

氏名	高橋 宏典
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 451号
学位授与年月日	平成 26年 3月 19日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	絨毛外栄養膜細胞の子宮内膜浸潤機構：CD44 と microRNA の役割
論文審査委員	(委員長) 教授 古川 雄 祐 (委員) 教授 今野 良 教授 野田 泰子

論文内容の要旨

1 研究目的

胎盤は妊娠維持に必須で、様々な役割を担う。絨毛(Chronic villi:CV)は胎盤内に存在する機能細胞で、CV の主要細胞は絨毛栄養膜(Villous trophoblast: VT)である。一方、VT の先端から一部が分化し、絨毛外栄養膜細胞(Extravillous trophoblast: EVT)が子宮内膜に浸潤する。EVT 浸潤は「癌浸潤」と異なり、時間的・空間的に浸潤が制御される。この制御が障害されると妊娠高血圧症候群をはじめとした様々な疾患が発生する。しかし、EVT 浸潤における「時間的・空間的制御」の機序が判明していない。

CD44 は「癌浸潤」に関与している。CD44 は膜貫通型糖タンパク質で、ヒアルロン酸(Hyaluronic acid:HA)レセプターである。CD44 は HA を分解、再構成しながら癌細胞の浸潤を誘導する。ところが EVT 浸潤に CD44 が関係しているかどうか不明である。第1の仮説は「CD44 と HA が EVT 浸潤に関与している」である。

近年、エクソソームを介した細胞間伝達が注目されている。エクソソームは小型膜小胞で、多くの細胞が放出しており、エクソソーム中の microRNA(miRNA)が細胞間で受け渡されることが報告された。VT にもエクソソームが存在し、母体血中に放出される。さらに VT 由来のエクソソーム中に胎盤特異的(胎盤からしか分泌されていない) miRNA が存在することがわかっているが、機能は不明である。第2の仮説は「EVT 浸潤には VT 側からエクソソームを介して分泌されてくる miRNA が関与している、ことに EVT 浸潤を停止させるように作動している」である。

第3の仮説は「蛋白分解酵素(プロテアーゼ)の一部が CD44 を介した EVT 浸潤に関わる」である。細胞浸潤は細胞外基質(Extracellular matrix: ECM)の分解が必須で、プロテアーゼにより ECM は分解され、細胞浸潤する。プロテアーゼにはサブタイプが存在し、EVT 浸潤に関わるプロテアーゼが数種類報告されてはいるが、未だ全容は明らかではない。今回、特に CD44 に関わるプロテアーゼについて検討した。

2 研究方法

細胞：VT 細胞株として BeWo および JEG-3 を用いた。EVT 細胞株として HTR8/SVneo および HChEpC1b を用いた。また、倫理委員会承認を得て、妊娠初期の人工流産検体を利用した。

EVT 回収方法：CV をミンチ化後、一定時間培養した。CV の先端から分化、生着した EVT をトリプシン処理し、回収した。

浸潤能評価：上下 2 層からなる Boyden chamber の上層に一定数の細胞を添加後、20 時間培養した。マトリゲルでコートした膜を通過し、膜の下面に移動した細胞数を計測した。

Laser microdissection (LMD)：凍結切片を薄切、HE 染色後、専用顕微鏡で部位毎に切り出した。

エクソソーム抽出：BeWo 細胞の培養上清を 100,000G、70 分間、超遠心し、チューブ下層液体を回収した。0.22 μm のフィルターを通した後、再度超遠心し、上清吸引後、PBS に懸濁したものをエクソソームとした。

統計解析：Student t 検定または ANOVA-Tukey 検定を使用。p<0.05 を有意差ありとした。

3 研究成果

仮説 1：免疫染色とウェスタンブロットの結果、EVT に CD44 蛋白が発現し、VT には非発現だった。CD44 発現がメチル化の影響をうけると仮説を立て、CD44 プロモーター領域の CpG サイトのメチル化を解析したところ、CV に比べ、EVT はより多く脱メチル化していた。次に、浸潤能解析において、HA 添加により抽出 EVT および EVT 細胞株の浸潤は促進した。また siCD44 により CD44 をノックダウンさせると EVT 浸潤が抑制された。

仮説 2：miR-520c を含む胎盤特異的 miRNA は CV に比べ、EVT で低発現だった。また、胎盤特異的 miRNA は VT 細胞株で発現していたのに対し、EVT 細胞株では非発現だった。次に EVT 細胞株に miR-520c を過剰発現させたところ、CD44 蛋白発現は抑制され、レポーター解析の結果、miR-520c は CD44 を標的遺伝子にしていた。さらに、miR-520c 過剰発現 EVT 細胞では浸潤能が抑制された。miR-520c を含んだ VT 由来のエクソソームが母体血中に放出後、脱落膜内のらせん動脈から拡散すると推察し、脱落膜内の miR-520c 発現を LMD 使用し、検討したところ、らせん動脈周囲の脱落膜で miR-520c 高発現だった。最後に miR-520c を過剰発現させた細胞上清から抽出した VT 由来のエクソソームを EVT 細胞株に添加したところ、もともと EVT 細胞株では発現のみられない miR-520c 発現が観察され、さらに CD44 が抑制された。

仮説 3：初期胎盤で発現が確認されていたプロテアーゼの VT と EVT における発現をリアルタイム PCR で比較したところ、VT に比べ、EVT において Matrix metalloproteinase (MMP)-9 の発現が最も上昇した。次に、CD44 をノックダウンさせた EVT 細胞株では MMP-9 発現が抑制された。逆に、癌細胞の CD44 を上昇させると報告のあった WNT 蛋白を EVT 細胞株に添加したところ CD44 発現は上昇し、さらに WNT 添加により EVT 浸潤および MMP-9 発現が CD44 に並行して増加した。

4 考察

VT から EVT への分化過程で CD44 が発現し、CD44 と HA がともに EVT 浸潤を促進させた。VT 由来エクソソームに含まれる miR-520c が EVT 上 CD44 を標的遺伝子とし、CD44 を抑制した。VT に比べ、EVT で最も発現が上昇したプロテアーゼは MMP-9 で、CD44 発現を変化させると MMP-9 と浸潤能はどちらも CD44 に並行して変化した。エクソソームは母体血中に存在する。今回の検討で、VT 由来エクソソームは母体血中に移行したのち、脱落膜内らせん動脈から脱落膜へ

拡散後、脱落膜内の EVT に取りこまれる可能性を示した。妊娠高血圧症候群は EVT のらせん動脈への浸潤障害が原因である。ドラッグデリバリー等の問題解決が必要だが、miRNA 母体投与が治療困難とされている妊娠高血圧症候群の治療につながるかもしれない。

5 結論

VT から EVT への分化過程でエピジェネティックな制御をうけながら CD44 が発現する。EVT 上 CD44 は脱落膜内 HA と相互作用しながら浸潤を促進させる。VT 由来エクソソームに含まれる miR-520c が母体血を介して EVT 上 CD44 を制御していることが示唆され、同一起源から分化した VT と EVT の間にエクソソームを介した miRNA による細胞間伝達が存在している可能性を初めて示した。

論文審査の結果の要旨

妊娠初期に絨毛栄養膜 (VT) の一部が絨毛外栄養膜 (EVT) に分化し、子宮内膜に浸潤することが胎盤形成に重要な役割を果たしている。EVT の浸潤は時空的に制御されており、その異常は種々の妊娠合併症の原因となると考えられている。しかしながら、浸潤制御のメカニズムについては不明の点が多い。本研究において申請者らは、EVT における CD44 発現に着目し、その役割を中心に EVT の子宮内膜浸潤のメカニズムを解析した。

1. 絨毛栄養膜細胞は CD44 を発現していないが、EVT への分化に伴ってプロモーター領域の DNA 脱メチル化により発現が誘導された。またらせん動脈周囲に CD44 のリガンドであるヒアルロン酸の発現が見られた。Boyden chamber を用いて EVT 細胞の浸潤能を調べると、ヒアルロン酸によって浸潤が亢進し、CD44 をノックダウンすると低下した。
2. 胎盤特異的 miRNA の発現をスクリーニングすると、VT に比べ EVT で全体的に発現が低かった。胎盤特異的 miRNA の 1 つである miR-520c を EVT に人為的に発現させたところ CD44 発現が低下した。VT 細胞の培養上清から exosome を精製したところ miR-520c が含まれており、それが exosome を介して EVT 細胞に移行することを確認した。またらせん動脈の内膜では周辺領域に比べ miR-520c が強く発現していた。
3. EVT では VT に比べ MMP-9 が強く発現しており、CD44 のノックダウンによって低下した。一方、Wnt 添加によって EVT における CD44 発現・MMP-9 発現・浸潤能が亢進した。

以上より、Wnt シグナルと DNA 脱メチル化を介して EVT 表面に CD44 発現が誘導され、脱落膜に豊富に存在するヒアルロン酸との相互作用および MMP-9 の発現によって浸潤が促進され、と考えられた。EVT がらせん動脈に近づくと miR-507a の作用によって CD44 発現が抑制され、浸潤が停止すると推測される。

本研究はこれまで不明の点が多かった EVT 浸潤のメカニズムの一端を明らかにしており、臨床的にも意義を有すると考えられる。内容の一部はすでに国際英文誌である *Placenta* (2012 Impact Factor 3.117) に accept されており、博士 (医学) の学位に十分な質を有している。しかしながら、以下の点は修正を要すると思われる。

1. 個々のデータはきれいに示されているが、それらの *in vivo* での関連は動物実験ができないこともあり、必ずしも証明されているとは言えない。例えば、らせん動脈内膜

に存在する miR-520c が、VT から母体血を介して定着したという直接的な証明はされていないので、多少婉曲に表現する必要があるかと思われる。

2. 妊娠高血圧症など妊娠合併症における役割についても推論の域を出ないので、少なくとも「結語」からは除外すべきである。
3. 文章は良く書かれており、読みやすく理解もしやすいが、その反面、やや口語的な表現も見られ、多少の訂正を要すると考えられる。
4. 臨床検体の使用に当って、「自治医科大学倫理委員会および日本医科大学倫理委員会の承認を得た」とのみ記載されているが、承認期日・承認番号なども記載するのが好ましい。

以上の点を修正した改訂版を委員全員が確認し、論文審査合格とした。

最終試験の結果の要旨

申請者はほぼ学位論文のとおりにより発表を行った。発表は大変に分かりやすく、時間もほぼ予定どおりであった。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査員からは以下のような質問およびコメントが出された。

1. 個々のデータはきれいに示されているが、それらの *in vivo* での連関は完全には証明されていない。直接証明されていない部分については、婉曲に表現する必要があるかと思われる。
2. EVT が「子宮筋層に浸潤し、らせん動脈の内膜や筋層を置換してしまう（血管浸潤）」という表現があるが、一般的に使われる用語・表記であるかを確認されたい。
3. 妊娠高血圧症など妊娠合併症における役割についても推論の域を出ないので、少なくとも「結語」からは除外すべきである。
4. VT の産生する exosome が母体血を経由してらせん動脈に miR-520c を供給するという説の根拠は何か？
5. 臨床検体からの VT と EVT を単離した際のそれぞれの純度はどうであったか？ また VT のモデルとして絨毛癌由来細胞株を用いているが、問題はないか？
6. shRNA を用いた実験で、ノックダウンの効率と biological outcome に discrepancy の認められる場合が見受けられるが、どう解釈しているのか？

申請者はいずれの質問に対しても的確に返答し、有意義な discussion が行われた。発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。