

「オートファジーが合胞体化に与える影響評価～ナノ粒子評価基盤の構築～」に関する研究

研究分担者 中島 彰俊 富山大学学術研究部医学系 教授

研究要旨

胎盤形成不全は妊娠高血圧腎症と密接に関連しており、胎児発育不全に影響を与える。胎盤の適切な発育には、細胞内恒常性機構であるオートファジーが重要であり、オートファジーの制御異常が胎盤形成不全を伴う妊娠高血圧腎症発症に寄与することを明らかにしてきた。加えて、オートファジーの抑制は絨毛細胞におけるナノ粒子蓄積に関与することも明らかにしてきた。しかし、オートファジーの抑制が栄養膜細胞、特に合胞体化（細胞融合、ホルモン産生）に影響を与えるかは不明であり、ナノ粒子による胎盤形成への影響を検討する上で、そこを明らかにする必要がある。我々は、絨毛癌由来BeWo細胞株と初代ヒト絨毛細胞であるPHT細胞を用いて、合胞体化におけるオートファジーの影響を調べた。その結果、PHT細胞およびBeWo細胞において、合胞体化が進むことでオートファジー活性が低下することが観察された。次にリソソームのV-ATPaseを抑制することで（それによりBafilomycin A1はオートファジー抑制に働く）、BeWo細胞のhCG産生、CYP11A1発現（分化マーカー）、p21発現（細胞周期停止マーカー）、細胞融合が阻害されることが分かった。PHTでも同様の結果が得られた。以上より、オートファジー/リソソーム経路は、栄養膜細胞の分化・融合に重要な役割を果たし、合胞体化に関わることを明らかにした。オートファジー抑制が栄養膜細胞の分化不全およびナノ粒子蓄積に関与することから、現在栄養膜細胞におけるナノ粒子蓄積と合胞体化の関連を解明することで、胎盤形成不全、ひいては妊娠高血圧腎症や胎児発育不全の要因を明らかにすることを計画している。

A. 研究目的

絨毛細胞におけるオートファジー抑制がナノ粒子蓄積に関与することを報告してきた。そこでナノ粒子との関連を検討する前段階として、絨毛栄養膜細胞の合胞体化におけるオートファジーが如何に関与するかを調べることにした。

B. 研究方法

1. 細胞培養

絨毛癌細胞株である BeWo 細胞株を使用し、20%FBS および 1%Penicillin/streptomycin を添加した Ham's F12 培地で培養した。また、初代ヒト栄養膜細胞である PHT 細胞を使用し、10%FBS、1%Penicillin/streptomycin、epidermal growth factor(10ng/mL) および Y27632(10 μ M)を添加した Iscove's Modified Dulbecco's 培地で培養した（それにより分化が進行する系）。PHT 細胞は帝王切開で得られた合併症のない満期の胎盤より採取した。すべての胎盤は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養した。

2. タンパク質定量の評価

BeWo 細胞株に Forskolin 25 μ M を添加し分化を誘導した。分化前後での LC3-II 蛋白量を調べ、オートファジー活性化を評価した。PHT 細胞は培養日数の経過により分化する細胞であり、培養 3 日目および 5 日目の LC3-II 発現を評価することでオートファジー活性化を評価した。その他オートファジー関連蛋白質である p62、TFEB の発現量も評価した。分化の指標としては CYP11A1 および hCG の蛋白発現を評価した。さらに分化に伴う細胞周期停止（細胞老化にも関わるとされる）を評価するため、p21 蛋白発現も評価した。

オートファジー阻害剤として Bafilomycin A1(20nM)、オートファジー活性化剤として Torin(10 μ M)、Tat-beclin1 (20 μ M) を使用した。BeWo 細胞株において Forskolin 25 μ M 投与可に上記試薬を添加し、分化におけるオートファジーの関連を調べた。分化の指標として CYP11A1 お

よび hCG 蛋白発現を評価した。

すべての蛋白質は Western blotting により検出し、Image J を使用して定量化した。

3. BeWo 細胞の融合評価

BeWo 細胞に Forskolin 25 μ M を添加し分化を誘導した。BeWo 細胞の融合を評価するため、細胞免疫染色を行った。核は Hoechst33343、細胞膜は Di-8-ANEPPS で染色した。Zeiss LSM700 共焦点顕微鏡を使用し画像を得た。融合指数は、融合細胞の総核数/全ての細胞の総核数で計算した。無作為に 6 視野を選択し、評価を行った。

4. 統計解析

群間差の比較には、Kruskal-Wallis 検定および Mann-Whitney 検定を用いた。P<0.05 を統計的に有意であるとみなした。データは JMP を使用して解析した。

(倫理面への配慮)

PHT 細胞は共同研究施設である成育医療研究センターより譲渡された。全ての患者よりインフォームドコンセントは得ており、倫理面における問題はない。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. 合胞体化においてオートファジーは活性化しない

栄養膜細胞 (トロフォブラスト) における合胞体化によるオートファジー活性を評価するため、まず PHT 細胞を使用し評価を行った。PHT 細胞は培養日数の経過により分化する細胞であり、培養 3 日目および 5 日目の LC3-II 発現を評価することでオートファジー活性化を評価した。またオートファジーフラックス (その時点での活性指標) を評価するため、蛋白回収 24 時間前に Bafilomycin A1 20nM を投与した。培養 3 日目でオートファジーフラックスを認めたのに対し、培養 5 日目では認められなかった (図 1A-B)。またオートファジー関連蛋白である p62 蛋白に関しても、培養日数による有意な差を認めなかった (図 1C-D)。

BeWo 細胞は PHT 細胞と異なり、細胞性栄養膜細胞 (CTB) から合胞体栄養膜細胞 (STB) までの増殖期を容易に観察することが可能である (図 2A)。よって合胞体化におけるオートファジ

ー機構をより明確にするために、BeWo 細胞株を使用した。Forskolin 25 μ M を 72 時間添加することで合胞体化 (分化および融合) を誘導し、オートファジーフラックスを評価したところ、合胞体化完了後では、オートファジーフラックスの上昇を認めなかった (図 2B)。この結果は PHT の結果と一致した。BeWo 細胞株における Forskolin による分化に関しては、hCG および CYP11A1 発現増加より確認された (図 2C-E)。また合胞体化に伴いオートファジーにより分解される基質である p62 の増加、オートファジーの主要制御因子である TFEB 減少も観察された (図 2F-H)。

以上よりトロフォブラストの合胞体化において、オートファジー活性の低下が示唆された。

2. オートファジー抑制はトロフォブラストの合胞体化を抑制する

合胞体化によりオートファジー活性が低下することが明らかとなったため、次に CTB から STB への分化経過におけるオートファジーの必要性を評価した。BeWo 細胞を Forskolin 存在下で、オートファジー抑制剤である Bafilomycin A1 20nM と活性剤である Torin 10 μ M あるいは Tat-Beclin1 20 μ M で処置した。結果、Bafilomycin A1 投与により分化の指標である CYP11A1、老化マーカーである p21 の有意な低下を認めた (図 3A-D)。さらにオートファジー抑制が細胞間融合に影響を与えるかを評価するため、Forskolin および Bafilomycin A1 投与下での BeWo 細胞の融合指数を評価した。その結果、Forskolin 投与により有意に増加した細胞融合が、Bafilomycin A1 併用により顕著に減少した (図 3E-H)。以上の結果より、オートファジーの抑制が BeWo 細胞における合胞体化阻害を誘発していることが示唆された。

3. オートファジーの抑制はトロフォブラストの hCG 分泌を阻害する

オートファジーの阻害により CTB から STB での融合を阻害したことが明らかとなったため、次にオートファジー抑制によりトロフォブラストの機能である hCG 産生および分泌に影響があるのかを評価した。その結果、Forskolin 投与により有意に増加し hCG 産生は、Bafilomycin A1 投与により有意に減少した (図 4A-B)。さらに、上清中の hCG 分泌も有意に低下した (図 4C-D)。PHT 細胞でも Bafilomycin A1 投与により細胞内 hCG の低下を認めた (図 4E)。以上より、オートファ

ジー抑制がトロフォブラストにおける hCG 産生および分泌を抑制することが示された。

E. 結論

トロフォブラストにおいて、合胞体化後にはオートファジー機能が低下しており、また合胞体化前にオートファジーを抑制することで合胞体化が阻害されることが明らかとなった。このことはオートファジー活性化がトロフォブラストの合胞体化の開始を制御していることを示している。

我々はこれまでの研究で、オートファジー抑制が絨毛細胞におけるナノ粒子蓄積に関与することを報告している。しかしながら、臨床面でのナノ粒子の影響は明らかとはなっていない。今後の課題として、1) 胎盤組織（絨毛組織）および絨毛細胞において、ナノ粒子はオートファジーを活性化するのか？抑制するのか？ 2) オートファジー抑制状態での、ナノ粒子の侵入は合胞体化に如何に影響するのか？仮説としては、ナノ粒子蓄積が機能的抑制に繋がると考えられるが、これら因子は胎盤低形成につながるのか？今後、合胞体化とナノ粒子との関連を明らかにすることで胎盤低形成が要因とされる胎児発育不全や妊娠高血圧腎症の要因を解明することを目標としている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Furuta A, Shima T, Kawaguchi M, Yamaki-Ushijima A, Yasuda I, Tsuda S, Yoneda S, Higashisaka K, Cheng SB, Matsumoto K, Tsutsumi Y, Sharma S, Saito S, Nakashima A.: The autophagy-lysosomal machinery enhances cytotrophoblast-syncytiotrophoblast fusion process. *Reprod Med.* In press

【総説・その他】

なし

2. 学会発表

1. Furuta A., Kawaguchi M., Yamaki A., Tomoko S., Yoneda S., Nakashima A.: Regulation of Heme Oxygenase-1 (HO-1), antioxidant, mediated with autophagy in

trophoblasts., The 36th Annual Meeting Japanese Society for Immunology of Reproduction, 29-30 October, 2021.

2. 古田 惇, 川口美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: 絨毛細胞においてオートファジーは抗酸化ストレスタンパク HO-1 発現維持に関与する., 第 29 回日本胎盤学会学術集会・第 39 回日本絨毛性疾患研究会, 2021 年 11 月 26 日-27 日.
3. 古田 惇, 川口美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: 絨毛細胞における抗酸化ストレスタンパク HO-1 発現とオートファジーの関与., 第 41 回日本妊娠高血圧学会学術集会, 2021 年 12 月 24 日-25 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

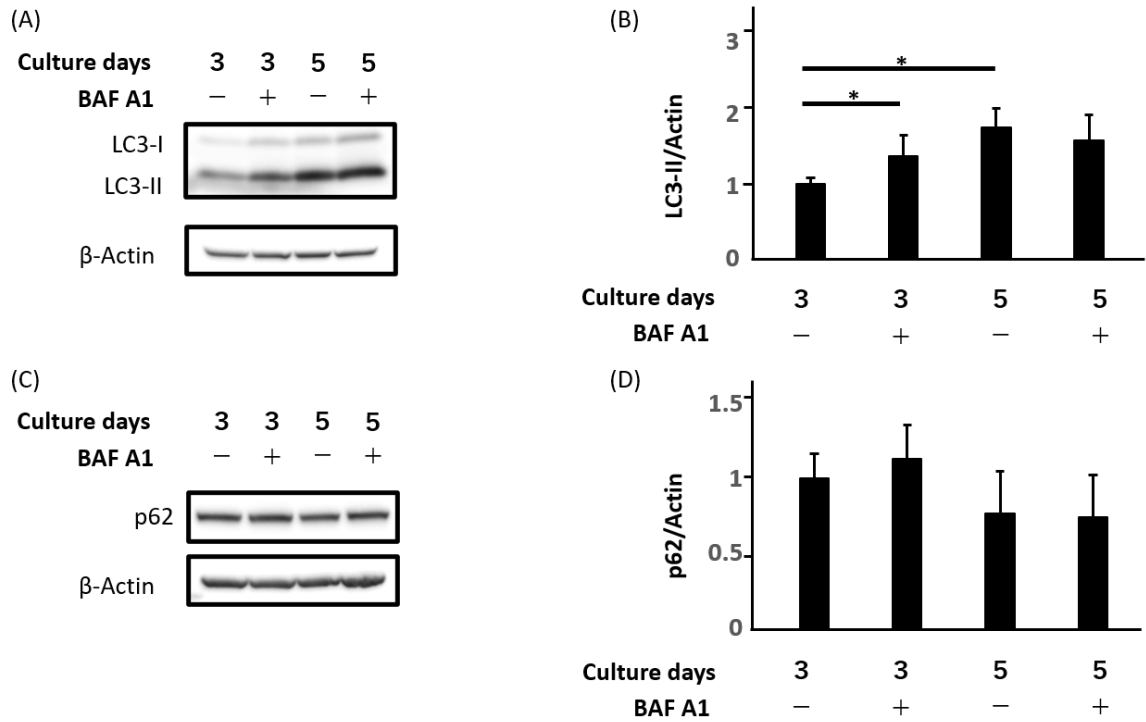


図1：初代ヒト絨毛芽細胞（PHT）の分化とオートファジーのフラックス

PHTを3日および5日間培養し、合胞体化を誘導した。この細胞をBafilomycin A1(BAF A1、20nM)で24時間処理し、オートファジーフラックスを確認した。タンパク質レベルはウェスタンブロットで検出し、タンパク質定量はImage Jを用いて計算した。

(A,B) オートファゴソームマーカーにはLC3-IIのタンパク質発現を評価した。(C,D) オートファゴソームの基質であるp62のタンパク質発現を評価した。グラフは3つの独立した結果から得られたものであり、有意差検定を行った。*P < 0.05

(A) **Differential models for syncytialization**

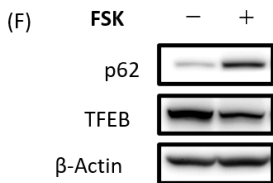
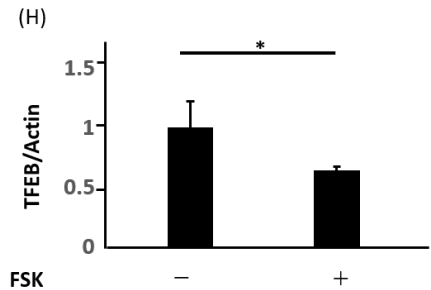
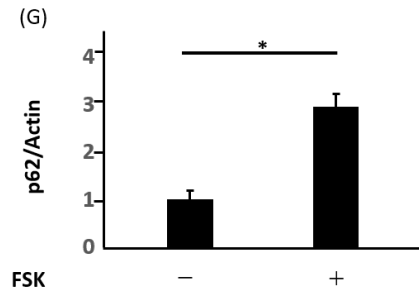
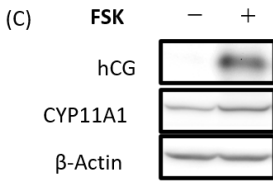
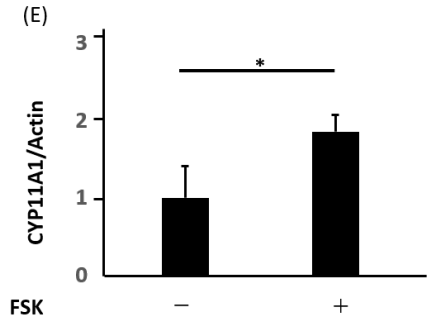
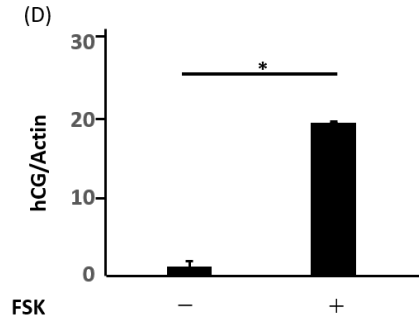
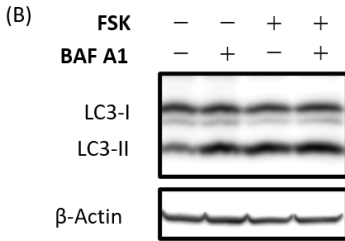
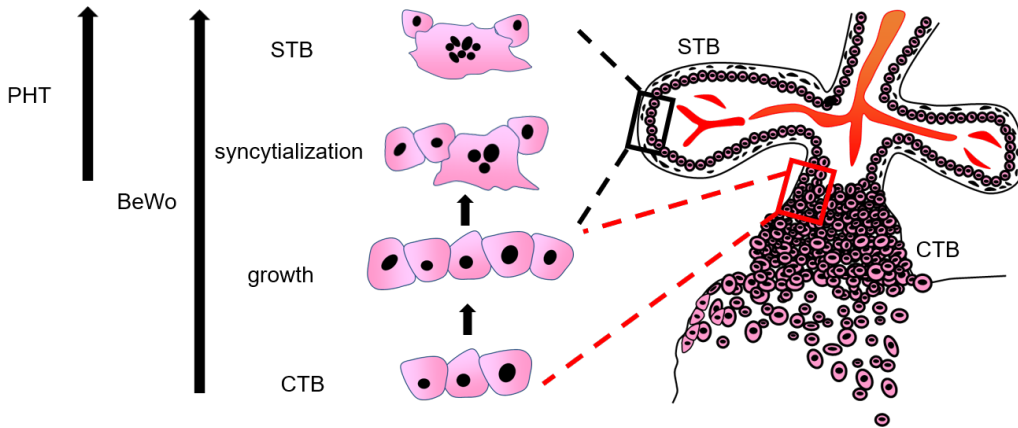


図2 : BeWo細胞における分化過程でのオートファジー活性の低下は、TFEBの減少に起因する

(A) BeWo細胞と初代ヒト絨毛芽細胞 (PHT) が、細胞栄養芽細胞 (CTB) から細胞栄養芽細胞 (STB) という流れで合胞体化する際の特性の違いを示した図。BeWo細胞をフォルスコリン (FSK, 25μM) で処理し、シンシチリア化を誘導した。(B) Bafilomycin A1 (BAF A1 20nM) 存在下でオートファジー流束を評価するためにLC3を評価した。(C,D,E) 分化の指標として、hCGとCYP11A1のタンパク質の発現を評価した。(F,G,H) FSK存在下での分化過程におけるオートファジー制御タンパク質の評価として、p62とTFEBのタンパク質発現を評価した。グラフは、3つの独立した結果から得られ、有意差検定を行った。*P < 0.05

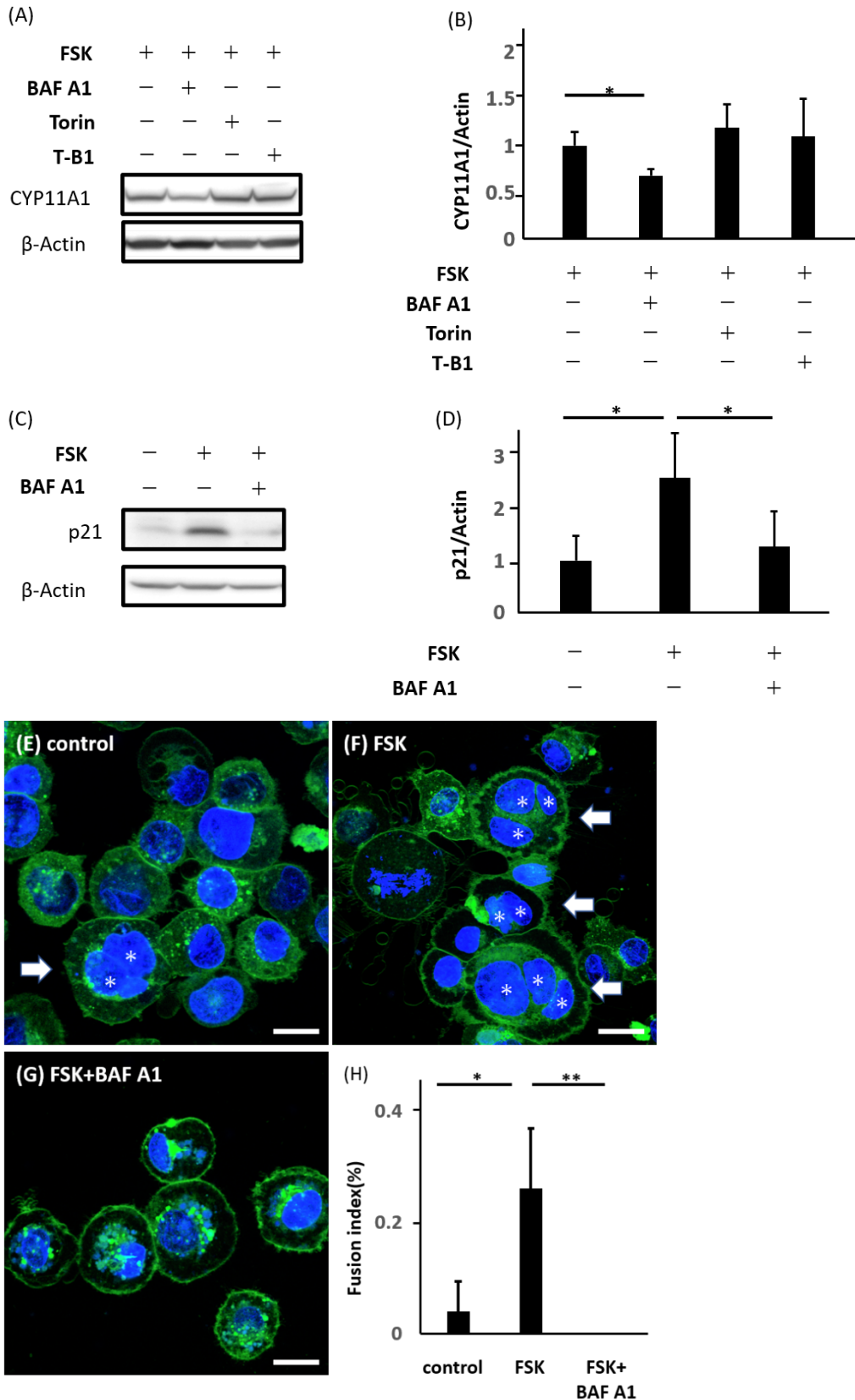


図3：オートファジー阻害によりBeWo細胞の分化・融合が阻害される

Forskolin (FSK) 存在下でオートファジー阻害剤であるBafilomycin A1 (BAF A1) 20nM、またはオートファジー活性化剤であるTorin1 10nMまたはTat-Beclin1 (T-B1) 20μMを投与した。(A,B) 合胞体化の指標として、CYP11A1のタンパク質発現を評価した。(C,D) BAF A1 20nMの存在下または非存在下において、FSKによって誘導される老化マーカーであるp21のタンパク質レベルを示した。細胞融合に関して共焦点顕微鏡を用いて評価を行った。(F) BeWo細胞をFSK 25μMで72時間処理して融合を促進し、(G) 同時にBAF A1でも処理した。細胞膜はDi-8-ANESS (緑)、核はDAPI (青)で染色した。融合細胞(矢印)は、複数の核(*)を含んでいた。スケールバー：20μm。(H) 融合指数は、融合した細胞核の数/全核数で算出した。ランダムに選択した6視野を撮影し、解析に使用した。グラフは、3つの独立した結果から得られ、有意差検定を行った。*P < 0.05, および **P < 0.01。

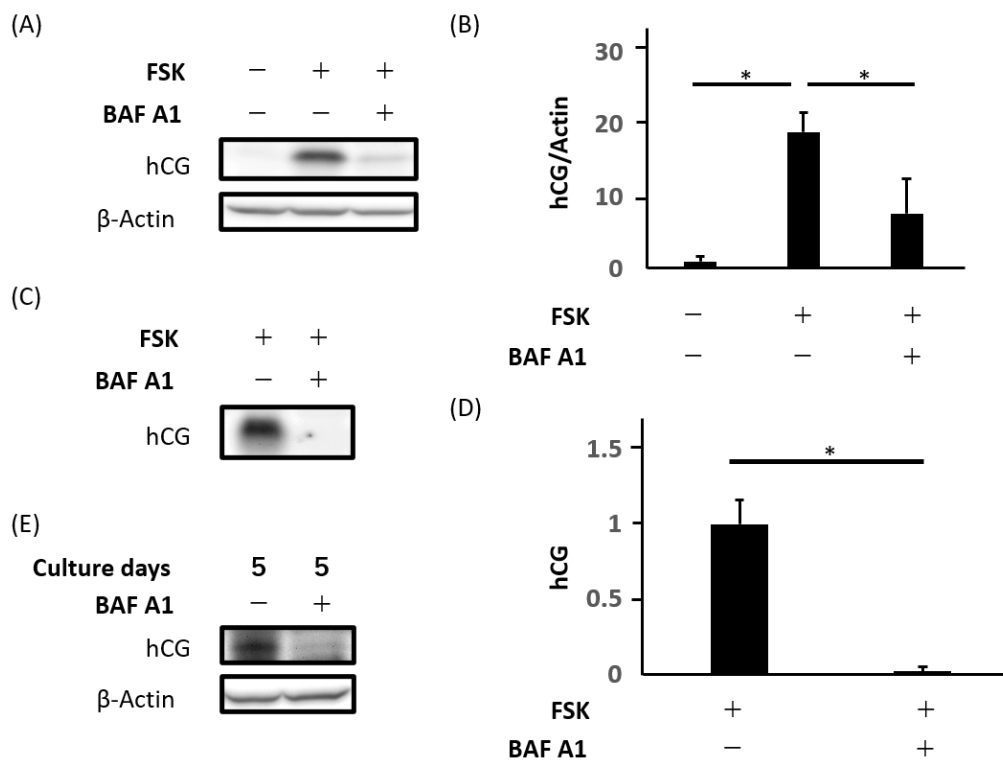


図4：パフィロマイシンA1 (BAF A1) は、合胞体形成時のhCG産生・分泌を抑制した

BeWo細胞をフォルスコリン (FSK) 25μMとBAF A1 20nMで同時に処理し、細胞溶解液 (A,B) および培養液 (C,D) 中のhCGを評価した。上清中のタンパク質ローディング量はPonceau S染色を用いて確認した。(E) PHT細胞をBAF A1無添加の培地で72時間培養した後、BAF A1を20 nM添加した培地で48時間培養し、BAF A1存在下でのhCG産生を評価した。グラフは、3つの独立した結果から得られ、有意差検定を行った。*P < 0.05。