

シンポジウム2 ヒト絨毛細胞の機能とその異常

絨毛細胞の糖輸送機構の解析

大阪大学講師 坂 田 正 博

目 的

胎児は、その発育に不可欠な糖やアミノ酸をはじめとする栄養物質を母体の血液から供給を受ける。胎児由来の胎盤絨毛は、母体の血液に接し血液胎盤関門を形成する。その絨毛細胞の母体側は微絨毛で構成され細胞膜の物質輸送を担っている。胎児のエネルギー源として必須でかつ重要なグルコースの輸送は、細胞膜に存在する担体すなわちグルコーストランスポーター(以下 GLUT)を介する促進拡散によって行われる。グルコースは、この GLUT により単純拡散よりもずっと速く、濃度勾配に従って細胞膜を通過する。本研究では、胎児のエネルギー源であるグルコースを非常に精微に母体側から胎児側に供給する糖輸送機構に関して、胎盤における GLUT の種類とその局在、糖尿病性高血糖環境下での GLUT の役割、絨毛細胞の分化に伴う糖輸送機構の変動、絨毛細胞の GLUT の発現制御に関する基礎的研究等について、詳細な検討を加えることにより、母体より胎児に向けて供給される糖輸送機構の解明を目指す。

方 法

A. ヒト胎盤絨毛における GLUT の妊娠中の変動・局在の分析

(1) ヒト胎盤絨毛における妊娠中の GLUT の変動
ヒト胎盤絨毛を用いた Northern blot 解析で GLUT1 と GLUT3 の存在が示された。そこで、妊娠中のヒト胎盤絨毛における GLUT1 と GLUT3 の発現量の変動を解析するために、妊娠初期・中期・後期の胎盤を用いて、³H-cytochalasin B 結合実験によって糖輸送能を定量し、また GLUT1, GLUT3 の Western blot 解析, Northern blot 解析を行った。

(2) ヒト胎盤絨毛組織における GLUT の局在
ヒト胎盤絨毛組織における GLUT の局在を明らかにするために、抗 GLUT1 抗体及び抗 GLUT3

抗体を用いて、光顕・電顕による免疫組織化学染色法を行った。

B. 糖尿病合併妊娠における胎盤の糖輸送に関する研究

糖尿病合併妊娠では、胎児や胎盤も高血糖環境下におかれ、胎児・新生児合併症が増加する。この環境下での GLUT の役割・意義を検討した。

(1) 糖尿病合併妊娠における胎盤 GLUT の発現制御の実験的解析モデル

マウスの初代絨毛細胞培養系を用いて、高濃度のグルコースが GLUT レベルに及ぼす影響について調べた。同時にストレプトゾトシンを用いて、糖尿病合併妊娠モデルマウスを作成し、高血糖が胎盤の GLUT レベルに及ぼす影響を解析した。

(2) 糖尿病合併妊娠におけるヒト絨毛 GLUT 量の変動

患者の同意のもとに、中絶手術時に採取された糖尿病合併妊娠の絨毛を用いて³H-cytochalasin B 結合実験を行い、絨毛 GLUT 量を測定した。

C. 絨毛細胞の GLUT の発現制御に関する基礎的研究

(1) cAMP による絨毛細胞の分化に伴う GLUT レベルの変動

cAMP はマウスやヒト絨毛細胞の重要な分化誘導因子のひとつである。cAMP 添加によってヒトでは、絨毛細胞の合胞化すなわち形態的分化の促進と、絨毛細胞からの hCG 分泌の増加すなわち機能的分化の促進が起こる。この cAMP による分化能を有するヒト絨毛癌細胞株(BeWo)を用いて、この分化に伴う GLUT1 レベルの変動をグルコースの取り込み実験, Western blot 解析, Northern blot 解析から検討した。

(2) 絨毛細胞における GLUT の発現制御機構の解明

筋肉芽細胞での GLUT1 promoter 領域を含む

reporter 遺伝子導入の成績から、その中の Sp1 site が重要であることが示されている。ラット絨毛癌細胞株(Rcho-1)を用いて、ラット GLUT1 の promoter 領域(-2107 bp)を含む CAT reporter 遺伝子を導入し、その転写の基礎的レベルの発現に重要な因子の検索を行った。また、その promoter 領域の cAMP 応答可能性の有無について解析を加えた。

成 績

A. ヒト胎盤絨毛における GLUT の妊娠中の変動・局在の分析

(1) ヒト胎盤絨毛における妊娠中の GLUT の変動

妊娠初期・中期・後期の胎盤を用いたところ、グルコース輸送能及び GLUT1 蛋白量は、胎児のグルコース必要量が増加する妊娠後期にともに最大となった。また胎盤の GLUT1 mRNA 量は妊娠後期に、GLUT3 mRNA 量は妊娠初期にそれぞれ最大となった。

(2) ヒト胎盤絨毛組織における GLUT の局在

免疫蛍光組織化学染色法を用いて、光顕的に観察したところ主として GLUT1 は syncytiotrophoblast に、GLUT3 は cytotrophoblast に局在した。さらに、電顕的観察を加えると、GLUT1 の免疫活性は syncytiotrophoblast の微絨毛と傍基底細胞膜にのみ存在した。

B. 糖尿病合併妊娠における胎盤の糖輸送に関する研究

(1) 糖尿病合併妊娠における胎盤 GLUT の発現制御の実験的解析モデル

絨毛細胞の培養系で、高濃度のグルコースは、時間・濃度依存性に GLUT1 の mRNA 及び蛋白発現量を抑制し、グルコースの細胞内への取り込みも抑制した。ストレプトゾトシンを用いた糖尿病モデルマウスでは、糖尿病群の胎盤で、GLUT1 mRNA 量と蛋白量の有意な減少がみられた。

(2) 糖尿病合併妊娠におけるヒト絨毛 GLUT 量の変動

糖尿病群では対照群に比し、絨毛中の総 GLUT 量は低い傾向がみられた。

C. 絨毛細胞の GLUT の発現制御に関する基礎的研究

(1) cAMP による絨毛細胞の分化に伴う GLUT レベルの変動

ヒト絨毛癌細胞株では、cAMP 添加による細胞の合胞化と hCG 分泌の増加と並行して、グルコースの取り込みが促進され、GLUT1 蛋白量及び mRNA 量が増加したが、GLUT3 レベルの有意な変動はみられなかった。

(2) 絨毛細胞における GLUT の発現制御機構の解明

Deletion mutants の解析から -99 bp から -33 bp に GLUT1 の転写の基礎レベルを制御している領域が存在すると考えられた。electrophoretic mobility shift 法の成績から、その領域には Sp1 が結合できる部位が 2 カ所存在することが明らかとなった。Expression vector を用いて Sp1 を過剰発現すると、GLUT1 の基礎転写は促進された。また、細胞内の cAMP を上昇させる forskolin を添加すると、GLUT1 の転写活性の上昇がみられた。

結 論

ヒト胎盤の糖輸送に関して、その担体である GLUT1 は syncytiotrophoblast に、GLUT3 は cytotrophoblast にそれぞれ局在することが明らかとなり、妊娠後期に優位になる GLUT1 を介する捉通拡散が、グルコース輸送において、主たる役割をしていることが示された。さらに、血液脳関門が存在する脳と同様に高血糖環境下では、胎盤にはグルコースの関門を狭め胎児を保護するという合目的な機構が存在することが示唆された。

cAMP が絨毛細胞の GLUT1 の発現に関わる制御因子のひとつであることが明らかとなった。また絨毛細胞の形態的・機能的分化に伴う GLUT1 の発現の成績から、GLUT1 がヒト絨毛細胞の機能的分化の指標である可能性が示された。絨毛細胞における GLUT1, GLUT3 の発現制御機構を検討することは、ヒト絨毛細胞の機能とその異常の一端を解明し、またそれらの転写因子などの解析が、絨毛細胞の分化における分子制御機構の解明に繋がると期待される。