

「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（Autophagy: AtP）が重要であり、AtP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 AtP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、R3年度における成果として、AtP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（**Reprod. Med. 2022**）。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おり、また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。R4年度では、合胞体栄養膜細胞（STB）において抗酸化酵素HO-1が高発現しOS耐性を示すこと、AtP抑制がp62-NBR1-Nrf2-HO-1経路を通してSTBのHO-1発現を低下させることを報告した（**J Reprod Immunol 2023**）。

本年度はまず、AtP抑制が実際にSTBのOS耐性を減弱させることを確認した。さらにPE発症予測に実際に臨床応用されているsFlt-1/PIGF比に着目し、AtP抑制が絨毛におけるsFlt-1/PIGF比を上昇させることを明らかにした。次に、PE胎盤で低下を認めるHO-1に対し、AtP活性化剤でその発現回復を検討した。PE胎盤組織培養を行い、AtP調整剤を網羅的に投与したところ、クルクミンが著明にHO-1を誘導することが判明した。しかしクルクミンには細胞増殖抑制を認めたため、AtP調整剤の中で、クルクミンに類似するがより安全性が高いとされる薬剤Xを検討し、細胞増殖抑制を認めない濃度でのHO-1誘導、AtP活性化能が確認された。更に、薬剤Xは定常酸素条件下では sFlt-1/PIGF比に影響を与えなかったが、HO-1発現が低下する低酸素条件下やPE胎盤組織ではsFlt-1/PIGF比を低下させることがわかった。以上より、AtP抑制は栄養膜細胞の分化抑制、HO-1低下を介し、sFlt-1/PIGF比上昇というPEに類似した変化を起こすことを明らかとした。それに対し、薬剤Xは絨毛細胞の細胞死を誘因しない安全な濃度で、絨毛のHO-1誘導およびAtP活性化能を持つだけでなく、PE胎盤と同じ低酸素条件下で胎盤組織のsFlt-1/PIGF比を低下させるという、これまでにない絨毛細胞に直接作用する薬剤という新規性を示した。

以上より、胎盤形成不全の原因である様々な生物学的ストレスに対する保護機構として、胎盤AtP活性化が重要であることが判明した。現状、絨毛組織ではsFlt-1/PIGF比以外に臨床につながる評価法はない。今後は、ナノ粒子等化学ハザード物質を誘因とした“絨毛細胞”“胎盤組織”への生物学的ストレスの種類・多寡を明らかとし、絨毛細胞におけるAtP能の評価法の開発、その方法を実際の胎盤組織を用いて評価する方法へと繋げ、胎盤毒性リスク評価基盤に繋げていく。

A. 研究目的

我々は、絨毛細胞における AtP 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 AtP 活性化や OS、ER ストレスに関与すること（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（PMID: 33662506）。さらに昨年、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、絨毛細胞の OS と AtP の直接的関与を調べ、AtP 抑制が p62-NBR1-Nrf2-HO-1 経路を介して STB の HO-1 発現を減弱させることを報告した。本年は胎盤組織培養による sFlt-1/PIGF を測定することで、ex vivo による胎盤評価系の確立を目指した。

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 細胞を使用した。

絨毛組織は 37 週以降の正期産もしくは PE 患者における帝王切開分娩妊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℃、5% CO₂ 下の定常酸素下もしくは 1%酸素下で 24 時間培養した。

2. タンパク質定量の評価

AtP 阻害剤として Bafilomycin A1 (BAF; 20nM) を使用し STB および胎盤培養における HO-1 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. 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 1.2×10^6 個播種し一晩培養した後、濃度を調整した H₂O₂ 添加培地 100μL で培地を置き換えて 24 時間培養を行った。

4. sFlt-1/PIGF 評価

sFlt-1/PIGF は胎盤培養上清を用い、ELISA キットを用い評価した。

5. 統計解析

群間差の比較には、Welch の t 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)

胎盤検体は文書により患者同意を得たサンプルから作成され、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. オートファジー抑制剤 Bafilomycin A1 は合胞体栄養膜細胞の酸化ストレス耐性を減弱さ

せる

これまでの我々の検討で、BeWo 細胞に AtP 抑制剤である Bafilomycin A1 (BAF) を投与すると HO-1 が低下することが示されたため、BAF が実際に OS 耐性に影響を与えるか評価したところ、BAF の 24 時間前処置が BeWo 細胞における H₂O₂ による細胞増殖抑制をさらに増強させ、OS 耐性を減弱させることが判明した。

2. Bafilomycin A1 は胎盤培養上清中の sFlt-1/PIGF 比を増加させる

次に HO-1 が sFlt-1 分泌に関与するという過去の報告から、Bafilomycin A1 (BAF) が胎盤における sFlt-1/PIGF に影響を与えるか評価し、正常胎盤において BAF 投与は sFlt-1 増加傾向、PIGF 低下傾向を認め、sFlt-1/PIGF 比は有意な上昇を認めた。

3. クルクミンは合胞体栄養膜細胞の AtP を活性化させ、HO-1 を増加させる

AtP 抑制により合胞体栄養膜細胞の HO-1 発現が低下させることから、HO-1 発現を増加させる AtP 活性化剤の検討を行った。PE 患者の絨毛培養に AtP 調整剤を網羅的に投与したところ、クルクミン投与により HO-1 発現が著明に増加した。BeWo 細胞による WST-1 では HO-1 発現に要するクルクミン濃度では細胞増殖抑制を認めたため、より毒性が少ない薬剤スクリーニングを行い薬剤 X では細胞増殖抑制を認めない濃度で AtP 活性化を示す LC3-II の増加と HO-1 増加を作用があることが示された。

4. 薬剤 X は合胞体栄養膜細胞の酸化ストレス耐性を増強させる

薬剤 X による HO-1 発現増加が合胞体栄養膜細胞の OS 耐性に影響を与えるか検討を行った。薬剤 X の前処置は H₂O₂ による細胞増殖抑制を改善し、OS 耐性を増強させることが示された。

5. 薬剤 X は低酸素条件下において胎盤培養上清中の sFlt-1/PIGF 比を低下させる

最後に、薬剤 X による HO-1 発現増加が胎盤培養における sFlt-1/PIGF 比を低下させると予想し評価を行った。結果として定常酸素下での胎盤培養では薬剤 X は胎盤培養上清中の sFlt-1/PIGF に影響を与えなかった。PE 胎盤は低酸素環境であることが知られていたため、低酸素条件下 (酸素 1%)

で胎盤培養を行い、薬剤 X を投与したところ、sFlt-1/PIGF 比の低下を認めた。

E. 結論

本研究により、AtP 抑制剤である BAF が STB の OS 耐性を減弱させることが示され、AtP 抑制による HO-1 の減弱が STB の OS を増強させることが分かった。さらに胎盤組織培養により sFlt-1/PIGF 測定が可能となり、BAF が PE と同様に sFlt-1/PIGF 比を増加させることが明らかとなった。また HO-1 に関連した AtP 活性剤の検討により、薬剤 X が HO-1 を誘導し、PE 要因である低酸素条件下で sFlt-1/PIGF 比を低下させることが示された。

今後ナノ粒子等化学ハザード物質を誘因とした生物学的ストレスに対する保護機構として、胎盤オートファジー活性化による絨毛細胞生存能の評価のため、2つの方法を提案する。一つは、ナノ粒子およびその修飾による絨毛細胞において、OS 並びに ER ストレス誘導能を明らかとし、AtP 活性化に最も適した評価方法を研究代表者の堤らと共に確立することである。もう一つは、その機能評価を実際の胎盤組織を用いて評価する方法へと繋げることである。胎盤組織培養による sFlt-1/PIGF 測定は臨床に即した評価法であるが、それ以外にも蛋白発現解析を通して ex vivo の胎盤評価系が確立できれば、ナノ粒子を含む化学ハザード物質による胎盤成育の評価法として活用したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Cheng S, Huang Z, Nakashima A, Sharma S. Gestational Age-Dependent Regulation of Transthyretin in Mice during Pregnancy. *Biology (Basel)*. 2023 Jul 26;12(8):1048.
2. Araishi K, Shima T, Yasuda I, Tsuda S, Morita K, Yamaki-Ushijima A, Nakashima A, Saito S. Dynamics of neuropilin1 (Nrp1)-positive thymus-derived and Nrp1-negative peripherally induced paternal antigen specific regulatory T cells in the uterus and spleen during pregnancy in mice. *J Reprod Immunol*. 2023 Feb;155:103792.

【総説・その他】

1. Nakashima A, Furuta A, Yamada K, Yoshida-Kawaguchi M, Yamaki-Ushijima A, Yasuda I, Ito M, Yamashita S, Tsuda S, Yoneda S, Cheng S, Sharma S, Shima T. The Role of Autophagy in the Female Reproduction System: For Beginners to Experts in This Field. *Biology (Basel)*. 2023 Feb 26;12(3):373.

2. 学会発表

1. Furuta A., Yamada K., Yoshida M., Yamaki A., Yasuda I., Tsuda S., Shima T., Satoshi Y., Nakashima A.: Development of an in vitro preeclampsia model in the villous tissue using an autophagy inhibitor, Bafilomycin A1., The 1st Asian Congress for Reproductive Immunology (ACRI), 8-9 April, 2023.
2. Furuta A., Yamada K., Yoshida M., Yamaki A., Yasuda I., Tsuda S., Shima T., Satoshi Y., Nakashima A.: Association of hemeoxygenase-1 (HO-1), an antioxidant enzyme, with autophagy in trophoblasts; development of therapy for preeclampsia., The 75th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology, 12-14 May, 2023.
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: CCM-C1 によるオートファジー活性化/HO-1 誘導を介した PE 治療薬の検討., 第 43 回日本妊娠高血圧学会学術講演会, 2023 年 9 月 29 日-30 日
4. 古田 惇, 山田清貴, 吉田美保子, 山木明美, 津田さやか, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: オートファジー活性化 CCM C1 は胎盤 HO-1 増加により妊娠高血圧腎症治療薬となりうる., 第 31 回日本胎盤学会学術集会, 2023 年 11 月 3 日-4 日
5. 古田 惇, 山田清貴, 吉田美保子, 山木明美, 津田さやか, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: 抗酸化酵素 HO-1 とオートファジーを介した妊娠高血圧腎症治療薬の展望., 第 38 回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 2023 年 11 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

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし