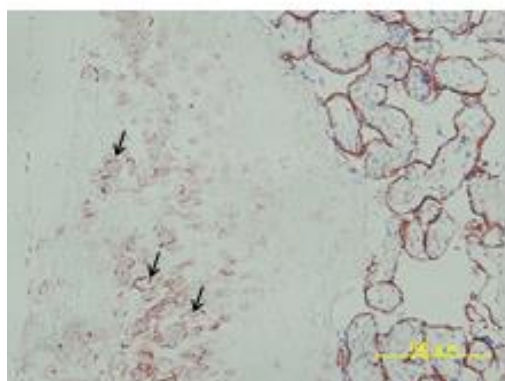


絨毛

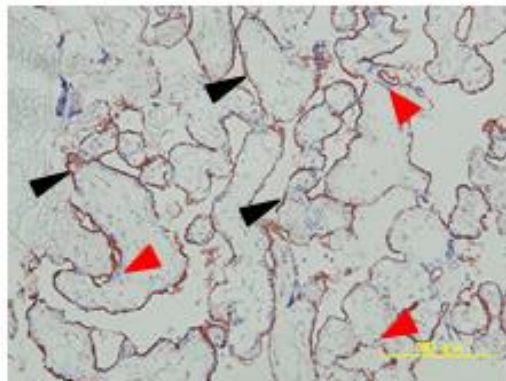


PIH 胎盤

脱落膜



絨毛



妊娠後期（妊娠 38 週）のヒト胎盤を、ラット抗ヒト LPAR3 抗体（EDG7 抗体、1mg/ml）で免疫染色し、それぞれの群で代表的なスライドを図に示した。脱落膜では、extra-villous trophoblast（図の黒矢印で示している）に局限して LPAR3 の発現が認められた。

絨毛では、外側の syncytiotrophoblast に LPAR3 が強く発現しているのに対し、内側の cytotrophoblast には発現が認められなかった。syncytiotrophoblast は図の黒印で示し、cytotrophoblast は図の赤印で示している。

正常胎盤と PIH 胎盤において、免疫染色では LPAR3 の発現に明らかな差は認めなかった。



図 9. 絨毛細胞における ATX, LPAR3 発現状況のまとめ

	CT	ST	EVT	
ATX	+	+	+	Iwasawa et al. AJR 2009
LPAR3	-	++	+	

CT : cytotrophoblast      ST : syncytiotrophoblast

EVT : extra-villous trophoblast

ATX は全ての絨毛細胞に発現しているのに対し、LPAR3 は syncytiotrophoblast, extra-villous trophoblast に限局して発現していた。ATX 発現の結果は、文献 47 より引用した。

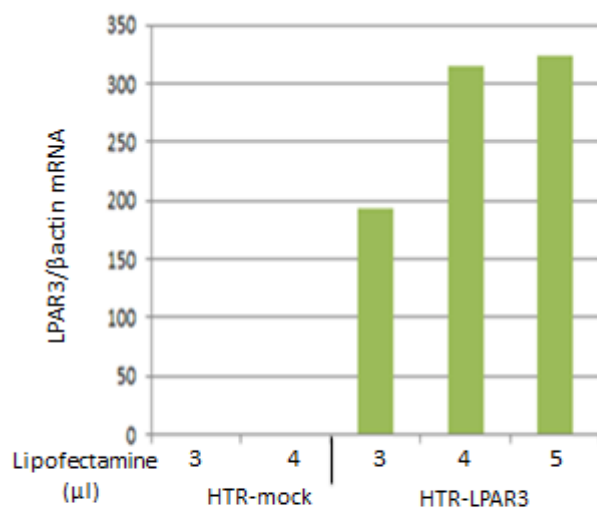
図 10. 各種絨毛細胞由来株における ATX, LPAR3 の発現

	HTR8/SVneo	JEG3	BeWo
ATX mRNA	+	-	-
LPAR3 mRNA	+	+	+
ATX 免疫染色	-	-	-
LPAR3 免疫染色	-	+	-

絨毛細胞由来株 HTR8/SVneo、JEG3、BeWo を用いて、各々における ATX、LPAR3 の発現様式を mRNA レベル、蛋白レベルで調べた。HTR8/SVneo での ATX、LPAR3 の発現様式が、ヒト胎盤における ATX、LPAR3 発現様式に最も類似していた。

## 図 11. LPAR3 強制発現系の確認

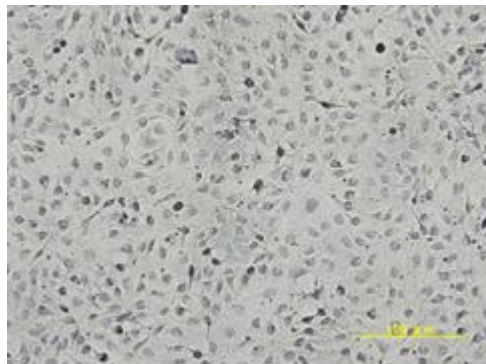
### A. mRNA レベルでの確認



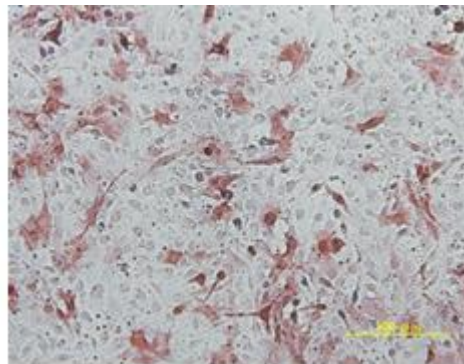
HTR8/SVneo 細胞にコントロールベクターを導入したもの（HTR-mock）と LPAR3 遺伝子を導入したもの（HTR-LPAR3）を、RT-PCR 法を用いて LPAR3mRNA 量を比較した。HTR-LPAR3 での LPAR3 発現量は、HTR-mock に比較して約 200～300 倍に上昇していた。

B. 蛋白レベルでの確認

HTR-mock

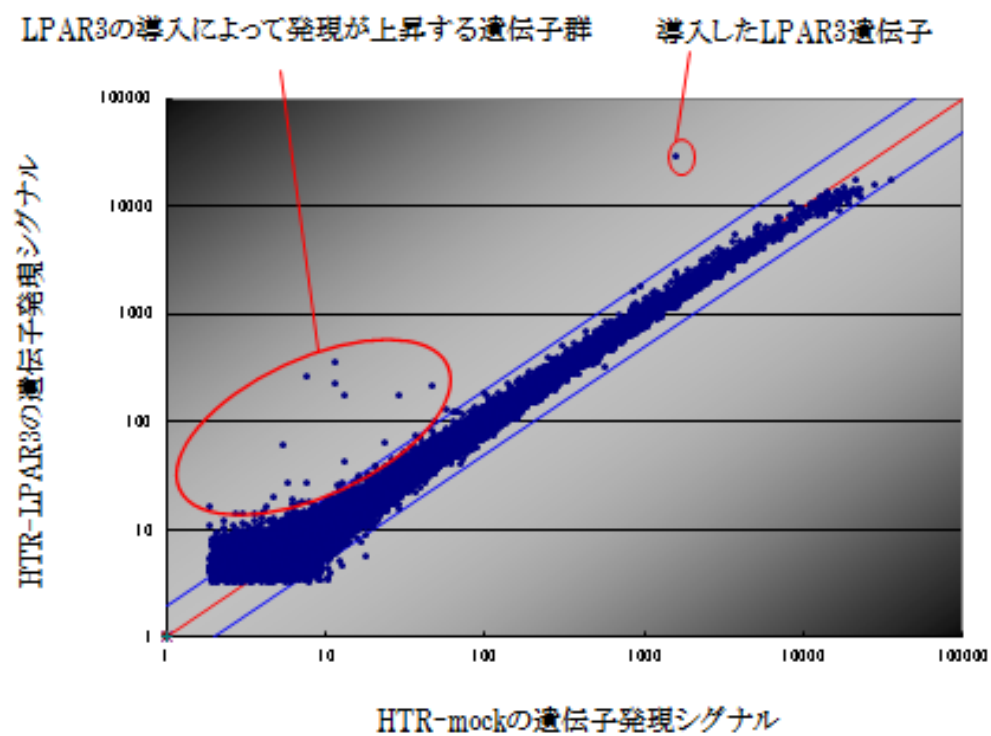


HTR-LPAR3



HTR8/SVneo 細胞にコントロールベクターを導入したもの（HTR-mock）と LPAR3 遺伝子を導入したもの（HTR-LPAR3）を、ラット抗ヒト LPAR3 抗体（EDG7 抗体、1mg/ml）を用いて免疫染色した。HTR-mock では LPAR3 の染色がほとんど見られなかったのに対し、HTR-LPAR3 では染色を認めた。

図 12. マイクロアレイ検査



縦軸を HTR-LPAR3 の遺伝子発現シグナル、横軸をコントロールである HTR-mock の遺伝子シグナルとした。LPAR3 強制発現によって発現が上昇している遺伝子群を赤のラインで囲んだ。

図 13. Pathway 解析結果 (LPAR3 刺激により発現上昇が生じた遺伝子集団の解析)

シグナル比 が2倍以上 亢進している遺伝子：27456遺伝子中480個



有意な変化 (Z score>2.0)を認めた複数の遺伝子を含む  
Pathway： 18種類

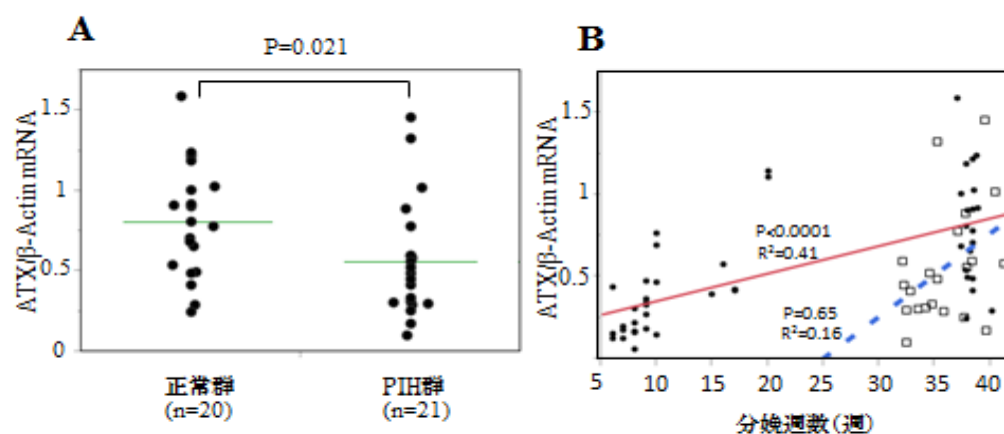


胎盤形成・妊娠維持との関連が推測されるもの

- ・ イコサノイド産生関連遺伝子  
Prostaglandin G/H synthase 2 (COX2)  
Prostaglandin E2 receptor EP2
- ・ サイトカイン・ケモカイン遺伝子  
IL-6, IL-8, IL-15  
CXCL2(GRO- $\beta$ ), CXCL3(MIP2),  
CXCL12(SDF-1)
- ・ 絨毛細胞の分化関連遺伝子  
Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)  
EOMES

マイクロアレイ検査の結果に基づき、特に機能的な関連性の強い遺伝子群をまとめた Pathway 解析を行った。Z score>2.0 の有意な変化を認めた複数の遺伝子を含む Pathway は全部で 18 種類存在し、その中で妊娠維持や胎盤形成と関連性の強い遺伝子を抽出した。

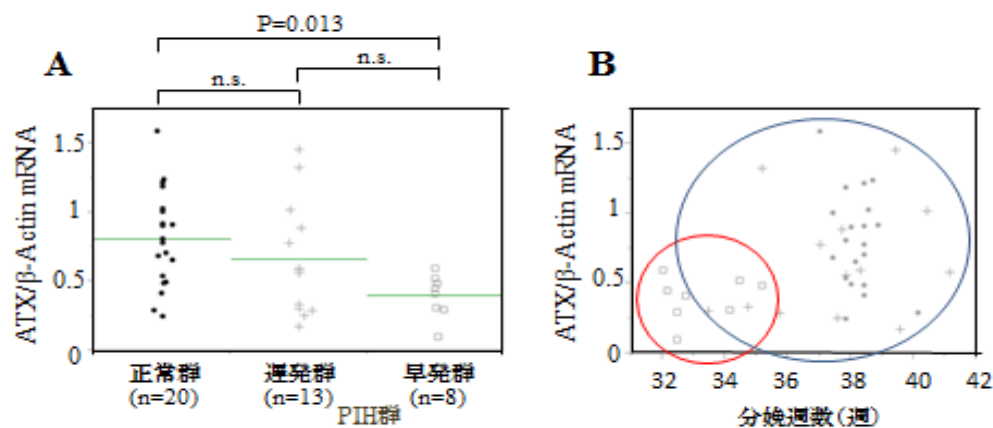
図 14.正常群と PIH 群における胎盤の ATXmRNA 発現量の比較



A.20 名の正常群、21 名の PIH 群を対象として、RT-PCR 法を用いて胎盤における ATXmRNA 量を測定し、Mann-Whitney U 検定を用いて検討した。PIH 群は正常群に比較して、有意に胎盤の ATXmRNA 量が低値であった。

B.胎盤における ATX 発現量は妊娠週数が進むにつれ増加するため、分娩週数を横軸に取り、単回帰分析を用いて正常群と PIH 群の ATXmRNA 量を比較した。正常群 (●) の推移は 1 次直線 (赤線) となったが、PIH 群 (□) では分娩週数との有意な相関は認めず (青点線)、正常群よりも低値を示すものがほとんどであった。

図 15. PIH 胎盤における ATXmRNA 発現量の、PIH 発症時期での比較



A. 20 名の正常群、13 名の遅発群（LO）、8 名の早発群（EO）を対象として、RT-PCR 法を用いて ATXmRNA 量を測定し、Steel-Dwass 検定を用いて検討した。有意差は認めないものの、EO 群の方が LO 群よりも低い傾向を示した。

B. 分娩週数との関係を見ると、早発群の ATX 発現量(□)は、ほとんどばらつきなく低値に分布していたが、遅発群（+）ではばらつきが大きかった。