

「オートファジーが絨毛細胞の酸化ストレスに与える影響評価」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 (Preeclampsia: PE) 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PE発症に寄与することを明らかにしてきた。また、我々は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すると共に、前年度における成果として、オートファジー抑制が栄養膜細胞 (トロフォブラスト) における分化や融合 (シンシチウム化) を抑制することを報告した。

近年、銀ナノ粒子や二酸化チタンは絨毛細胞の酸化ストレス (Oxidative stress: OS) や小胞体 (ER) ストレス誘導に関わることが報告されているが、PEの発症には合胞体栄養膜細胞 (STB) に対するOSや小胞体ストレスが関与するとされる。そこで、本年度は合胞体栄養膜細胞に与えるOSに着目し、PEで低下しているとされる抗酸化酵素HO-1の発現を中心に検討を行った。その結果、絨毛外栄養膜細胞 (EVT) 類似セルラインとは異なりSTB類似セルライン (BeWo細胞株、primary human trophoblast: PHT) では抗酸化酵素HO-1の定常的発現を認め、OS誘導剤としてのH₂O₂に対し、STB類似細胞ではEVT細胞に比しOSへの耐性が強いことが示された。次にH₂O₂による絨毛細胞へのオートファジー誘導能を評価したところ、H₂O₂濃度依存的にオートファジーの活性化を認めた。H₂O₂とは別のHO-1誘導剤であるHeminでは、オートファジーの活性化は認めなかったことから、HO-1の誘導とオートファジーの活性化は必須ではないことが分かった。一方で、オートファジー欠損細胞と正常細胞でH₂O₂投与によるHO-1誘導能に差を認めず、HO-1の誘導にはオートファジーは必須ではないことが判明した。次に、STBにおける恒常的HO-1発現へのオートファジー調整剤の影響を評価した。オートファジー抑制剤であるBafilomycin A1 (BAF) 投与により常時発現していたHO-1の低下を認めたが、活性化剤ではHO-1発現に変化は認めなかった。次に複数のオートファジー抑制剤による検討を行ったが、ChloroquineやWortmanninではHO-1の低下は認めなかった。BAFによるHO-1発現低下のメカニズム解明のため、OS耐性機構であるp62-keap1-Nrf2経路を評価したところ、BAF処置によりp62増加を認めたが、keap1やNrf2、リン酸化Nrf2は低下を認めた。またp62によるNrf2活性化に必須であるNBR1はBAF処置で低下しており、BAFによるHO-1低下にはNBR1が関与する可能性が示唆された。

オートファジー抑制が栄養膜細胞の分化抑制、合胞体栄養膜細胞における抗酸化酵素HO-1の低下をもたらすことが分かった。これまでにERストレスがオートファジー抑制に関わることも分かっており、ナノ粒子蓄積がOSやERストレスを助長し、胎盤形成不全、ひいてはPEや胎児発育不全の要因となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、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。また近年、二酸化チタンが絨毛細胞のオートファジー活性化やOS、ERストレスに関与すること (Titanium dioxide nanoparticles induce proteostasis disruption and autophagy in

human trophoblast cells. Zhang Y et al. Chem Biol Interact. 2018. PMID: 30273564)、またナノ銀もOS等の誘導に関与することが知られている (Silver bionanoparticles toxicity in trophoblast is mediated by nitric oxide and glutathione pathways. Bustos PS et al. Toxicology. 2021. PMID: 33662506)。そこで

今回、ナノ粒子による PE 関連ストレス誘導を検討する前段階として、絨毛栄養膜細胞の OS とオートファジーの直接的関与を調べることにした。

B. 研究方法

1. 細胞培養および絨毛培養

合胞体栄養膜細胞セルラインとして絨毛癌細胞株である BeWo 細胞株と初代ヒト栄養膜細胞である PHT 細胞を使用し、絨毛外栄養膜細胞セルラインとして、HchEpC1b 細胞、HTR8/SVneo 細胞、TCL1 細胞を使用した。

BeWo 細胞は 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、PHT 細胞は、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。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。すべての細胞は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養した。

絨毛組織は 37 週以降の正期産における帝王切開分娩婦より同意を得て採取した。採取した組織は直ちに PBS で十分に洗浄し、絨毛のみに分離・細切したのち約 25mg の小片とした。10%FBS および 1%Penicillin/streptomycin を添加した RPMI-1640 培地で培養した。全ての組織は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養した。

2. タンパク質定量の評価

各細胞群を培地で培養し、定常時の HO-1 発現を評価した。OS として H₂O₂ を 24 時間添加し、LC3-II 発現を評価することでオートファジー活性を評価した。

オートファジー阻害剤として Bafilomycin A1(BAF;20nM)、Chloroquine(CHQ;50 μ M)、Wortmannin (Wor;10 μ M)を、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。OS 保護機構を評価するため、各種薬剤を投与し p62、keap1、Nrf2、リン酸化 Nrf2、NBR1 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. 細胞増殖抑制評価

OS による細胞障害評価のため、WST-1 を用いて細胞増殖抑制を評価した。BeWo 細胞を 96well 細胞培養プレートに 1.2 \times 10⁶ 個播種し一晩培養

した後、濃度を調整した H₂O₂ 添加培地 100 μ L で培地を置き換えて 24 時間培養を行った。処置後に WST-1 溶液 100 μ L に入れ替え、マイクロプレートリーダーを使用して波長 450/655nm で吸光度を測定した。

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 細胞は患者同意を得たサンプルから作成され、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ており、倫理面に配慮している。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. 合胞体栄養膜類似細胞は HO-1 を恒常的に発現し、酸化ストレス H₂O₂ に耐性をもつ

絨毛細胞の種類によって HO-1 発現に違いがあるかを評価するため、各種細胞の定常時の HO-1 発現を評価した。その結果絨毛外栄養膜細胞 (EVT) に類似する細胞群とは異なり、合胞体栄養膜細胞に類似する BeWo 細胞や PHT 細胞では定常時に高レベルの HO-1 発現を認めた (図 1A)。実際に H₂O₂ による細胞増殖抑制評価では、BeWo 細胞は 250 μ M の濃度までは細胞増殖に影響を与えず、500 μ M 以上で増殖が抑制された (図 1B)。一方で HTR8、HchEpC1b、TCL1 細胞は EVT 由来であるが、H₂O₂ に非常に感受性が高く、12.5 μ M の H₂O₂ 処置で細胞増殖抑制を認めた (図 1C,D,E)。これらの結果は、合胞体栄養膜細胞は EVT に比し、定常時より HO-1 を高発現し、その結果 OS に耐性を持っていることが示唆された。

2. H₂O₂ は絨毛細胞株においてオートファジー活性化に関わる

次に HO-1 を誘導するとされる H₂O₂ がオートファジーを活性化させるかを評価した。BeWo 細胞において H₂O₂ の濃度依存的に LC3-II の増加が認められ、さらに Baf 処理によって無処理に比し LC3-II の更なる増加を認めた (=オートファジーフラックスの上昇)。つまり、H₂O₂ はオートファジー活性化を示した (図 2A)。また、それ

に伴い HO-1 発現も増加した (図 2A,B)。同様の結果は Hch 細胞でも認められた (図 2C)。次に HO-1 誘導とオートファジー活性化の関与を評価したが、HO-1 誘導剤である Hemin 投与では、HO-1 が増加するにもかかわらずオートファジーフラックスの増加は認めなかった (図 2D)。以上より酸化ストレス H₂O₂ は HO-1 誘導とオートファジー活性化をもたらすが、HO-1 誘導は必ずしもオートファジー活性化を必要としないことが示唆された。

3. オートファジー抑制剤 Bafilomycin A1 は合胞体栄養膜細胞の HO-1 を低下させる

Hemin による HO-1 誘導はオートファジーを活性化させなかったため、オートファジー阻害剤または活性剤が HO-1 発現に影響を与えるかを評価した。BeWo 細胞にオートファジー抑制剤である Bafilomycin A1 (BAF) を投与すると、HO-1 の発現が低下した (図 3A,B)。一方でオートファジー活性剤である Torin や Tat-beclin1 では HO-1 発現に影響はなかった (図 3A)。さらに別のオートファジー抑制剤による検討を行ったが、Chloroquine (CHQ) や Wortmannin (Wor) では HO-1 の低下を認めなかった (図 3C,D)。以上のことからオートファジー抑制剤である BAF に HO-1 発現低下作用があることが分かった。

4. HO-1 誘導は通常のオートファジー経路ではなく p62-NBR1 軸が重要である

BAF によるオートファジー阻害が HO-1 発現を低下させたことから、絨毛細胞における HO-1 誘導にはオートファジー活性化が必要と予想した。そこで、オートファジー欠損細胞株である HchEpC1b-Atg4BC74A 細胞に H₂O₂ 処置を行ったが、Wild type と同等の HO-1 誘導能を認めた (図 4A)。以上のことから非選択的に作用する通常のオートファジー経路は H₂O₂ による HO-1 誘導に必須ではないことが明らかとなった。

次にオートファジーに関連した OS 誘導機構である p62-keap1-Nrf2 軸に着目し、BAF による HO-1 低下のメカニズムを検討した。一般的に OS により Nrf2 は keap1 より遊離・活性化し、核内に移行することで HO-1 や NQO1 などの抗酸化酵素を発現させる。同経路において、p62 は keap1-Nrf2 の遊離を促進し、Nrf2 活性化を誘導する。BeWo 細胞において H₂O₂ あるいは BAF を投与したところ、BAF は HO-1 並びに NQO1

を低下させた (図 4B,C)。また、Nrf2 や活性型であるリン酸化 Nrf2 は BAF 投与で減少した (図 4B)。一方で p62 は H₂O₂ と BAF 両薬剤で増加していたが、リン酸化 p62 (Ser403 と Ser349) は BAF で著明な増加を認めた (図 4B)。さらに p62 を介する Nrf2 活性化に関与する NBR1 は BAF 投与で有意に低下した (図 4B,D)。

5. Chloroquine は p62-NBR1-Nrf2 軸を介して HO-1 発現を維持する

更に HO-1 発現へのメカニズムを明らかとするため、オートファジー抑制剤である BAF と CHQ の p62-NBR1-Nrf2 軸への影響を比較した (図 5A)。CHQ 投与は HO-1 および NQO1 の発現を維持し、p62 は増加するもののリン酸化 p62 (ser403, Ser349) は増加を認めなかった (図 5B,C,D,E)。さらに BAF で低下する NBR1 は CHQ では低下を認めなかった (図 5F)。Nrf2、リン酸化 Nrf2、keap1 についても CHQ 投与では低下しなかった (図 5G,H,I)。以上より、BAF による HO-1 発現の低下には NBR1 発現の低下が関与することが示唆された。

6. Bafilomycin A1 と Chloroquine による絨毛への影響

最後に、ヒト胎盤における影響を評価するため、正期産の正常胎盤を採取し、H₂O₂ および BAF、CHQ を投与した。実際の胎盤においても H₂O₂ 投与により HO-1 の誘導が確認された (図 6A)。BAF 投与では 10nM、20nM とともに HO-1 の低下を認めた。CHQ 投与では 50μM で NQO1 発現は保たれていたが、HO-1 は軽度低下していた。NBR1 に関しては BAF と CHQ で差がなかった (図 6B)。組織培養では、絨毛細胞と全く同様という結果は得られなかったが、これは間質細胞など絨毛細胞以外の細胞が多く含まれるためと考えられた。しかし、BAF には抗酸化酵素を低下させる可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により、絨毛細胞の種類により定常時の HO-1 の発現に差があることが明らかになった。つまり母児間の栄養・ガス交換やホルモン分泌に関わる合胞体栄養膜細胞が OS により抵抗性を持つことが明らかとなった。さらに通常のオートファジー経路ではなく、オートファジー抑制剤である BAF による HO-1 低下は、選択的オートファ

ジ-経路にある NBR1 が関与していることが示された。

妊娠初期に起こるとされるらせん動脈のリモデリング不全により(我々はこの異常にもオートファジー低下が関与することを報告している)、合胞体栄養膜細胞に様々なストレスが惹起されることが、PE 発症につながるとされる。また PE 胎盤では HO-1 が低下するという報告があり、本研究結果と合わせると、定常時に発現している合胞体栄養膜細胞の HO-1 低下が PE 発症につながると予想できる。さらにその HO-1 低下に関して、選択的オートファジーの関与と p62-NBR1-Nrf2 軸が重要なことも示唆された。一方で臨床的にも全身性エリテマトーデス妊婦にも使用される CHQ は BAF と異なり、HO-1 を低下させないことで安全に使用可能である可能性も示唆された。

以上より、今後ナノ粒子の妊娠中の安全性評価のために2つの方法を提案する。一つは、ナノ素材およびその修飾による絨毛細胞への OS 並びに ER ストレス誘導能評価法を確立することである。もう一つは、オートファジー活性に影響を受けず絨毛細胞内への蓄積を回避できるナノ素材を探索することである。これらを明らかにすることで、妊娠中の暴露を避けるべきナノ素材が明らかになると考える。一方で、胎盤低形成、胎児発育不全、妊娠高血圧腎症に関与するナノ素材の同定も疫学的調査により行っていくことが重要と考えている。

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.*, 3(2): 112-26, 2022.
2. Furuta A., Shima T., Yoshida-Kawaguchi M., Yamada K., Yasuda I., Tsuda S., Yamaki-Ushijima A., Yoneda S., Higashisaka K., Cheng SB., Matsumoto K., **Tsutsumi Y.**, Sharma S., Saito S., **Nakashima A.**: Chloroquine is a safe autophagy inhibitor for sustaining the

expression of antioxidant enzymes in trophoblasts., *J. Reprod. Immunol.*, 155: 103766, 2023.

3. Cheng S, Huang Z, Jash S, Wu K, Saito S, **Nakashima A**, Sharma S. Hypoxia-Reoxygenation Impairs Autophagy-Lysosomal Machinery in Primary Human Trophoblasts Mimicking Placental Pathology of Early-Onset Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(10):5644.

2. 学会発表

1. Furuta A., Kawaguchi M., Yamaki A., Yasuda I., Tsuda S., Tomoko S., Yoneda S., Nakashima A. : Autophagy suppression inhibits the syncytialization of trophoblast cells., ASRI 2022 Annual Meeting, 22-25 May, 2022.
2. 古田 惇, 吉田美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: オートファジーと妊娠高血圧腎症発症と治療開発., 第7回中日本産婦人科セミナー, 2021年10月1日-2日.
3. 古田 惇, 山田清貴, 吉田美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: SLE 妊婦に使用される Chloroquine (オートファジー抑制剤) による絨毛毒性への検討., 第42回日本妊娠高血圧学会学術集会, 2022年10月29日-30日
4. 古田 惇, 山田清貴, 吉田美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: オートファジー抑制剤 Chloroquine の酸化ストレスに対する新規作用の解明., 第37回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 2022年11月18日-19日
5. 古田 惇, 山田清貴, 吉田美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: オートファジー因子 NBR1 は絨毛における酸化ストレス耐性に重要な役割を果たす., 第30回日本胎盤学会学術集会, 2022年11月25日-26日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

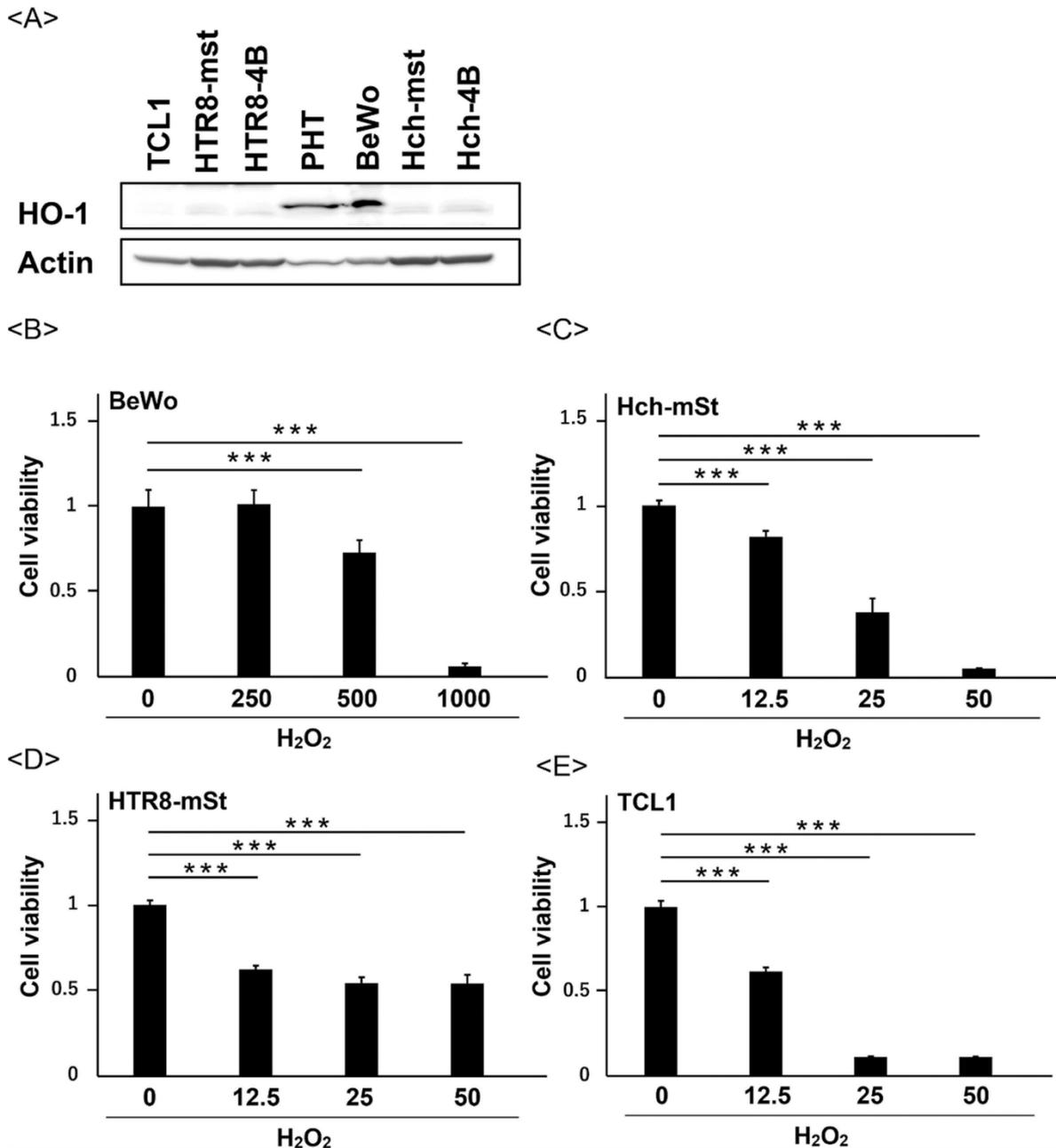


図1：トロフォブラストにおけるHO-1発現と酸化ストレス抵抗性

(A) 様々な種類の絨毛膜細胞におけるHO-1の発現を定常状態で調べた。タンパク質レベルは、ウェスタンブロッティングを用いて検出した。(B) BeWo細胞、(C) HchEpC1b-mSt細胞、(D) HTR8-mSt細胞、および(E) TCL1細胞を様々な濃度のH₂O₂ (μM) で24時間処理した細胞生存率をWST-1アッセイを用いて評価した。グラフは処理細胞の細胞生存率を示している。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も実施した。データは、平均値±S.D.で表した。

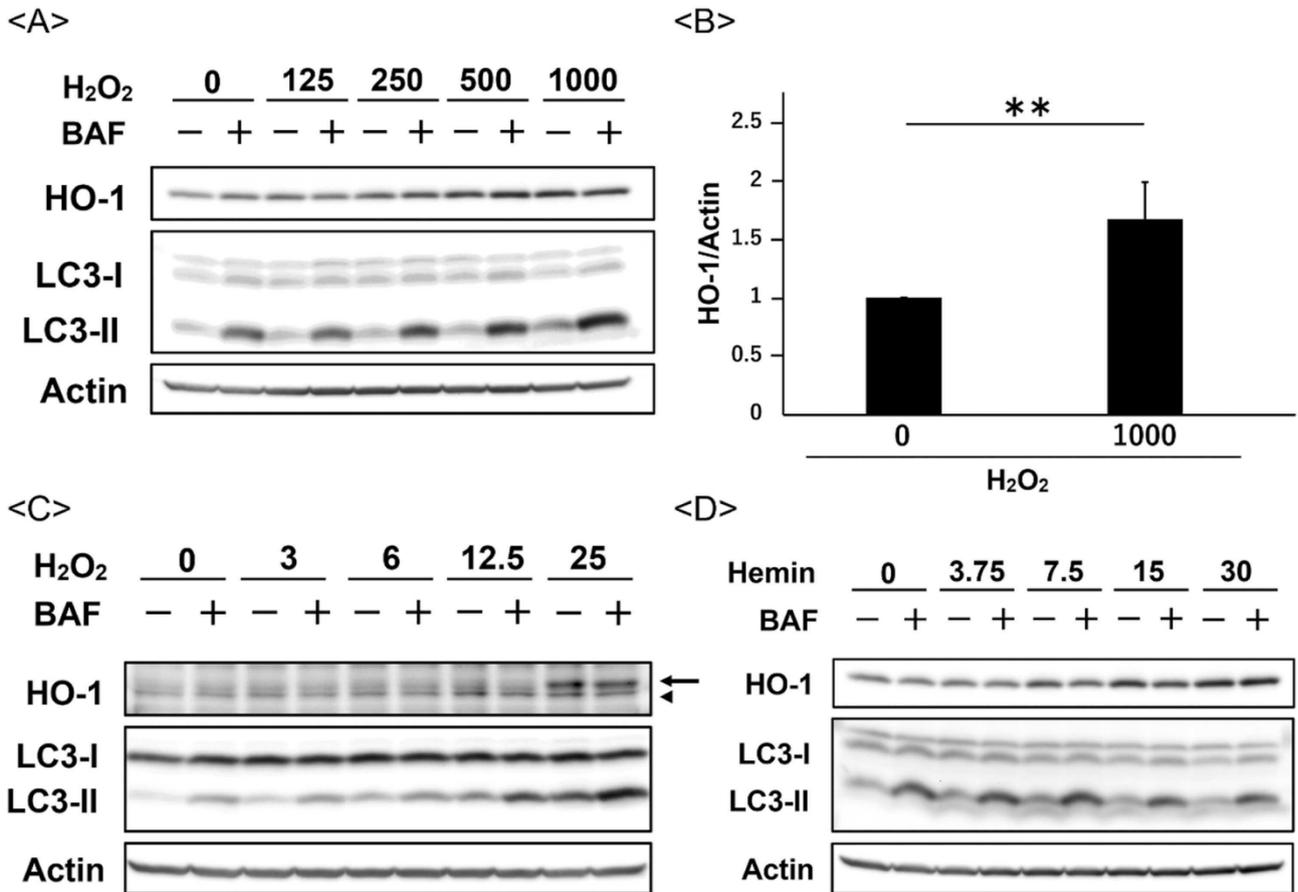


図2：絨毛細胞株におけるH₂O₂によるHO-1発現とオートファジーフラックス

(A) BeWo細胞を様々な濃度のH₂O₂ (125~1000 μM) で24時間処理し、蛋白回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF, 20 nM)処置した。(B) 1000μMのH₂O₂で処理したBeWo細胞におけるHO-1の発現量をアクチンで正規化したグラフ。(C) HchEpC1b-mSt細胞を、様々な濃度のH₂O₂ (3~25μM) で24時間処理し、蛋白回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF, 20 nM)処置した。(D) BeWo細胞を、HO-1の誘導物質である様々な濃度のヘミン (125 - 1000 μM) で24時間処理し、蛋白回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF, 20 nM)処置した。ウェスタンブロットでHO-1 (矢印は特異的バンド、矢頭は非特異的バンドを示す)、LC3-I/II、Actinを定量化した。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も実施した。データは平均値±S.D.で表した ** p < 0.01.

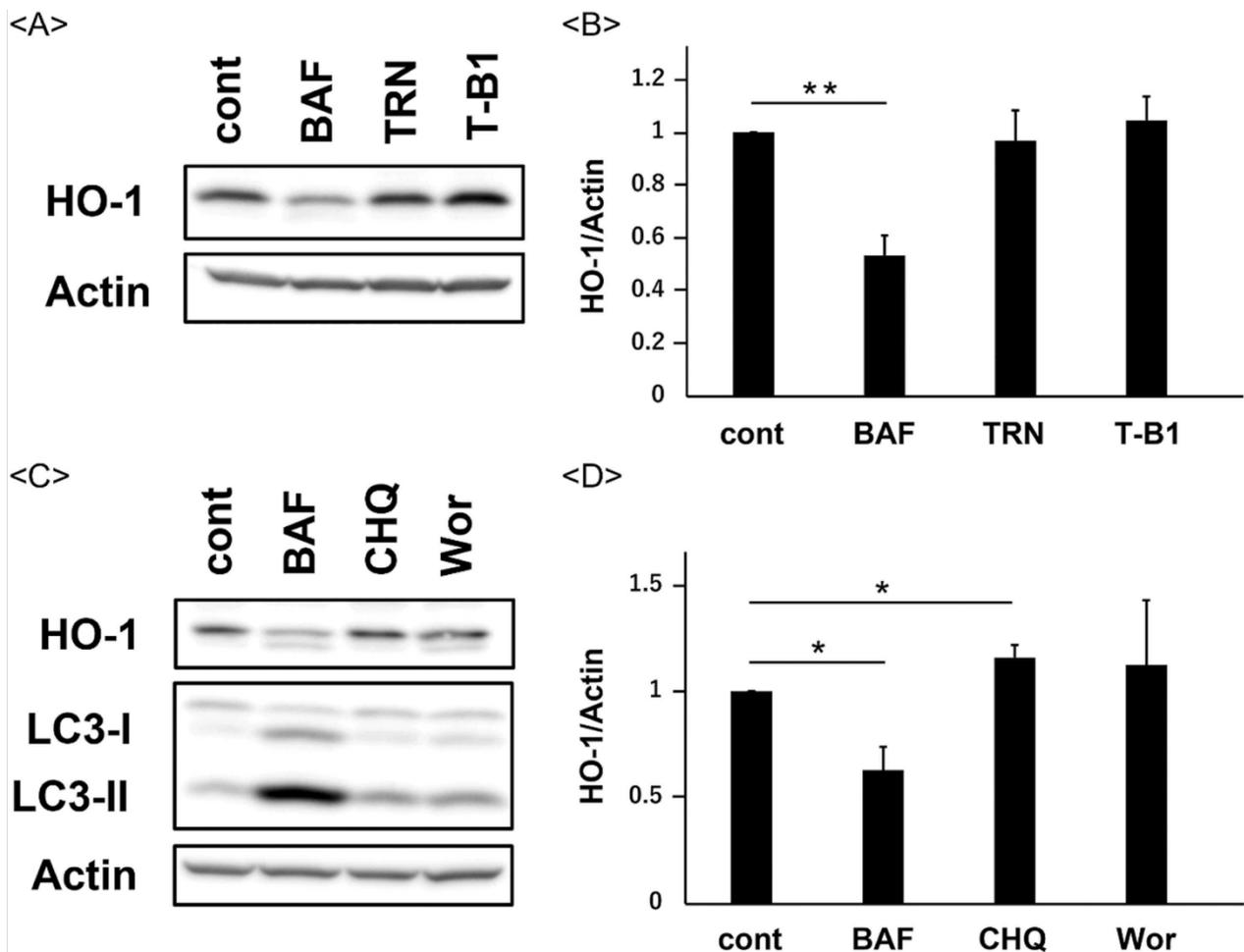


図3：オートファジー阻害薬バフィロマイシンA1によるHO-1発現の低下

(A) オートファジー阻害剤であるバフィロマイシンA1 (BAF, 20 nM)、オートファジー活性化剤であるTorin-1 (TRN, 10 nM) およびTat-Beclin1 (T-B1, 20 μM) で48時間処理し、BeWo細胞のHO-1の発現量をウェスタンブロッティングにより評価した。(B) BeWo細胞中の各薬剤処理におけるアクチンに対して正規化したHO-1の発現量を示すグラフ。(C) リソソーム機能に影響を与えるオートファジー阻害剤、BAF (20 nM) およびChloroquine (CHQ, 50 μM)、ならびにオートファゴソーム形成を阻害するWortmannin (Wor, 10 μM) で48時間処理したBeWo細胞におけるHO-1の発現を評価した。(D) BeWo細胞の各薬剤処理におけるアクチンの発現量に対して正規化したHO-1の発現量を示すグラフ。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も実施した。データは、平均値±S.D.で表される。

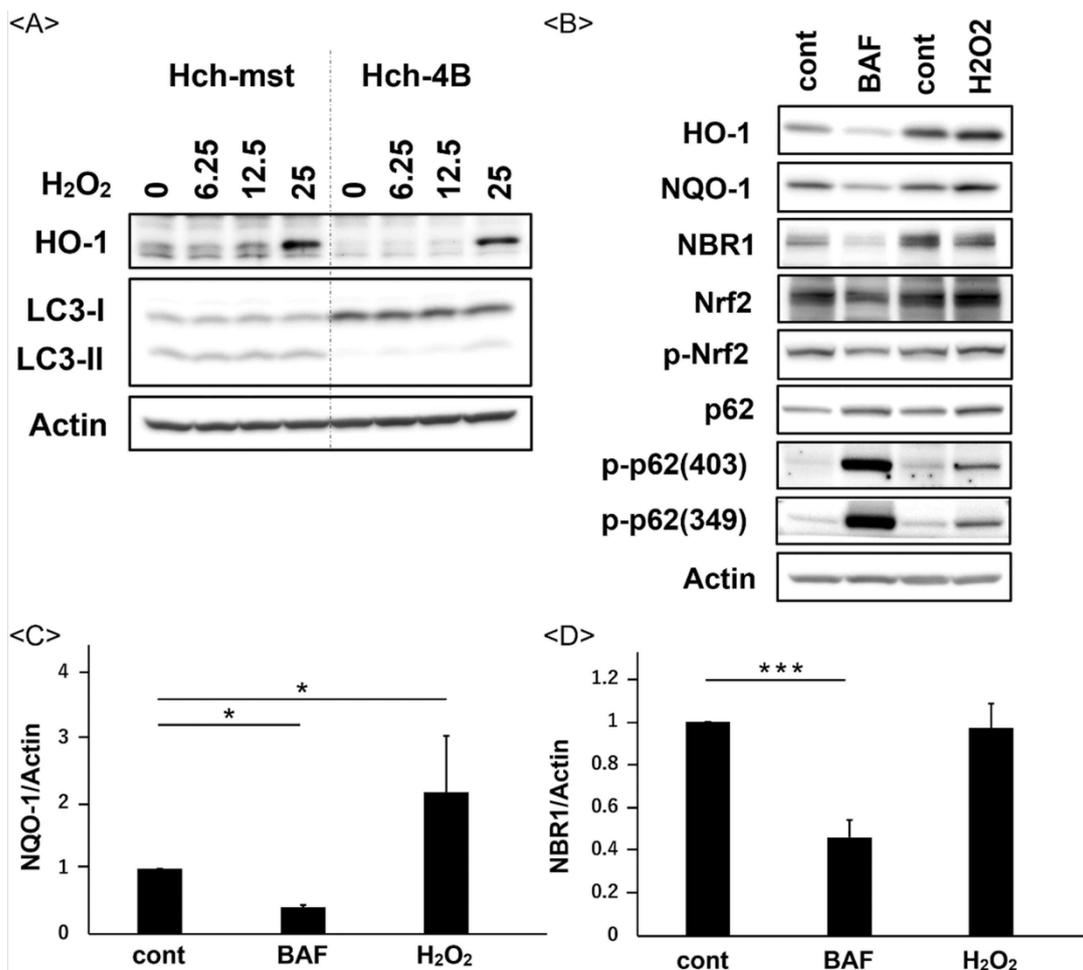


図4：パフィロマイシンA1によるHO-1の発現抑制は、NBR1の低下を伴う

(A) オートファジー正常細胞株であるHchEpC1b-mSt細胞とオートファジー欠損細胞株であるHchEpC1b-Atg4BC74A細胞を様々な濃度のH₂O₂ (6.25 - 25 μ M) で24時間処理し、ウェスタンブロットでHO-1、LC3-I/II、Actinを定量化した。(B) BeWo細胞をBAF (20 nM) で48時間処理 (BAFの左側にDMSOコントロールを示す)、またはH₂O₂ (1000 μ M) で24時間処理 (H₂O₂の左側に脱イオン蒸留水コントロールを示す) した。ウェスタンブロットでHO-1、NQO-1、NBR1、Nrf2、p-Nrf2、p62、Ser403およびSer349でリン酸化されたp62、およびアクチンの発現量を定量化した。BeWo細胞における、(C) NQO-1、(D) NBR1の発現量をアクチンの発現量に対して正規化したグラフ。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も実施した。データは平均値 \pm S.D.で表した。

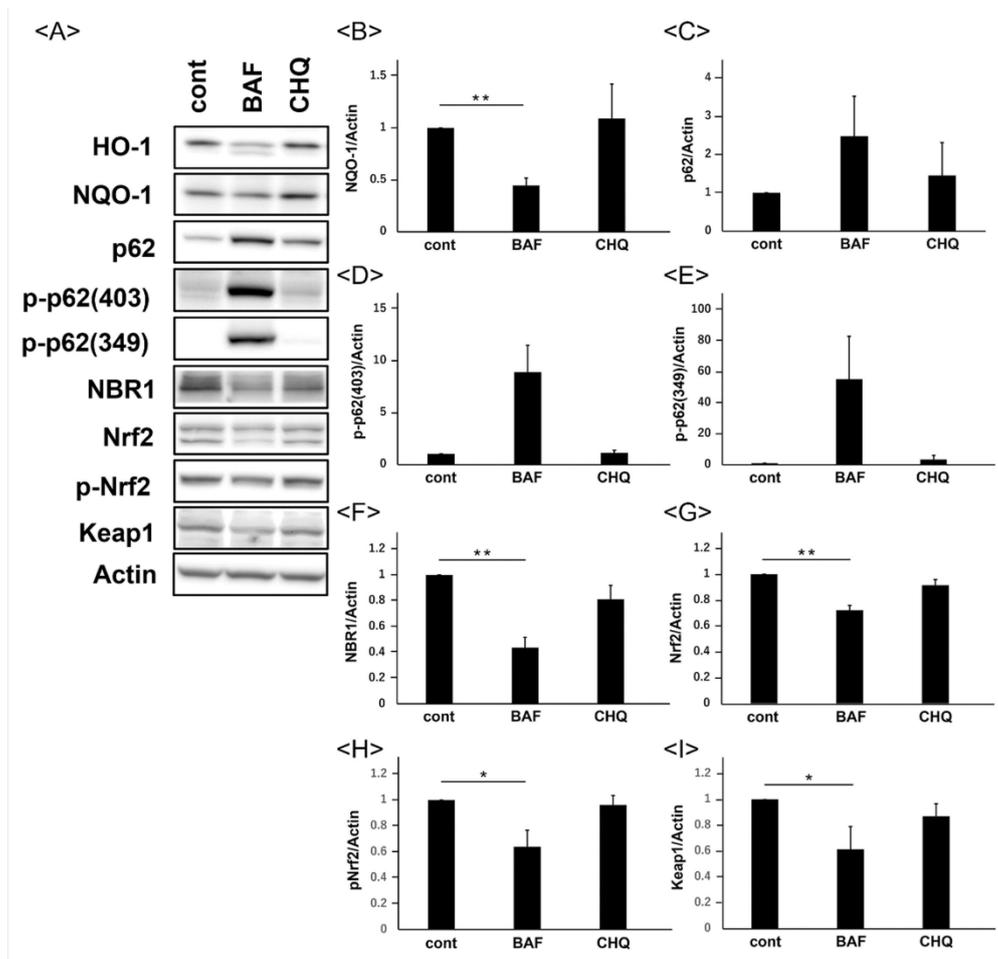


図5：オートファジー阻害剤バフィロマイシンA1またはクロロキニンによるp62-NBR1-Nrf2軸の制御の違い

(A) BeWo細胞をBAF (20 nM)およびCHQ (50 μM)で48時間処理し、ウェスタンブロットでHO-1、NQO-1、NBR1、Nrf2、p-Nrf2、Keap1、p62、Ser403およびSer349でリン酸化されたp62、およびアクチンを定量化した。各薬剤処置におけるBeWo細胞の、(B) NQO-1、(C)p62、(D) p-p62(Ser403)、(E) p-p62(Ser349)、(F) NBR1、(G) Nrf2、(H) p-Nrf2、(I) Keap1の発現量をアクチンに対して標準化したグラフ。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も行った。データは平均値±S.D.で表した * p < 0.05, ** p < 0.01.

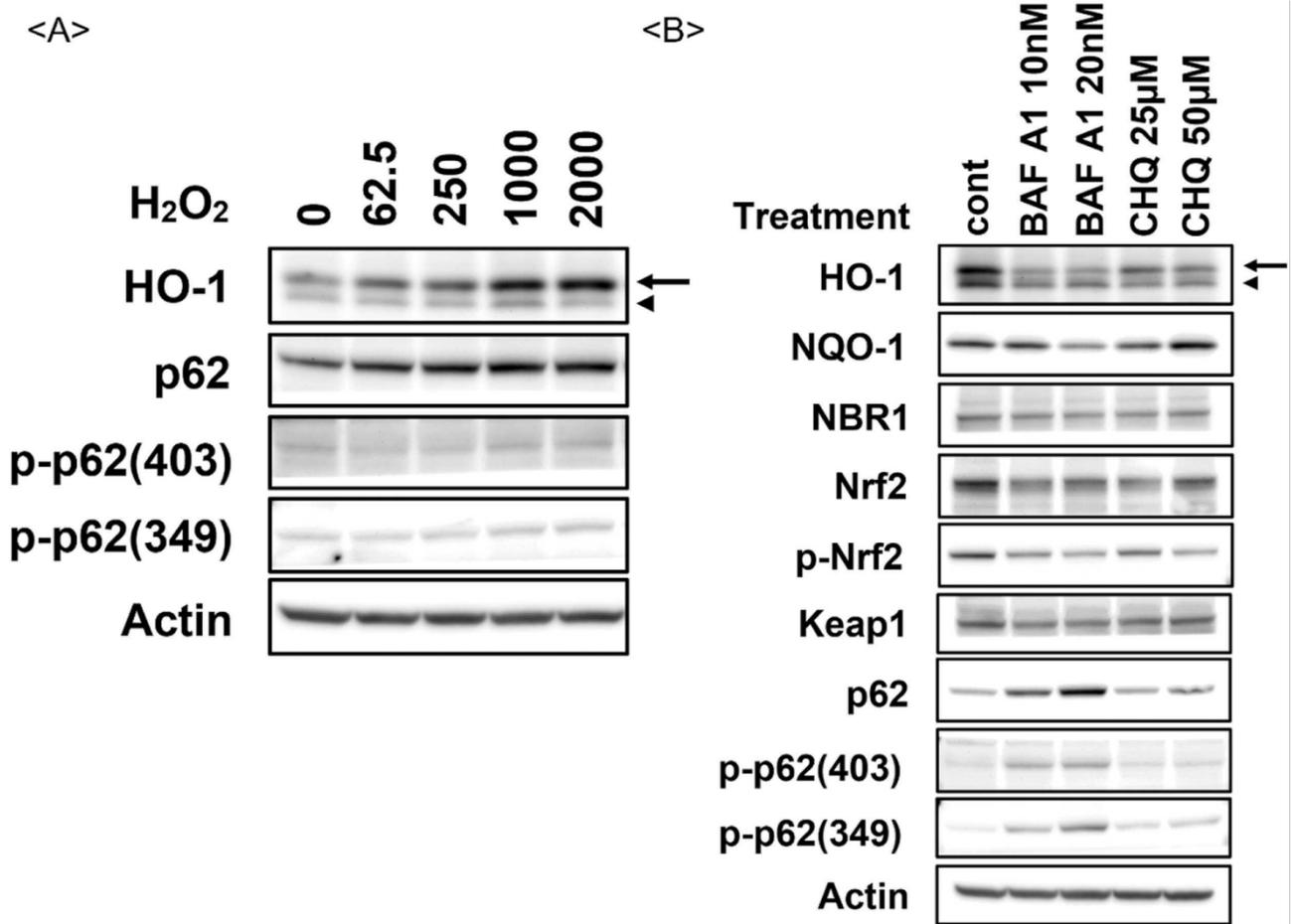


図6：ヒト絨毛組織におけるバフィロマイシンA1またはクロロキンによる抗酸化蛋白および選択的オートファジー関連蛋白の発現
 胎盤絨毛組織は帝王切開を受けた合併症のない妊娠の女性から得た。(A) 絨毛組織を様々な濃度のH₂O₂ (62.5 - 2000 μM)で48時間処理した。ウエスタンブロットでHO-1、p62、p-p62(Ser403)、p-p62(Ser349) およびアクチンを定量化した。(B) 絨毛組織を BAF (10 と 20 nM) または CHQ (25 と 50 μM) で72 時間処理し、ウエスタンブロットでHO-1 (矢印は特異的バンド、矢頭は非特異的バンド)、NQO-1、NBR1、Nrf2、p-Nrf2、Keap1、p62、p-p62(Ser403)、p-p62(Ser349)、およびアクチンを定量化した。