

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15601

研究課題名(和文)胎盤の老化機構に関する研究

研究課題名(英文)Study on the mechanisms of placental aging

研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA, TANRI)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20235493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤における器官としての老化と、細胞の老化(Cell senescence: CS)との関連の可能性について検討する。胎盤絨毛のcytotrophoblast(CT)では妊娠所期から -galやp16、p21、PMLなどのCSマーカー陽性細胞を多く認めた。syncytiotrophoblast(ST)では妊娠後期にのみ増加を認め、妊娠後期ではCTの細胞数が低下していた。BeWo細胞の合胞体化過程において、p16やp21発現が増強した。このことから、CTの合胞体化前にCSがおこると考えられ、妊娠末期ではCTの合胞体化による枯渇、STのCS誘導から胎盤機能が低下する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We studied the placental aging from the point of view of cell senescence (CS). We studied the placental aging from the point of view of cell senescence (CS). In the placental villi from the 1st to 3rd trimester of pregnancy, the ratio of cytotrophoblast (CT) positively expressing CS markers such as -gal, p16, p21, PML was consistently high. The nuclei of syncytiotrophoblast (ST) expressing CS markers have increased and the number of CTs decreased in the 3rd trimester. Expression of the CS markers such as p16 and p21 was enhanced in the syncytial process of BeWo cells induced by the forskolin stimulation, suggesting that CS occurred in the syncytial process of CT. It was considered that the placental dysfunction might be induced by CS of ST that was possibly associated with the depletion of CT due to the syncytial formation.

研究分野：産婦人科学 産科学

キーワード：胎盤老化 細胞老化 サイトトロフォブラスト シンシチオトロフォブラスト 合胞体化 p21 p16

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト胎盤は約40週で機能的な老化 (aging) を迎えるとされる。一般的な細胞老化 (cell senescence, CS) は、細胞分裂が停止し、増殖できなくなった状態が不可逆的に引き起こされることを指す (図1)。正常細胞はテロメアの長さにより分裂できる回数が決まるが、テロメア長が短縮し、それ以上分裂できず老化を迎えるものを replicative senescence とよぶ (Allsopp RC, et al. Oncogene. 2002)。一方、テロメア長が保たれておりまだ分裂が可能な細胞に DNA 損傷を引き起こすストレスや過剰な増殖シグナルが加わると、細胞障害や癌化を回避する自己防御のための積極的な老化が起こり、これは premature senescence と呼ばれる (Campisi J. Cell. 2005)。妊娠高血圧症候群 (PIH) や胎児発育不全 (FGR) の状態では胎盤機能は低下しており、より早期から胎盤が老化していると考えられるが、Biron-Sental らは、PIH や FGR では胎盤の細胞のテロメアが有意に短縮している (Biron-Sental T, et al. Am J Obstet Gynecol. 2010) ことを報告している。しかし正常胎盤における老化、とりわけこれが replicative senescence なのか premature senescence なのか、さらにはその分子機序は全く不明である。

胎盤の老化すなわち胎盤機能の低下は胎児機能不全や胎児死亡の原因となるため、その分子機構の解明は非常に有意義であると考えられる。現在、臨床的には胎児心拍モニターや羊水量、胎児血流の評価などによって間接的に胎児・胎盤の予備能の評価を行っているが、胎盤の老化機構が解明され、老化に伴う分泌タンパク発現の変化等が同定されれば、胎盤機能を反映する分子マーカーになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

胎盤における器官としての老化「aging」と、細胞の老化「senescence」との関連の可能性について検討する。ヒト胎盤は約40週で機能的な老化 (aging) を迎えるとされ、この胎盤機能を正確に評価することは適正な分娩時期の決定に重要であるが、現在臨床的に有用なマーカーはない。一方細胞レベルでの老化 (cell senescence, CS) とは不可逆的な細胞周期の停止状態であり、細胞の寿命の中で増殖や成長期から退行期や細胞死に移行する際に出現する重要な分子イベントである (図1)。ヒトの胎盤は妊娠約14週までに増殖・完成した後、約40週で機能が低下し臨床的な老化を呈する極めてユニークな組織である。この胎盤の lifespan のなかで CS が関与している可能性があるが胎盤絨毛における報告はない。本研究では胎盤絨毛・卵膜における CS 関連蛋白の発現とその臨床病理学的意義の検討を行い、胎盤の「老化 aging」の評価に有用なマーカーを探索する

ことを目的とする。

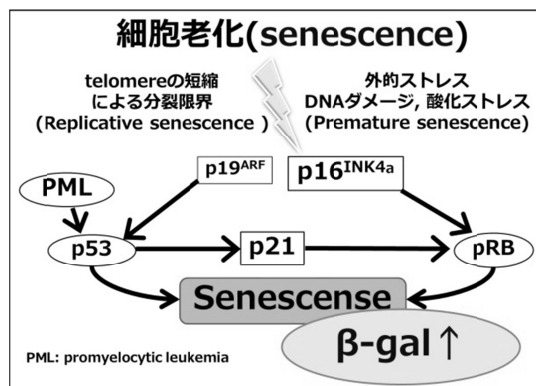


図1: 細胞老化 (Cell senescence, CS) のメカニズム。β-gal: β-galactosidase

## 3. 研究の方法

研究は、信州大学の倫理委員会の承認を得て行った。

1) **絨毛組織採取**: 妊娠初期・中期の胎盤絨毛組織は、健常妊娠における人工妊娠中絶時に、妊婦の同意を得て摘出子宮内容物より絨毛組織を採取した。また妊娠後期は、帝王切開症例の摘出胎盤より、同様に同意を得て胎盤より絨毛組織を採取した。免疫組織化学染色用には、初期・中期は10例ずつ、後期は20例で検討を行った。24時間ホルマリン固定後にパラフィン包埋組織ブロックとし、4μm厚の組織切片を作成して用いた。β-galactosidase (β-gal) 染色用には、妊娠各期10例ずつで絨毛採取を行い、即座にPBSで血液除去洗浄、ホルマリンで5分間固定、PBSで洗浄した後、Holt's gum sucrose solutionsで一晩固定後、OCT compoundに包埋、液体窒素で凍結組織とし、使用するまで-80℃で保存した。

2) **β-gal 染色**: 前述の凍結組織より5μm厚の組織切片を作成し、染色に用いた。代表的なCSマーカーであるβ-gal発現を器質であるX-galの分解から青色に発色することを利用した Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Tech.) を用いて検討した。

3) **免疫組織化学染色**: CSマーカーとして、p16, p21, PML (promyelocytic leukemia)を、また細胞増殖マーカーとしてMCM7 (minichromosome maintenance protein7) について、その発現を免疫組織化学的に検討した。連続切片のHE染色を参照し、陽性細胞(核)の割合(%)をcytotrophoblast (CT) と syncytiotrophoblast (ST) と分けて評価を行った。

4) **BeWo 細胞での細胞融合実験**: cAMPはCTが細胞融合してSTとなることを促進することが知られている。Forskolinはアデニルシクラーゼの酵素活性化によりcAMP

の細胞内濃度を高める。そこで絨毛癌細胞株 BeWo の培養液中に Forskolin を添加し、細胞融合の過程における CS マーカー発現や細胞増殖の状況を検討した。CT のマーカーである CDH1(E-cadherin)、ST のマーカーである hCG、CS マーカーとして p21、p16、PML の発現を Western blotting 法で検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 妊娠各期での $\beta$ -gal 発現

$\beta$ -gal 陽性細胞の割合は、CT では妊娠初期から中期にかけて増加したが、妊娠後期には減少した。一方、ST では妊娠初期では陽性核はほとんど認めないが、中期から後期にかけて増加傾向を示した。

##### 2) 妊娠各期での CSC マーカー発現の免疫組織化学的検討

p16, p21, PML はいずれも核に染色を認める(図2, 3)。これらはCTにおいては妊娠全期間を通じて高発現していたが、STでは妊娠初期では殆ど発現を認めず、特にp16とp21は中期から後期に陽性核が増加する傾向が認められた(図4)。増殖マーカーMDM7は、CTでは初期から中期に高値であったが、後期には低下した(図4)。なお、絨毛あたりのCT数は初期以降後期まで少なくなっていく傾向が観察された。

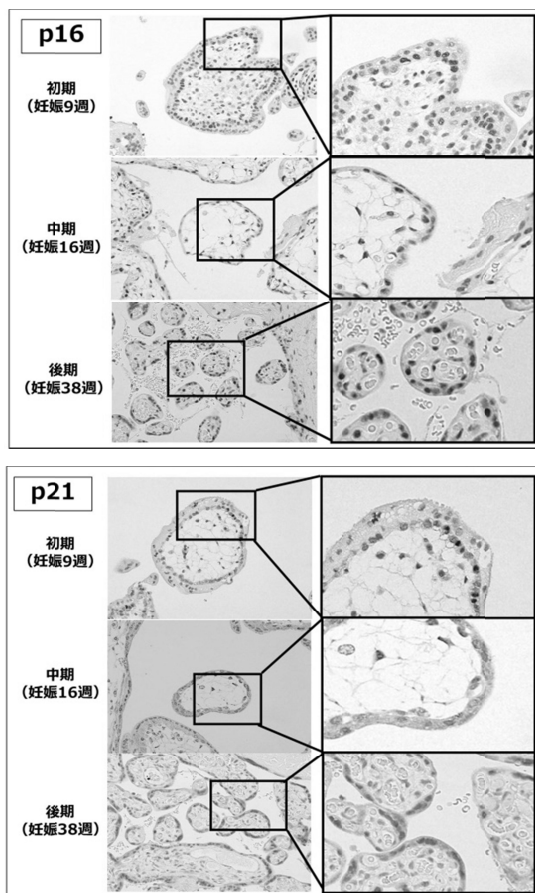


図2および3：妊娠各期での絨毛におけるp16(図2) p21(図3)発現(免疫組織化学的染色)

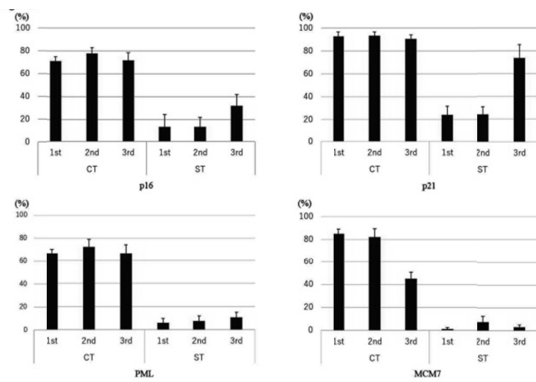


図4：妊娠各期胎盤絨毛のCT, STでのp16, p21, PML, MCM7各因子の陽性細胞の割合。各因子はCTで陽性細胞の比率が高く、STで低いが、p16, p21は妊娠後期のSTで上昇していた。

##### 3) BeWo 細胞の細胞融合におけるCSマーカー発現変化

絨毛癌細胞株 BeWo の培養液中への Forskolin 添加により、顕微鏡下で細胞融合が確認できた(図5)。また、CTのマーカーである CDH1 蛋白発現の低下、STのマーカーである hCG 蛋白の経時的発現増強を認め、これらは Forskolin により CT 様の BeWo 細胞が合胞体化により、ST 様に分化したことを示していると考えられた(図6, 7)。

この過程でのCSマーカー発現では、p21(図6) p16(図7)発現が経時的に増強していた。一方PMLは発現減弱が観察された(図7)。

このことから、CTの細胞融合からSTへ合胞体化する際に、CSマーカーが発現すると考えられた。このことは妊娠絨毛で、細胞融合前のCTでCSマーカー発現陽性細胞の割合が高いことにも一致すると考えられた。

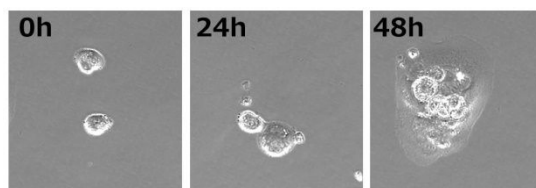


図5：Forskolin 添加後の BeWo 細胞の経時的変化。細胞の合胞体化を認める。

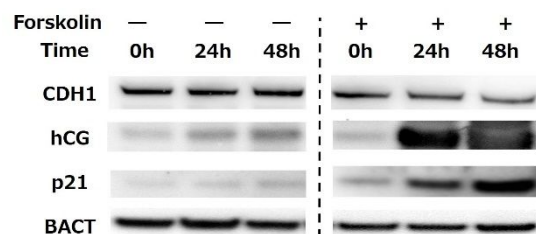
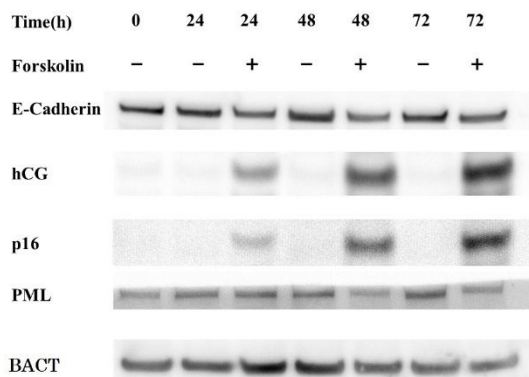


図6：Forskolin 添加の有無による BeWo 細胞での CDH1 (CT のマーカー) hCG (ST のマーカー) p21 (CS マーカー) 蛋白発現 (Western blotting) BACT ( $\beta$ -actin) は内因性コントロール。



**図7** : Forskolin 添加の有無による BeWo 細胞での CDH1 (CT のマーカー) hCG (ST のマーカー) p16 および PML (CS マーカー) 蛋白発現 (Western blotting)。BACT は内因性コントロール。

結果をまとめると、

妊娠所期から CT では p16 や p21 などの CS マーカー陽性細胞を多く認めた。ST では妊娠後期にのみ増加を認めた。また妊娠後期では CT の細胞数が低下していた。

BeWo 細胞の Forskolin 添加による合胞体化過程において、p16 や p21 発現が増強した。このことから、CT の合胞体化前に CS がおこるのではないかと考えられた。

これらの成果から、我々は以下の仮説を考えている。胎盤絨毛において、ST は母体血と接しており、酸化ストレスなど各種ストレスにさらされており、その核 DNA やミトコンドリアなどにも損傷が蓄積していく。それに対し、定期的に CT の合胞体化により新しい核 DNA と細胞内小器官が補充されるが、この合胞体化前に CT に CS が誘導され、古くなった ST の核は syncytial knot を形成する。妊娠が進むにつれ CT は ST に取り込まれて減少し、妊娠末期には CT が枯渇し、ついに ST の核に CS マーカーが発現するようになり、胎盤機能が低下していく。

そして妊娠高血圧腎症などの病態では、ST への酸化ストレスの亢進などが起こり、CT の枯渇がより早期に起こる可能性があると考えられた。

今後、この仮説をさらに検証すべく、研究を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- [1] Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. Overexpression of SIRT1 is Associated With Poor Outcomes in Patients With Ovarian Carcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 査読有 2017; Vol.25(6):415-421.

- [2] Ando H, Miyamoto T, Kashima H, Higuchi S, Ida K, Mvunta DH, Shiozawa T. Panobinostat Enhances Growth Suppressive Effects of Progestin on Endometrial Carcinoma by Increasing Progesterone Receptor and Mitogen-Inducible Gene-6. Horm Cancer. 査読有 2017; Vol.8(4): 257-267.
- [3] Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. SIRT1 Regulates the Chemoresistance and Invasiveness of Ovarian Carcinoma Cells. Transl Oncol. 査読有 2017; Vol.10(4):621-631.
- [4] 岡 賢二, 樋口 正太郎, 岸田 大, 矢崎 正英, 中村 昭則, 内川 順子, 山田 靖, 小原 久典, 鹿島 大靖, 宮本 強, 塩沢 丹里 月経期の発熱を契機に診断された家族性地中海熱の 8 例. 日本女性医学学会雑誌 (査読有) 2017 年 25 巻 1 号 Page34-38
- [5] Yamada Y, Ohira S, Yamazaki T, Shiozawa T. Ectopic Molar Pregnancy: Diagnostic Efficacy of Magnetic Resonance Imaging and Review of the Literature. Case Rep Obstet Gynecol. 査読有 2016;2016:7618631.
- [6] Kikuchi N, Ohira S, Asaka R, Tanaka K, Takatsu A, Shiozawa T. Prenatal sonographic diagnosis of fetal valproate syndrome: a case report. J Med Case Rep. 査読有 2016;10:312.
- [7] Yamada Y, Miyamoto T, Kashima H, Kobara H, Asaka R, Ando H, Higuchi S, Ida K, Shiozawa T. Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant. Free Radic Res. 査読有 2016; 50: 414-25.
- [8] 大平 哲史, 塩沢 丹里. 【多胎妊娠を極める-膜性診断から胎児治療、妊婦のサポートまで-】多胎の妊娠管理 双胎一児死亡の管理 産婦人科の実際, 65(5): 515-520 2016 年 査読なし

〔学会発表〕(計 4 件)

- [1] 横川裕亮, 安藤大史, 山中 桜, 浅香亮一, 布施谷千穂, 菊池範彦, 大平哲史, 金井誠, 塩沢丹里. Nesidioblastosis が疑われ妊娠中に低血糖発作が増加した 1 例 第 34 回信州内分泌談話会 2017 年
- [2] 大平 哲史, 浅香亮一, 品川真奈花, 安藤大史, 布施谷千穂, 菊池範彦, 金井 誠, 塩沢 丹里. Placental mesenchymal dysplasia が疑われ、胎盤の嚢胞様構造が妊娠経過とともに縮小した 1 例 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017 年
- [3] 安藤大史, 浅香亮一, 内山夏紀, 横川裕

亮, 布施谷千穂, 菊地範彦, 大平哲史,  
金井 誠, 塩沢丹里 .esidioblastosis が疑  
われ妊娠中に低血糖発作を繰り返した 1  
例 第 69 回日本産科婦人科学会学術講  
演会 2017 年

- [4] 井田耕一, 樋口正太郎, 安藤大史, 浅香  
亮一, 山田 靖, 小原久典, 鹿島大靖, 大  
平哲史, 宮本 強, 塩沢丹里 術前化学療  
法を施行した子宮頸癌 IB2 期合併妊娠  
の一例 第 54 回癌治療学会学術集会  
2016 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

塩沢 丹里 ( SHIOZAWA TANRI )

信州大学 . 学術研究院医学系 . 教授

研究者番号 : 20235493

### (2)研究分担者

樋口正太郎 ( HIGUCHI SHOTARO )

信州大学 . 医学部附属病院 . 助教(診療)

研究者番号 : 50750098

大平 哲史 ( OHIRA SATOSHI )

信州大学 . 学術研究院医学系(医学部附属病  
院) . 講師

研究者番号 : 90397315