

P1-421 Hypoxia-inducible factor 1 alpha は絨毛外トロフォブラストの血管内皮様分化を制御する

九州大周産母子センター¹, 九州大生体防御医学研究所ゲノム創薬・治療学分野², 九州大³, 埼玉医大総合医療センター⁴, 九州大⁵
 福岡恒太郎¹, 浅野間和夫², 月森清巳¹, 小林裕明³, 関 博之⁴, 竹田 省⁴, 和氣徳夫⁵

【目的】絨毛外トロフォブラスト (EVT) の血管内皮 (EC) 様分化は正常な胎盤形成に必須である。われわれは TNF, VEGF が細胞外マトリクスとともに EVT に血管内皮特異的 integrin 発現を誘導し EC 様分化に関与することを報告した。本研究ではその機構解明を目的として, EC 様分化において特異的に発現が変化する遺伝子として Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1A) を抽出し, その分化誘導に与える影響を検討した【方法】1) ヒト EVT 不死化細胞株 TCL1, ヒト臍帯血管内皮細胞株 HUVEC-C における matrigel 上での微小血管形成 (tube formation: TF) 過程の遺伝子発現変化の差異を micro-array 法で, 2) TCL1 の matrigel 上での TF 能及び 1% 酸素濃度下の HIF1A 発現に HIF1AsiRNA 導入 (一過性発現, 48 時間), 同阻害剤 rapamycin が与える影響をそれぞれ位相差顕微鏡 (400 倍), 間接蛍光抗体法を用いて検討した。検定には unpaired-t test を用いた。【成績】1) matrigel 上で 3 時間, 6 時間培養した HIF1A 遺伝子発現 (対 0 時間比) は TCL1 では 6.05, 4.78 倍, HUVEC-C では 0.78, 1.07 倍であった。2) TCL1 では 6 時間の 1% 酸素暴露に HIF1A 発現が亢進したが, siRNA 導入時, rapamycin 添加時は亢進はみられなかった。matrigel 上で 6 時間培養後に形成された TF 数 (mean±SD) は 1 視野中 12.3±2.9 であったが siRNA 導入時には 2.3±0.6, 50µM の rapamycin 存在下では 0 と有意に減少した (p<0.05)。【結論】1) matrigel 上での TF 時の発現が HUVEC では亢進せず TCL1 で亢進する遺伝子として HIF1A が抽出された。2) TCL1 において低酸素下での HIF1A 誘導及びマトリゲル上での TF が siRNA, rapamycin により抑制されたことから, EVT の EC 様分化制御に HIF1A 遺伝子が重要な役割を有することが示唆された。

P1-422 ヒト Extravillous trophoblast における Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の発現とその調節

名古屋大

城所久美子, 井篁一彦, 山本英子, 高橋典子, 吉田憲生, 中川明子, 山本真規子, 野村誠二, 吉川史隆

【目的】トリプトファン代謝酵素である IDO は胎盤トロホブラストや脱落膜マクロファージ, 樹状細胞に存在し, 局所のトリプトファン枯渇を介して母体 T cell や NK cell を抑制し母児免疫寛容に関与する。今回ヒト extravillous trophoblast (EVT) における IDO の発現調節につき検討した。【方法】1, インフォームドコンセントを得て採取した初期絨毛 (妊娠 6~11 週) を細切, 1 型コラーゲンコートディッシュ上で培養し, 付着絨毛より outgrowth した EVT を CK7 染色で確認した後, IFN-γ を 24~48 時間負荷 (0~100ng/ml) して IDO の発現を免疫組織染色と RT-PCR で検討した。2, ヒト EVT 細胞株 HTR-8/SVneo を用いて IFN-γ を負荷 (0~100ng/ml) 培養し, IDO の誘導を RT-PCR, Western blot, FACS, 酵素活性にて検討し, 他の脱落膜由来サイトカイン負荷時と比較した。又脱落膜組織培養上清添加による IDO の発現誘導についても検討した。【成績】初期絨毛培養において IDO は EVT に存在し IFN-γ 負荷で容量依存性に発現が誘導された。同様に HTR-8/SVneo においても IDO の蛋白及び mRNA 発現は IFN-γ の負荷で容量, 時間依存性に増強されるが, TNF-α, IL-1, LIF による発現増強は認めなかった。一方初期脱落膜培養上清の添加でも IDO 発現が誘導され, 抗 IFN-γ 中和抗体の同時添加により抑制された。【結論】胎盤形成期の EVT に, 脱落膜免疫細胞由来の IFN-γ により IDO が発現誘導されることが明らかとなり, EVT 自身の IDO が母児免疫寛容機構に役割を果たす可能性が示唆された。

P1-423 ヒト妊娠初期における胎盤の絨毛外栄養細胞とオートファジーとの関連

富山大

立松美樹子, 中島彰俊, 斎藤 滋

【目的】妊娠初期の胎盤形成過程において, 絨毛外栄養細胞 (EVT) 周囲の環境は, 低酸素・低栄養状態であることが知られており, そのような環境においても, なぜ細胞の恒常性が保持されるかは未だ不明である。今回我々は, 細胞恒常性保持機構である autophagy (AP) に着目し, その誘導について検討した。【方法】EVT の細胞株として HTR8/SV40neo 及び絨毛癌の細胞株である BeWo, 上皮系羊膜初代培養細胞を用いて比較した。AP に特異的に発現する LC3 を可視化するため, GFP-LC3 アデノウイルスベクターを細胞に transfection した。低栄養条件下 (Hanks solution: HS), 及び低酸素条件下で培養し, LC3 の細胞内局在を蛍光顕微鏡で確認し, 細胞質内に斑点状に LC3 が出現した際 AP 陽性とした。【成績】HS 培養における経時的な AP 誘導率は, HTR8 では 24 時間で 53±3.5%, 羊膜細胞では 60 時間で 38±2.2% であったが, BeWo では短時間 (4 時間) で 59±4.7% であった。低酸素培養においては, HTR8 では 16 時間で 45±3.0% が AP 陽性となったが, BeWo では短時間 (4 時間) で AP 陽性率が 50±4.2% になった。また AP 抑制剤 (3MA) の投与により AP が抑制され, より早く細胞死に陥った。【結論】いずれの胎盤の細胞においても, 低栄養だけでなく低酸素条件下で培養すると, ともに AP が誘導されることを初めて証明したが, EVT では絨毛癌に比し, 長時間のストレスの後に AP が出現した。脱落膜と類似した環境において AP が誘導されることを示唆する結果であった。