

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861483

研究課題名(和文) 絨毛外トロフォブラストにおけるLCN2の発現と意義の検討

研究課題名(英文) The expression and function of LCN2 in the extravillous trophoblast

## 研究代表者

小原 久典 (KOBARA, Hisanori)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：30598818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠初期絨毛から分離培養したEVTとEVTのモデルである絨毛癌細胞株JAR細胞を用いてLCN2の機能解析を行った。組み替えLCN2 (rLCN2)添加は増殖能を変化させなかったが、浸潤能(マトリゲル浸潤アッセイ)とMMP-9活性(ゼラチンザイモグラフィー)は共に用量依存的に増強した。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。2%酸素下で亢進した浸潤能はLCN2発現抑制で著明に抑制されたが、rLCN2添加で回復した。LCN2は妊娠初期にEVT浸潤調節に関わる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the function of LCN2 was analyzed using EVT's isolated from early placental tissue and a choriocarcinoma cell line, JAR, as a model of EVT. WST-1 assay revealed that the addition of recombinant LCN2 (rLCN2) did not alter the proliferative activity. Whereas, rLCN2 enhanced the invasive ability (Matrigel invasion assay) and the activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (gelatin zymography) in a dose-dependent manner. Next, we examined the effect of oxygen concentration (21%, 5% and 2%) on LCN2 expression, MMP-9 activity and invasive ability. In both cells, the expression of LCN2, MMP-9 activity and invasive ability were increased in lower O<sub>2</sub> level. The invasive ability increased under 2% O<sub>2</sub> concentration was markedly inhibited by LCN2-knockdown and restored by rLCN2 addition. These findings suggest that, LCN2 may be involved in regulation of EVT invasiveness in early placentation.

研究分野：産婦人科学

キーワード：lipocalin2 絨毛外トロフォブラスト MMP-9活性 妊娠初期 浸潤能 酸素濃度 E-cadherin

## 1. 研究開始当初の背景

正常な胎盤形成過程においては、絨毛外トロフォブラスト(EVT)の子宮内膜や子宮筋層への浸潤とEVTによるらせん動脈内皮の置換が重要な役割を果たしている。EVTの子宮内膜や子宮筋層への浸潤能調節には、matrix metaroproteinases (MMPs)、酸素濃度、サイトカインなど様々な物質の関与が報告されている(Burton, G.J., et al. J. Anat. 2009)。MMPsは、細胞外器質を分解する酵素であり、これまでに細胞の浸潤に深く関与することが知られており、妊娠初期トロフォブラストでも、MMP9やMMP2の発現が確認されており(Fisher SJ, et al. J Cell Biol 1989)。これらの適切な発現がEVTの浸潤に重要であることが報告されている(Huppertz B, et al. Cell Tissue Res 1998)。EVTの浸潤やらせん動脈の置換不良は、shallow placentationと呼ばれ、妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育遅延などの原因と考えられている(Lash GE, et al. Biochem Biophys Res Commun 2001)。

妊娠高血圧症候群は3~5%の妊婦に発生し、母体・胎児双方に重大な合併症を引き起こす原因となる疾患であり、妊娠の終了以外に根本的な治療法が存在しない。妊娠高血圧症候群の病因や病態に関しては数多くの研究がなされており、現在でも不明な点が多い。しかし、それら諸説のなかで、妊娠初期の絨毛の子宮内膜や子宮筋層への浸潤不全によって、胎盤血液還流が減少することが妊娠高血圧症候群の発症の原因であるとする説が有力となっている。

Lipocalin2 (LCN2)は25KDaの分泌タンパクで、ヒトの好中球の分泌顆粒から、型コラーゲン分解酵素のMMP-9とジスルフィド結合する機能未知の蛋白として同定された(Li Yan, et al. J Biol Chem 2001)。LCN2は肝臓、肺、腎臓、脂肪細胞、マクロファージやトロフォブラストなどで発現が確認されている(L.Y.Cui, et al. Transplant Proc. 2011, Serkalem Tadesse, et al. Reprod Sci 2011)。LCN2の機能は様々に報告されており、脂肪酸や鉄の輸送、アポトーシスの誘導、細菌の増殖抑制、腫瘍細胞の生存や増殖、MMP-9の分解抑制などが報告されている(Jeffrey J, et al. Cancer letters 2012, Ho-Jeong Lee, et al. Int. J. Cancer 2006)。LCN2は癌細胞の実験でMMP-9の安定化を介し、浸潤能の増加作用を示すことが報告されている(Benoit Gaudineau, et al. J of Cell Science 2012)。

LCN2の妊娠に関連する報告では、妊娠中のLCN2血中濃度の増加が示され(Cesur, S, et al. Acta Obstetric et Gynecological Scandinavia 2012)。またsecond trimesterでのLCN2血中濃度高値はその後の妊娠高血圧症候群発症の予測因子となる可能性も指摘されている。(D'Anna R, et al. Acta Obstet Gynecol Scand 2008)また、満期の胎盤のトロフォブラストでのLCN2発現は確認されているが(Serkalem Tadesse, et al. Reprod Sci

2011)。その胎盤における機能に関しては不明な点が多い。加えて我々の教室の以前の実験から、LCN2が子宮内膜癌の浸潤能、遊走能を著明に促進することを見出している。これらの背景は、EVTの機能、特に浸潤能にLCN2が直接関与する可能性を強く示唆するものである。我々はこれまでに、LCN2の妊娠初期絨毛における発現を免疫染色によって検討してところ、LCN2のEVT、脱落膜での高発現を確認した。また、分離培養した妊娠初期のEVTやEVTのモデルである絨毛癌細胞を用いた検討でもこれらの因子の蛋白およびmRNAの発現を認めた。

これらの結果は特に、EVTが脱落膜に侵入する際にLCN2が非常に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。従って本研究ではLCN2のEVTでの作用を検討し、正常な胎盤形成過程の解明や妊娠高血圧症候群発症への関与についてさらに機能的な検討をすることを目的とする。

## 2. 研究の目的

EVTおよびEVTのモデルである絨毛癌細胞株を用い、LCN2の発現調節機構およびその機能を解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 妊娠初期絨毛組織からのEVT分離培養：人工妊娠中絶術により摘出された妊娠初期絨毛組織を、患者の同意を得て実験に用いた。EVTをparcoll gradient法にて分離し、matrigel上で培養した。この方法で得られた細胞の95%以上がCK7、HLA-G(EVTのマーカー)陽性であり、EVTであることを確認した。

(2) JAR細胞の培養、LCN2発現抑制細胞の作製、および組み換えLCN2(rLCN2)添加：EVTモデルである絨毛癌細胞株JARのLCN2発現をsiRNA法で抑制した(93.6%抑制：real-time RT-PCR)。またLCN2刺激としてrLCN2を添加した。

(3) LCN2、MMP-9、E-cadherin、SLC22A17の発現：mRNA発現をreal-time RT-PCR法で、蛋白発現をWestern blotting法で確認した。また蛋白の局在は免疫組織化学染色、蛍光免疫染色で検討した。

(4) 増殖能：rLCN2刺激等の24時間後の増殖能をWST-1 assayで測定した。

(5) 浸潤能：EVTおよびJARの浸潤能をmatrigel invasion assayで24時間後の浸潤細胞をカウントして行った。

(6) MMP-9活性：MMP-9活性をGelatin gel zymographyで比較検討した。

(7) 低酸素環境の影響：EVTおよびJARを21%、5%、2%のそれぞれの環境下で培養し、

LCN2 発現変化、浸潤能、MMP-9 活性および細胞機能変化を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) LCN2 の増殖能への影響

EVT および JAR 細胞では、rLCN2 添加により、増殖能に変化を認めなかった(図1)。また JAR での LCN2 発現抑制においても増殖能は変化しなかった。

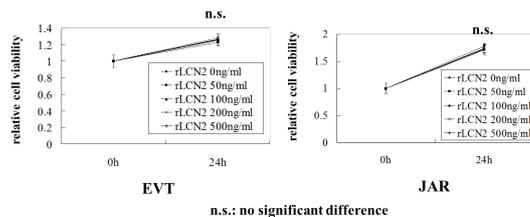


図1: rLCN2 添加の増殖能への影響 (WST-1 assay)

##### (2) LCN2 の浸潤能への影響

EVT および JAR の浸潤能は rLCN2 添加の用量依存的に増強した(図2、3)。一方、LCN2 発現抑制は JAR 細胞の浸潤能を抑制したが、rLCN2 添加により浸潤能の回復が認められた(図4)。

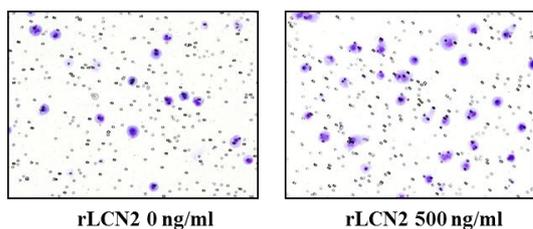


図2: matrigel invasion assay 結果 (JAR)

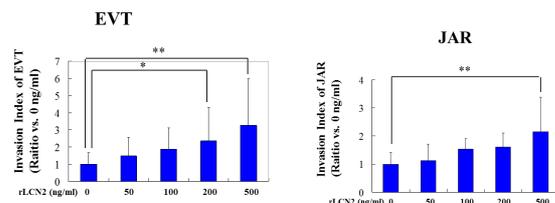


図3: matrigel invasion assay 結果

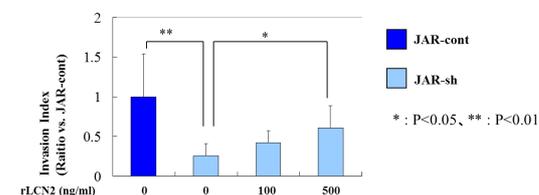


図4: LCN2 発現抑制および rLCN2 添加の浸潤能への影響

##### (2) LCN2 の MMP-9 活性への影響

EVT および JAR 細胞では、rLCN2 添加により用量依存的に MMP-9 活性の上昇を認めた(図5)。また、LCN2 発現抑制により JAR 細胞の MMP-9 活性の低下が観察された。

図5: Western blot and bar chart showing MMP-9 activity in EVT and JAR cells. Western blots show bands for MMP-9 (82kDa) and rLCN2 (0, 100, 500 ng/ml). Bar charts show densitometry (Ratio vs. control) for MMP-9 activity, which increases with rLCN2 concentration in both cell lines.

図5: rLCN2 添加の MMP-9 活性への影響

##### (3) 低酸素環境の影響

###### (ア) 酸素濃度と LCN2 発現

酸素濃度 21%、5%、2%と低下するにつれ、EVT, JAR の LCN2 mRNA 発現上昇を認めた(図6)。

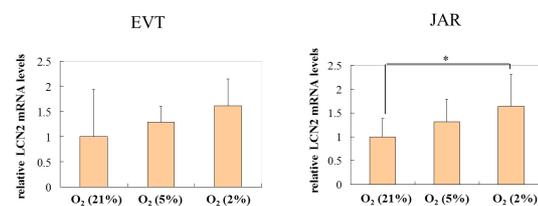


図6: 酸素濃度による LCN2 mRNA 発現変化

###### (イ) 酸素濃度と MMP-9 活性変化

EVT, JAR ともに酸素濃度低下とともに MMP-9 活性上昇を認めた。

###### (ウ) 酸素濃度と浸潤能

EVT, JAR ともに酸素濃度低下とともに浸潤能の亢進を認めた(図7)。

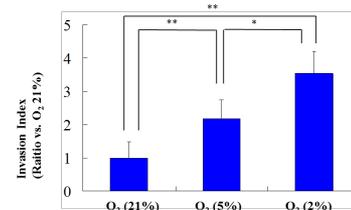


図7: 酸素濃度による浸潤能の変化 (EVT)

さらに低酸素による浸潤能の亢進は LCN2 発現抑制により著明に低下したが、rLCN2 添加により一部、回復した(図8)。

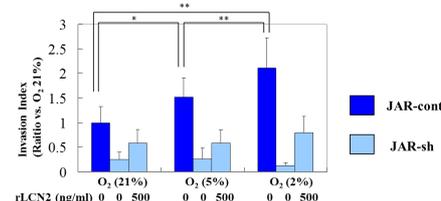


図8: 酸素濃度と LCN2 発現抑制および rLCN2 添加による浸潤能の変化 (JAR)

以上より、LCN2 は MMP-9 活性の増加を介して、妊娠初期の EVT の浸潤調節に関与している可能性が示された。また酸素濃度勾配による EVT の浸潤能調節に重要な役割をもつ可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Miyamoto T, Tachibana R, Kobara H, Takano T, Kato H, Shimizu A, Ohya A, Uehara T, Shiozawa T. Recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma with intracaval and intracardiac tumor thrombus: diagnosis, treatment, and surgical management. International Cancer Conference Journal 2014; 3; 1-7 査読有 DOI: 10.1007/s13691-013-0134-6
2. 今西 俊明, 宮本 強, 古川 哲平, 岡 賢二, 鹿島 大靖, 橘 涼太, 小原 久典, 芦田 敬, 近藤 沙織, 塩沢 丹里. 妊娠初期に診断し保存的に治療し得た腹腔妊娠の1例 関東連合産科婦人科学会誌 51 巻 Page125-131(2014年) 査読有
3. Kobara H, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kikuchi N, Ohira S, Shiozawa T. Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia. Placenta. 2013; 34: 1036-43. 査読有 doi: 10.1016/j.placenta.2013.08.004.
4. Ohira S, Ookubo N, Tanaka K, Takatsu A, Kobara H, Kikuchi N, Ohya A, Kanai M, Shiozawa T. Placental mesenchymal dysplasia: chronological observation of placental images during gestation and review of the literature. Gynecol Obstet Invest. 2013; 75: 217-23. 査読有 doi: 10.1159/000350661.
5. Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Nakayama J, Shiozawa T. Immunohistochemical expression of core 2  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) in endometrioid-type endometrial carcinoma: a novel potential prognostic factor. Histopathology. 2013; 62: 986-93. 査読有 doi: 10.1111/his.12107.

[学会発表](計3件)

1. 大平哲史、浅香亮一、小原久典、高津亜希子、菊地範彦、金井誠、塩沢丹里. 妊

娠高血圧症候群では臍帯および絨毛内の血管内皮に Neuregulin-1 1 が強発現する. 2014年10月3日 第22回日本胎盤学会 (京都・京都大学芝蘭会館)

2. 小原久典、宮本 強、浅香亮一、山田靖、塩沢丹里. 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. 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2014年8月8日 (大阪・千里ライフサイエンスセンター)
3. 大平哲史、浅香亮一、石川香織、古川哲平、小原久典、高津亜希子、菊地範彦、金井誠、塩沢丹里. 妊娠高血圧症候群では臍帯静脈血管内皮に Neuregulin-1 1 が強発現する. 2014年4月20日 第66回日本産科婦人科学会 (東京・東京国際フォーラム)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小原 久典 (KOBARA, Hisanori)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 30598818