

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成31年度

受付番号 201960502

氏名

岩橋尚幸

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: オレゴン州ポートランド (国名: 米国)
2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。  
胎盤形成におけるミトコンドリア-小胞体相互作用の解明
3. 派遣期間: 令和元 年 11月 15日~令和 2年 9月 30日
4. 受入機関名及び部局名  
受入機関名: Oregon Health & Science University  
部局名: Obstetrics and Gynecology
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**  
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)  
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

妊娠高血圧腎症 (Preeclampsia; PE) は高血圧・蛋白尿・浮腫を主徴とする妊娠合併症である。確実な治療は妊娠の終了しかなく、胎児発育不全 (Fetal growth restriction; FGR)、常位胎盤早期剥離や子癇、HELLP 症候群など重篤な合併症を併発し、母体や児の予後に大きな影響を与える重大な疾患である。PE および FGR 発症の成因として絨毛外栄養膜細胞 (Extravillous trophoblast; EVT) の浸潤不全および細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast; CTB) から合胞体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast; STB) への分化・細胞融合 (シンシチウム化) 不全などによる、胎盤形成不全が関連していると言われている。PE と FGR を合併する症例は特に予後が悪いとされているが、胎盤形成における PE・FGR の病態の相互関与についてはいまだ明らかではない点が多い。近年では母児間の免疫不全、酸化ストレスや小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) ストレスなどの関与が示唆されているが、確立された病態メカニズムはなく、有効な治療標的分子の同定や新規治療の開発が求められている。

近年注目されている細胞小器官 (オルガネラ) ネットワークとして、ミトコンドリア-小胞体間の膜接触部位 (mitochondria-associated ER membrane; MAM) があり、アルツハイマー病や糖尿病などの研究が進んでいる。MAM ではミトコンドリア-小胞体間の迅速な生体分子の交換輸送により、Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシス・オートファジー・アポトーシス・脂質代謝・腫瘍増殖などの細胞機能の足場としての重要な役割をもつと言われている。そのため、ミトコンドリア-小胞体間のクロストークが新たな疾患病

態メカニズムや治療戦略の開発の標的として有用と考えられる。しかし、胎盤形成における小胞体やミトコンドリア機能の役割に関する研究は進んでおらず、さらにこれまでに胎盤において MAM に着目した研究はない。

申請者はこれまで継続して胎盤形成メカニズムに関する研究を行っており、近年は小胞体という胎盤研究の領域ではまだ詳細な研究が行われていない細胞小器官（オルガネラ）に着目し、小胞体シャペロンである CRT の胎盤形成における重要性について成果を報告してきた。一方で、細胞内には小胞体だけでなく他にいくつかのオルガネラが存在し、オルガネラ間でネットワークを形成し相互輸送・機能の補完を行うことによりホメオスタシスが保たれているといわれている。小胞体と膜接触することで小胞輸送が可能となるオルガネラとしてミトコンドリアがあり、特に前述したミトコンドリア-小胞体間の膜接触部位 (mitochondria-associated ER membrane; MAM) での脂質輸送・生合成や  $Ca^{2+}$  シグナリングなどが注目されている。申請者はこれまでの研究結果も踏まえ、胎盤形成メカニズムにおいてもミトコンドリア-小胞体間の相互作用が重要な役割を持つと考え、今回の研究を計画した。

### 1. ヒト胎盤組織からの胎盤絨毛の初代培養細胞の抽出手技の確立

派遣先研究機関の倫理委員会承認のもと、単胎妊娠のうち正常妊娠妊婦と妊娠糖尿病患者を対象とし、陣痛発来前に帝王切開で分娩となった症例の胎盤組織を使用する。帝王切開で分娩となった妊婦の胎盤を 1 時間以内に回収し、組織溶解液やパーコール遠心方などのプロトコルを用いて、ヒト胎盤組織からの胎盤絨毛の初代培養細胞の抽出を行った。一週間に 2 例前後の症例があり、抽出手技の確立に十分な経験ができ、研究施設の胎盤絨毛初代培養細胞バイオバンキングにも貢献した。初代培養細胞の自然なシンシチウム化の時系列変化について、ヒト絨毛性ゴナドトロピン  $\beta$  サブユニット ( $\beta$ -hCG :  $\beta$ -human Chorionic Gonadotropin) や胎盤性アルカリフォスファターゼ (PLAP : Placental alkaline phosphatase)、E-カドヘリンなどのウエスタンブロットや蛍光免疫染色を用いて評価した。続いて、以下の実験について、バイオバンクに保存されている胎盤絨毛初代培養細胞を用い研究を行なった。

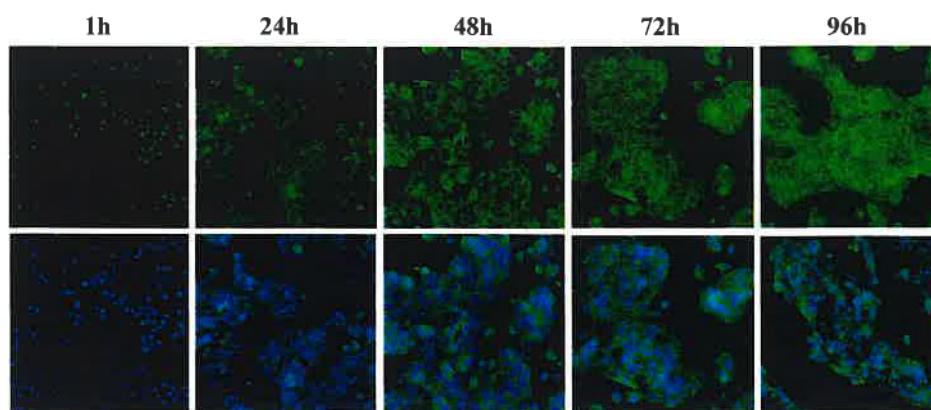
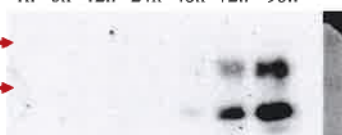
pCTB 1-24-48-72-96h hCG

202004123 pCTB 96h cell

$\beta$ -hCG 1h 6h 12h 24h 48h 72h 96h

37

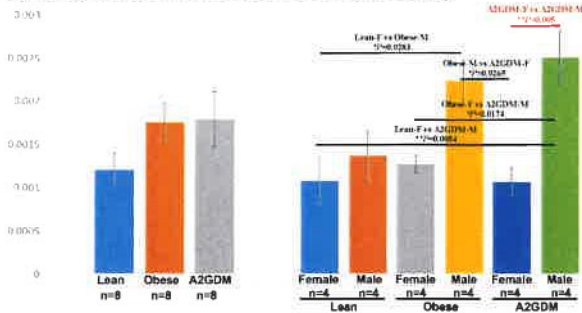
30



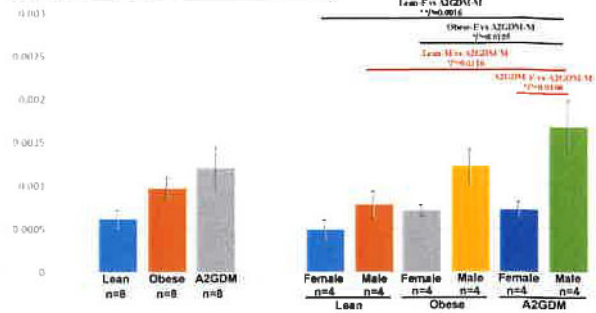
## 2.肥満や妊娠糖尿病による胎盤ミトコンドリア機能への影響の検討

胎盤絨毛の初代培養細胞を 72 時間培養し、Seahorse XF24 analyzer および XF Mito Fuel Flex kit を用いて、ミトコンドリア呼吸鎖の機能解析を行った。やせ妊婦・肥満妊婦・インスリン治療の必要な妊娠糖尿病の間でミトコンドリア呼吸鎖や代謝に違いが見られ、肥満妊婦や妊娠糖尿病患者で胎盤のミトコンドリア機能が落ちていることを発見した。さらに児の性別でミトコンドリア機能に差があり、男児の胎盤は女児の胎盤に比べ、ミトコンドリア基礎呼吸能が高いものの予備能は低い結果であった。

Maximal Respiration (Lean-Obese-A2GDM/Female-Male)



Basal (Lean-Obese-A2GDM/Female-Male)



## 3.小胞体ストレスが胎盤ミトコンドリア機能に与える影響の検討

小胞体ストレスが胎盤ミトコンドリア機能に与える影響について、今までに報告はない。そこで、胎盤絨毛の初代培養細胞を 72 時間培養し、その後小胞体ストレス誘導剤であるタプシガルギンとツニカマイシンを 24 時間添加し検討を行なった。小胞体ストレス誘導により、胎盤のミトコンドリア機能が落ちることを発見した。さらに女児の胎盤は男児の胎盤に比べタプシガルギン誘導性の小胞体ストレスには抵抗性を示し、ツニカマイシン誘導性の小胞体ストレスでは差を認めなかった。薬剤により感受性に性差が認められ、薬剤の作用機序と胎盤の小胞体ストレス耐用能についてさらに検討する余地が見られた。ウエスタンブロット法により、タプシガルギンとツニカマイシンによる小胞体ストレス誘導により、妊娠で上昇するヒト絨毛性ゴナドトロピンの分泌が低下することを発見し、ミトコンドリア関連タンパクの機能低下、さらにオートファジーの誘導も確認した。

pCTB 72h+24h Tg/Tm cell

LC-3b

Tg 0 25 50 100 Tm 0.0 0.25 0.5 1.0



p62

Tg 0 25 50 100 Tm 0.0 0.25 0.5 1.0



Rubicon

Tg 0 25 50 100 Tm 0.0 0.25 0.5 1.0



pCTB 72h+24h Tg/Tm cell

β-hCG

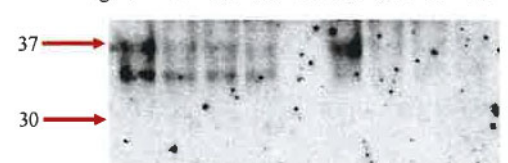
Tg 0 25 50 100 Tm 0.0 0.25 0.5 1.0



pCTB 72h+24h Tg/Tm sup

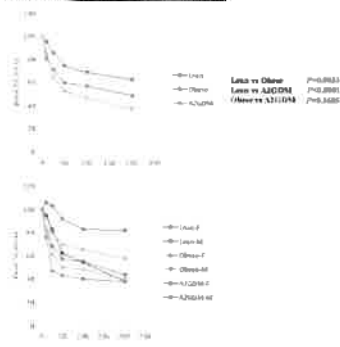
β-hCG

Tg 0 25 50 100 Tm 0.0 0.25 0.5 1.0

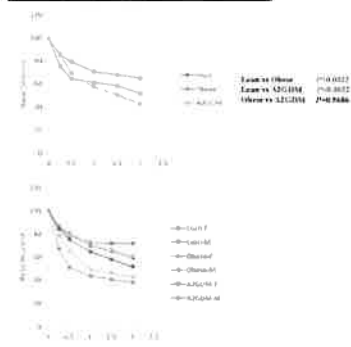


**Basal (Lean-Obese-A2GDM/Female-Male)**

Thapsigargin 0-10-25-50-100-200 nM

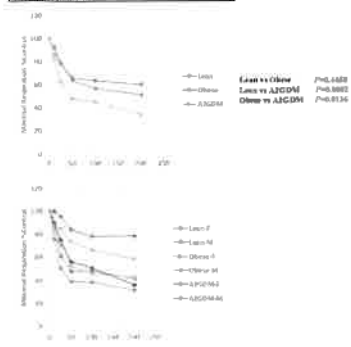


Tunicamycin 0.25-0.5-1.0-1.5-2.0 ug/ml 24h

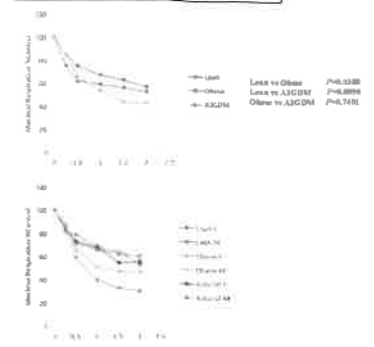


**Maximal Respiration (Lean-Obese-A2GDM/Female-Male)**

Thapsigargin 0-10-25-50-100-200 nM



Tunicamycin 0.25-0.5-1.0-1.5-2.0 ug/ml 24h



本研究では、胎盤研究ではこれまで未だ触れられていなかった、胎盤形成におけるミトコンドリア-小胞体相互作用のメカニズムについて研究を進めることができた。本研究を進展させることで、胎盤形成の新たな分子機構を解明することにより、現在治療がなく問題となっている胎盤形成不全の病態解明や新規治療法を確立することを目指し、引続き研究を進める予定である。