

シンポジウム2 ヒト絨毛細胞の機能とその異常

栄養代謝関連因子ならびにアポトーシス関連因子によるヒト絨毛細胞 増殖能と機能発現の調節：その絨毛病態への関わり

神戸大学医学部附属病院周産母子センター助教授 松 尾 博 哉

目 的

絨毛細胞には、絨毛上皮を形成する細胞性栄養膜細胞(cytotrophoblast：C細胞)と合体体栄養膜細胞(syncytiotrophoblast：S細胞)、母体脱落膜へ侵入する絨毛外栄養膜細胞(extravillous trophoblast：EVT)の3種類がある。C細胞はfusionにより多核のS細胞に分化をとげ、S細胞は種々の分化機能を獲得し妊娠維持機構の中で中心的役割を果たす。一方、EVTの役割はいまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、これら3種類の絨毛細胞の妊娠経過に伴う増殖、分化とアポトーシス発現の推移を明らかにし、栄養代謝関連因子とアポトーシス関連因子によるその調節機構を解析した。栄養代謝関連因子としては妊娠性高脂血を踏まえてperoxisome proliferator(PP)に注目し、アポトーシス関連因子としてはbcl-2 family, Fas/Fas-L, p53に着目した。また、絨毛細胞機能異常の分子機構を探るために、妊娠中毒症(pregnancy induced hypertension：PIH)胎盤ならびに腫瘍性絨毛細胞での栄養代謝関連因子とアポトーシス関連因子の発現動態を正常絨毛細胞でのそれと比較検討した。

方 法

I. 絨毛性栄養膜細胞の機能発現調節因子の解析

1) 絨毛性栄養膜細胞の増殖、分化とアポトーシス発現：増殖能は³H-thymidine ラベリングとproliferating cell nuclear antigen(PCNA)染色により検討し、妊娠極めて初期(4~5週)、早期(6~12週)、中期(16~20週)、末期(37~41週)のPCNA陽性比率を算出した。分化機能はin situ hybridization法によるhCG(α , β), hPL mRNA 発現とNorthern blot法によるLDL, VLDL-R mRNA 発現を調べた。アポトーシス発現は電顕的に確認後、TUNEL法によりその発現陽性率を検討し、アポトーシス関連因子のBcl-2蛋白とp53発現を調べ

た。また、末期胎盤よりC細胞を分離培養し、分化に伴うBcl-2蛋白発現を観察した。

2) 妊娠時脂質代謝の特性とPPによる絨毛細胞機能の調節：正常妊娠とPIH妊婦の血中脂質分画を測定し、ガスクロマトグラフィにより赤血球膜脂肪酸組成を分析した。多価不飽和脂肪酸やPPによる絨毛細胞機能発現調節を調べるために、PPであるclofibric acid(CA)の絨毛癌細胞株JEG-3細胞機能発現に及ぼす影響を調べた。JEG-3におけるperoxisome proliferator activated receptor(PPAR)の存在を調べ、PPARとretinoid x receptor(RXR)のinteractionについても検討した。

3) bcl-2遺伝子による絨毛細胞機能の調節：Bcl-2蛋白発現を認めないJEG-3細胞にlipofectin法によりbcl-2をtransfectionして、Bcl-2蛋白を過剰発現するJEG-3を作成し、細胞形態、増殖能と分化機能の変化を観察した。

4) PIH胎盤ならびに腫瘍性絨毛細胞での各種因子の発現態度：PIH群におけるPCNA, Bcl-2蛋白とアポトーシス発現を正常胎盤群での成績と比較検討した。また、部分胞状奇胎、胞状奇胎、絨毛癌におけるPCNA, Bcl-2蛋白とアポトーシス発現を正常絨毛細胞の成績と比較検討した。

II. 絨毛外栄養膜細胞の機能発現調節因子の解析

正常妊娠各期胎盤とPIH胎盤でのEVTの脱落膜侵入に伴うBcl-2 family, Fas/Fas-L 発現動態を免疫組織学的に調べ、アポトーシス発現は電顕的に確認後、TUNEL法によりその陽性率を調べた。また、PIH胎盤EVTの脱落膜侵入に伴うMMP-2, 9, TIMP1, 2, fibronectin, integrin familyの発現を正常胎盤でのそれと比較した。EVT細胞培養系を確立し、甲状腺ホルモンがEVTのアポトーシスとVEGF発現に及ぼす影響を検討した。

成 績

1) 絨毛性栄養膜細胞の増殖、分化とアポトーシ

ス発現：増殖能はC細胞のみに認められ、PCNA陽性比率は妊娠極めて初期で最も高く、妊娠経過と共に減少した。分化機能との関わりではC細胞でhCG α mRNA発現を認め、S細胞の分化過程でhCG β とhPL mRNAの発現をみた。LDL-R mRNA発現は妊娠経過中一定で、VLDL-R mRNA発現は妊娠後半に増強した。Bcl-2蛋白とp53はS細胞に局在し、Bcl-2蛋白発現は妊娠末期に向けて増強したが、p53発現は逆に低下した。C細胞培養系ではS細胞への分化とともにBcl-2蛋白発現を認めた。電顕的にアポトーシスが観察され、その陽性率はC細胞、S細胞ともに妊娠極めて初期に高く、妊娠早期以降大きく減少した。

2) 妊娠時脂質代謝の特性とPPによる絨毛細胞機能の調節：正常妊婦の赤血球膜多価不飽和脂肪酸の割合は妊娠経過とともに増加し、PIH妊婦では正常妊婦に比して低値を示した。CAはJEG-3のp53発現を濃度依存的に高め増殖能を抑制した。一方、CAはJEG-3のhCG(α , β) mRNA発現を抑制し、VLDL-R mRNA発現を増強したが、P450 scc mRNA発現やperoxisomal proteinであるsterol carrier protein-2(SCP-2)発現には影響を与えなかった。CAはretinoidsによるhCG(α , β) mRNA発現増強を抑制した。また、JEG-3にPPAR発現を認めたが、その発現はCAやretinoidsによる修飾を受けなかった。

3) bcl-2遺伝子による絨毛細胞機能の調節：JEG-3細胞にBcl-2蛋白を過剰発現させることによって、増殖能が抑制され、一部に単核から中心性多核へ形態変化を示す細胞を認めた。他方、分化機能との関わりでは、hCG産生がmRNAレベルで選択的に抑制されたが、P450sccやSCP-2発現に変化はみられなかった。

4) PIH胎盤ならびに腫瘍性絨毛細胞での各種因子の発現：PIH胎盤では正常に比してPCNA陽性比率は高い傾向を示し、Bcl-2蛋白発現は弱く、アポトーシス発現は有意に高いことを認めた。腫瘍性絨毛細胞では、絨毛癌のPCNA陽性比率が最も高く、胞状奇胎、部分胞状奇胎の順に減少した。Bcl-2蛋白発現は絨毛癌細胞では観察されず、胞状奇胎、部分胞状奇胎の順にその発現は高まった。他方、アポトーシス発現は絨毛癌細胞では極めて低く、胞状奇胎、部分胞状奇胎の順に増加した。

5) EVTの機能発現の調節とその異常：EVTのアポトーシスが電顕的に観察され、その発現陽性率は妊娠末期に比して妊娠早期で高く、脱着膜浅部に比して深部で高いことを認めた。EVTのFas/Fas-L発現はともに脱着膜深部で強く、Bcl-2蛋白発現は逆に脱着膜深部で低かった。脱着膜深部でtrophoblastic cleftを形成するEVTではhPLとBcl-2蛋白の強い発現を認め、アポトーシス発現は低かった。PIH胎盤の脱着膜深部EVTでは正常胎盤でのそれに比して、Bcl-2蛋白発現は弱く、高いアポトーシス発現を示し、また、細胞接着関連分子のfibronectinとintegrin α 5 β 1発現は弱く、TIMP-1の強い発現が観察された。甲状腺ホルモンは培養EVTのFas/Fas-L、アポトーシス発現を抑制し、VEGF発現を高めた。

結 論

1) Bcl-2蛋白はS細胞の機能分化を誘導すると共に、分化したS細胞のアポトーシス抑制を介して妊娠維持に関わると推察され、Bcl-2蛋白発現の障害とPIHの関連が示唆された。

2) 妊娠時の多価不飽和脂肪酸の上昇はPPARを介して絨毛細胞の増殖能を抑制し、分化機能を誘導することが推察された。また、PPARとRXRとの間にinteractionの存在が示唆された。PIH胎盤では多価不飽和脂肪酸による絨毛細胞の分化誘導が障害され、その結果VLDL-R発現が低下し、これが胎児発育の障害につながる可能性が示唆された。

3) 部分胞状奇胎、胞状奇胎、絨毛癌の順に増殖能は高く、アポトーシスは抑制されるが、腫瘍性絨毛細胞でのアポトーシス抑制にはBcl-2蛋白は関与しないことが示唆された。

4) EVTのアポトーシス発現はFas/Fas-Lとbcl-2 familyにより調節され、脱着膜浅部に比して深部のEVTでアポトーシス発現は高いが、脱着膜深部でtrophoblastic cleftを形成するEVTはBcl-2蛋白発現が著しく強く、例外的にアポトーシスから回避されていることを認めた。PIH胎盤では細胞接着関連因子の発現が抑制され、EVTのアポトーシス発現が高まり、EVTの脱着膜侵入が損なわれる可能性が示唆された。また、甲状腺ホルモンはEVTのアポトーシス抑制とVEGF発現促進を介して妊娠初期の胎盤形成に重要な役割を担うことが推察された。