

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小 原 久 典
論文審査担当者	主 査 本 田 孝 行 副 査 菅 野 祐 幸 ・ 谷 口 俊 一 郎
論文題目	
Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia (Lipocalin2 は低酸素環境で MMP-9 活性と絨毛外トロフォブラストの浸潤を亢進させる。)	
(論文の内容の要旨)	
<p>【目的】絨毛外トロフォブラスト（以下 EVT）は、妊娠初期に脱着膜や子宮筋層に浸潤し、らせん動脈の再構築に関与し、正常な妊娠の維持に重要な役割を果たすと考えられている。一方、EVT の浸潤不良は妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育遅延などの疾患に関連すると考えられている。これまで EVT の浸潤調節には Matrix Metalloproteinase (以下 MMP)、酸素濃度、内分泌因子やサイトカインなどが関与していると報告されているが、その調節機序ははっきりと分かっていない。Lipocalin2 (以下 LCN2) は鉄イオン輸送、バクテリアの増殖抑制などの様々な機能が報告されている分泌タンパクであるが、MMP-9 の安定化・作用増強や腫瘍細胞の浸潤能亢進にも関わるということが報告されている。また LCN2 は、妊娠中の血中濃度増加や妊娠後期のトロフォブラストでの発現も報告されているが、その機能や分布は不明である。そこで今回、妊娠初期絨毛での LCN2 の発現や機能、特に EVT の浸潤調節への関与と、妊娠初期の子宮内に特徴的な低酸素環境・酸素濃度勾配との関連に関して検討した。</p> <p>【方法】文書により同意を得て、人工妊娠中絶術により得られた合併症のない妊娠 7～10 週の妊娠初期絨毛組織を、以下の実験に用いた。まず、ホルマリン固定した妊娠初期絨毛での LCN2 発現を免疫組織染色にて検討した。次に絨毛組織から分離培養した EVT と、EVT 様の性質を示す絨毛癌細胞株 JAR での LCN2 発現を RT-PCR、蛍光免疫染色と western blot 法で確認した。さらにこれらの細胞において組み換え LCN2 (rLCN2) 添加や特異的 shRNA 導入による LCN2 発現抑制を行い、LCN2 の浸潤能、増殖能と MMP-9 活性への影響を、matrigel invasion assay、WST-1 assay と gelatin gel zymography にてそれぞれ検討した。同様の方法を用いて、21%、5%、2%の異なる酸素環境下における LCN2 の発現変化と機能の解析を行った。</p> <p>【結果】LCN2 は妊娠初期絨毛において、EVT、サイトトロフォブラストと脱着膜細胞に強い発現を認めたが、シンシチオトロフォブラストでは発現を認めなかった。分離培養した EVT と JAR 細胞において、rLCN2 添加により、増殖能は変化しなかったが、浸潤能と MMP-9 活性は共に用量依存的に増加し、500ng/ml 添加で浸潤能は EVT で 325% (P<0.01)、JAR 細胞で 215% (P<0.01) に増加し、MMP-9 活性は EVT で 169%、JAR 細胞で 147% に増加した。また、LCN2 発現抑制により、JAR 細胞の浸潤能は 26% まで、MMP-9 活性は 51% まで低下したが、500ng/ml の rLCN2 添加により浸潤能は 61% まで回復した。酸素濃度の影響では、EVT と JAR の両細胞とも低酸素ほど LCN2 mRNA 発現、MMP-9 活性は増加し、浸潤能も亢進した。特に JAR 細胞の浸潤能は、20% 酸素下と比較して、2% 酸素下で 211% (P<0.01) に増加したが、LCN2 発現抑制により逆に 12% まで著明に抑制された。さらに、この 2% 酸素下の LCN2 発現抑制 JAR 細胞に 500ng/ml の rLCN2 添加を行うと、浸潤能は 79% まで回復した。</p> <p>【結論】本研究により、LCN2 は妊娠初期絨毛において、特に EVT、サイトトロフォブラスト、脱着膜細胞で強い発現を認めることが示された。また、培養細胞の実験結果から、LCN2 が EVT の浸潤能を亢進させ、その作用は MMP-9 活性増強を介していることが示唆された。さらに LCN2 は低酸素環境における EVT の浸潤能亢進にも関与していると考えられた。以上より、LCN2 は妊娠初期の EVT の浸潤調節に重要な役割を果たしていると考えられた。</p>	