

博士論文

胎盤形成制御におけるバソヒビンファミリーの役割

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

発生・発達医学講座 周産期医学分野

末永 香緒里

目次

1. 要約	2
2. 研究背景	5
3. 研究目的	9
4. 実験方法	10
5. 結果	20
6. 考察	25
7. 結論	30
8. 謝辞	31
9. 参考文献	32
10. 図	39
11. 図説	49

1. 要約

「目的」バソヒビンファミリーは新規の血管新生制御因子で、バソヒビン 1(VASH1)は血管内皮細胞から分泌され血管新生抑制作用を持ち、一方バソヒビン 2(VASH2)はバソヒビン 1 のホモログとして単離され、血管新生促進作用をもつ。胎盤は形成過程において血管新生制御因子が関与していることは知られているが、バソヒビンファミリーとの関連を示す報告はない。そこでバソヒビンファミリーの胎盤形成における役割を検討した。

「方法」ヒト胎盤（妊娠満期の正常妊娠例）の免疫染色で、バソヒビンファミリーの発現を確認した。次にマウスモデルを用いた検討を行った。9～12 週齢の未経産マウスで、野生型 (C57BL6) をコントロールとし、バソヒビン 1 ノックアウトマウス (VASH1(-/-))、バソヒビン 2 ノックアウトマウス(VASH2(-/-))を対照群とした。同種のマウスと交配、膣栓を確認した朝を胎生 0.5 日目とし、胎生 12.5 日目、16.5 日目、18.5 日目に犠牲死させた。胎盤重量、胎盤構造（免疫染色、電子顕微鏡）、血管作動性因子の発現（胎盤での mRNA 発現および妊娠マウスの血中濃度）、胎盤形成に関わる遺伝子 (Gcm1、SynB、SynA) の発現について検討した。さらに、ヒト絨毛癌細胞株の BeWo 細胞を用いて、VASH2 を発現抑制した場合の細胞融合とそれに関わる遺伝子(Gcm1、Syn1、Syn2)の発現について検討した。

「結果」ヒト胎盤組織において、VASH1 は血管内皮細胞、VASH2 はトロフォブラストに発現をみとめた。マウスモデルの検討では、胎盤重量が胎生 18.5 日目に

VASH2(-/-)で明らかに減少していた。同時期の胎盤のラビリンスでは、VASH1(-/-)で胎児血管が増加し、VASH2(-/-)で胎児血管が減少していた。電子顕微鏡の検討では、VASH2(-/-)では syncytiotrophoblast(SynT)- II 層の細胞融合が障害されていた。そのため細胞融合に関与する遺伝子の発現を real-time PCR で確認したところ、胎生 18.5 日目に VASH2(-/-)で SynB の発現のみが明らかに抑制されていた。次にヒト絨毛癌のセルライン BeWo 細胞をもちいて Fusion assay を行った。フォルスコリンを添加すると、コントロールに比し細胞融合率が増加した。しかし、siRNA を導入し内因性の VASH2 をノックダウンした細胞にフォルスコリンを添加すると、VASH2 ノックダウン群で細胞融合率が低下した。一方、融合に関与する遺伝子 Gcm1、Syn1、Syn2 の発現には変化がなかった。

「考察」マウスモデルの検討により、胎盤においてもバソヒビンファミリーの血管新生制御がおこっている可能性が示唆された。さらにヒト胎盤において VASH2 はトロフォブラストに発現をみとめることが初めて明らかとなり、マウスモデル、細胞を用いた検討で VASH2 の新たな機能としてトロフォブラストの細胞融合に関係する可能性が示唆された。しかし、マウスでは細胞融合を制御する synB の発現が変動していたのに対し、BeWo 細胞を用いた検討では細胞融合促進因子の Gcm1、Syncytin の発現は変わらず、その制御機構は従来の Gcm1-Syncytin 経路とは異なる可能性もあり、今後解明が望まれる。

本研究はバソヒビンが従来の報告通り胎盤において血管作動性因子として働いてい

ることを確認した初めての研究である。また、バソヒビン 2 の新たな機能として、トロフォブラストの細胞融合に関する可能性を発見した。

2. 研究背景

胎盤は、母体胎児間の栄養代謝物交換やガス交換を行うとともに、種々のホルモンや成長因子を産生し正常な胎児発育を支えている。ヒト胎盤は胎児側から羊膜、絨毛構造(絨毛間腔および絨毛)、脱落膜という構造をもつ¹⁾。とくに絨毛部は直接母体血と絨毛が接する血絨毛性胎盤とよばれる構造になっており、ガス交換、アミノ酸や糖などの物質交換が効率よくできるという利点を持ち、哺乳類のなかでも進化したヒト、マウスに特徴的な胎盤の構造である^{2,3)}。マウスはこの絨毛部がラビリンスとよばれ、三層のトロフォブラスト細胞層および胎児血管内皮細胞を介して母体血と胎児血が接する構造をしている²⁾。前者は母体側にモノヌクレアトロフォブラスト層(mononucleartrophoblast layer ; 単核合胞体層)が位置し、その外側(胎児側)に2層のシンシチオトロフォブラスト層(syncytiotrophoblast layer ; 栄養膜合胞体層)がありこれは母体側からSynT- I層、SynT- II層にわけられる²⁾。このシンシチオトロフォブラストはサイトトロフォブラストが細胞融合した結果形成された多核の細胞である^{3,4)}。

細胞融合は酵母からヒトまで幅広くみられる現象で、酵母の接合、筋芽細胞の融合、受精、胎盤のトロフォブラストの融合、マクロファージの融合、幹細胞の融合などが報告されている⁵⁾。哺乳類の胎盤ではトロフォブラストの融合によりシンシチオトロフォブラストが形成され、母体と胎児血の間のバリアとして働いている⁵⁾。また、シンシチオトロフォブラストは栄養やガス交換を行う一方で、胎盤ラクトゲンや絨毛性ゴナドトロピン(hCG)などのホルモンを産生し妊娠に寄与する⁶⁾。以上より胎盤

形成過程において細胞融合は重要な過程といえる。このトロフォブラストの細胞融合に必要な蛋白のひとつに Syncytin があり、Glial cell missing1(Gcm1)という転写因子に誘導されることがわかっている^{5,7,8)}。Syncytin は内在性レトロウイルス由来の蛋白で、マウスでは SyncytinA (SynA)、SyncytinB (SynB)、ヒトでは HERV-W の Syncytin1 と HERV-FRD の Syncytin2 がある⁴⁾。マウスにおいて SynB は SynT-II に局在し細胞融合を誘導する遺伝子で^{2,9)}、一方 SynA は SynT-I で同様に細胞融合を誘導する遺伝子である¹⁰⁾。また、Syncytin1 はサイトトロフォブラスト (cytotrophoblast: 栄養膜細胞層)、シンシチオトロフォブラスト、絨毛外トロフォブラストで発現し、Syncytin2 は融合する前のサイトトロフォブラストで発現していることが報告されている^{4,8)}。(Fig1)

一方、正常な胎盤発育には、母体側、胎児側ともに各々特徴的な血管の変化、増殖、新生が起こる必要がある¹⁾。母体側では絨毛外栄養膜細胞の浸潤により、子宮筋層内らせん動脈における血管運動神経支配の消失および脱落膜内らせん動脈の形質変化と再構築がおこり、子宮動脈血流量が増加し、胎児発育に有利な環境を作り出している¹⁾。一方、胎児側では胎盤の形成により新たに胎児胎盤循環が形成される^{1,11)}。胎児血管形成は胎生 21 日目という早期から開始され、その後妊娠 24 週までは血管が次々に分枝しネットワークを形成していく¹¹⁾。この時期の血管新生には、サイトトロフォブラストから産生される血管新生因子 Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A)が大きな役割を果たす¹¹⁾。その後妊娠 24 週から妊娠満期にむかって血管は分枝を伴わない形へと変化していき、この時期には VEGF-A の発現は低下する一方で、

Placental Growth Factor (PlGF), soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (sVEGFR-1)が増加している¹¹⁾。また胎盤形成過程において、VEGFは血管新生以外にも、トロフォブラストの増殖、遊走、代謝活性に関与していることが分かっている¹²⁾。以上より正常な胎盤発育において血管新生制御因子は大きく関与している。

血管新生は、促進因子と抑制因子とのバランスが巧妙に保たれることにより調節されていると考えられている¹³⁾。その代表的な血管新生促進因子はVEGFで、一方血管新生抑制因子は血管外の細胞に由来し、血管新生を抑制して血管の侵入を防御するか、新生された血管を退縮させるものが中心であった¹³⁾。バソヒビンファミリーであるVasohibin1 (VASH1) と Vasohibin2(VASH2)は新たな経路で血管新生を調節する因子として2004年に発見された¹³⁻¹⁵⁾。VASH1は血管内皮細胞が自ら産生して血管新生を負にフィードバック調節する血管新生抑制因子で、VEGFやFGF-2によりその発現が誘導される¹³⁻¹⁵⁾。VASH1(-/-)マウスを用いた検討では血管新生が停止すべき位置で停止せず、壁細胞による被覆の乏しい未熟な形態を呈する血管を持つという報告がある¹³⁻¹⁵⁾。その発現は免疫染色により、様々な腫瘍、動脈硬化性病変、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症等の血管新生が盛んな病態の血管内皮細胞で確認されている¹⁵⁻²³⁾。また乳癌や非小細胞肺癌では、VASH1/CD31陽性比が血管新生を反映し、新生血管のマーカーとして有用であるとの報告もある^{16,17,23)}。一方、VASH2はVASH1のホモログとして単離・同定され、骨髄の単核球でその発現が確認されており、VASH2(-/-)マウスでは出芽部位での血管新生が抑制されていることから、血管新生を促進する働きを

持つと考えられている^{24,25)}。肝細胞癌や卵巣の漿液性腺癌において癌細胞での発現も報告されており、血管内皮細胞以外で発現し腫瘍血管新生に関与していることも明らかとなっている^{26,27)}。またこれらの分泌に低分子量 Vasohibin 結合蛋白 (SVBP ; small vasohibin binding protein) が関与しており、この蛋白が VASH1 や VASH2 と結合することで細胞外に分泌を促す機能を持つことがわかっている²⁸⁾。これらバソヒビンファミリーはどれも種を超えて保存されており、生命にとって必要な蛋白である可能性が考えられる¹⁴⁾。

3. 目的

胎盤形成において血管新生制御因子が大きく関与していることは明らかであるが、現在までバソヒビンファミリーが胎盤形成に関与するという報告はほとんどない。そこで、①ヒト胎盤を用いた発現部位の検討、②ノックアウトマウスモデルを用いた検討（胎盤形成におけるバソヒビンの影響を検討）、③ヒト絨毛癌細胞株 **BeWo** 細胞を用いた検討（**VASH2** の細胞融合に与える影響を検討）を行い、バソヒビンファミリーが胎盤形成における働きを解明することを目的とした。

4. 実験方法

ヒト胎盤の免疫染色

今回ヒト胎盤を用いて行った本研究は、東北大学医学系研究科倫理委員会の承認をうけたものである(2010-346)。本研究の趣旨を説明し、署名にて同意を得た患者より採取した胎盤を用いた。ヒト胎盤は正常妊娠例(N=4)で、妊娠38~40週で経膈分娩または帝王切開術で娩出後に採取した。2 cm大のブロックにした胎盤を4%パラホルムアルデヒド(Wako, 大阪)に浸し4°Cで二晩固定した。その後通常の手順でパラフィン包埋を行った。パラフィン切片(5 μ m)は、脱パラフィン後内因性ペルオキシダーゼ処理(3%過酸化水素(三徳、東京)/メタノール)を行い、121°Cで5分間、オートクレーブによる抗原賦活化を行った。バッファーはTarget Retrieval Solution, pH 6(Dako, CA, USA)を用いた。PBSで洗浄後、1% bovine serum albumin(BSA;Sigma-Aldrich, MO, USA)/PBS-T(PBSに0.1% tween-20(Sigma-Aldrich)を混ぜたもの)で室温30分ブロッキングし、一次抗体(VASH1;4E12¹¹⁾, VASH2;5E3¹⁹⁾, コントロールとして normal mouse IgG(sc-2025, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA))を2 μ g/mlに希釈し切片に載せ4°Cで一晩静置した。翌朝PBSで洗浄後、ヒストファイン シンプルステイン MAX PO(M)(ニチレイ、東京)を30分室温で反応させDAB染色(DAB Tablet, Wako)を施行した。発色反応停止後はヘマトキシリンで核染色を行い、脱水、透徹後、封入した。

動物モデル

本研究は東北大学倫理指針に基づき、承認のもと施行した（2011 加動-45、2012 加動-32、2012 加組換-4）。

9~12 週齢の C57BL6 の未経産雌マウス、VASH1 および VASH2 のノックアウトマウス(VASH1(-/-)マウス, VASH2(-/-)マウス)を用いた。本遺伝子改変マウスは加齢研腫瘍循環研究分野で作成し飼育しているもので、その背景が C57BL6 であるため C57BL6 をコントロール群(野生型)とし、実験群であるノックアウトマウスと比較検討した。それら 3 種の雌マウスを同種の雄と交配し、膣栓を確認した朝を胎生 0.5 日目とし、胎生 4.5/8.5/10.5/12.5/14.5/16.5/18.5 日目に体重および血圧測定をおこなった。また胎生 12.5/16.5/18.5 日目に犠牲死させ解剖し、母体重量、胎盤重量の計測とサンプル採取（母体血液、胎盤）を行った。血液は心臓から EDTA を用いて採血し、遠心(4℃、2000g、20 分)後血漿のみを-80℃で保管した。胎盤は卵膜を除去し血液をふき取ったのち、1 検体が 50~100mg になるように 1/2 ずつにわけてエッペンに入れ、すぐに液体窒素で凍結、-80℃で保管した。

マウス胎盤の免疫染色

還流固定

マウス胎盤のラビリンス (Labyrinth) のより詳細な構造を明らかにするために、tomato lectinを用いた還流固定を行った。胎生18.5日目のマウスを麻酔後、2倍希釈し

たFITC-conjugated tomato lectin (*Lycopersicon esculentum* lectin; 1 mg/ml; Vector Laboratories, CA, USA) 100 μ lを尾静注し、10分後開胸、左室から4%PFAを100-120mmHgの圧で5分間還流した²⁹⁾。10分静置後、子宮を剥離せずに胎盤を取り出し、PBS洗浄後30%ショ糖で4 $^{\circ}$ C一晩置換し、翌日O.C.Tコンパウンド(SakuraFinetek, CA,USA)で包埋、-80 $^{\circ}$ Cで保管した²⁹⁾。

免疫染色

凍結切片(20 μ m)は風乾後、PBS で洗浄し、1%BSA/PBS-T で Blocking 処理を行った(30分、室温)。1次抗体[Rat Anti-Mouse CD31 (BD Biosciences, CA, USA)、anti-rabbit TypeIVcollagen(ab6586, abcam, MA, USA)]を200倍希釈したものを切片に載せ4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。翌日PBS洗浄後、二次抗体[Alexa Fluor 633conjugated goat anti-rat IgG (Molecular Probes, Eugene, OR)、Alexa Fluor 555conjugated donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes)]を200倍希釈したものを切片にのせ室温で30分反応させたのち、封入した。切片は蛍光顕微鏡(BZ-9000, Keyence, 大阪)で観察し、同機の解析ソフトで胎児血管腔面積を測定した。400倍で撮影し1サンプルあたり10視野を撮影、1視野あたりに占める胎児血管腔の割合を算出した。1群あたり3~5サンプルを用いて、統計解析はSteel-Dwass検定でおこなった。

電子顕微鏡観察

固定

4%PFA で還流固定後、子宮を剥離せずに胎盤を摘出、PBS で洗浄し、2%グルタールで後固定した²⁹⁾。0.1M の PB で3回洗浄、1%オスミウムで後固定(4℃1時間)し超純水に保存した²⁹⁾。ブロック染色(1%ウランを4℃で2時間)を行い、再度超純水で洗浄、その後順次アルコール濃度を上げながら脱水した(50%アルコール10分、70%アルコール10分、90%アルコール10分、95%アルコール10分、100%アルコール10分、100%アルコール15分、100%アルコール15分)²⁹⁾。プロピレンオキシサイト15分、プロピレンオキシサイト15分、プロピレンオキシサイト+EPON=2:1を30分、プロピレンオキシサイト+EPON=1:1を30分、さらにEPONに2~3時間浸透させ、60℃で二晩重合反応させた²⁹⁾。

超薄切片作成

ガラスナイフで厚さ0.5 μ mのsemi-thin切片を作成し、ホットプレートで乾燥後、フィルター付き注射器で0.1%トルイジン青/0.05Mリン酸緩衝液を加え、加温染色し鏡検した。

ダイヤモンドナイフで超薄切片を作成し、ウランに室温で10分浸漬し、超純水で洗浄、鉛に2分浸漬させH-7000 electron microscope(Hitachi, 東京)で観察した²⁹⁾。

RNA 単離および定量的 RT-PCR (real-time PCR)

RNA は ISOGEN (ニッポンジーン、富山) を用いて単離した。-80 度に保管している検体 (50~100mg ずつ保管) に ISOGEN を 1ml 添加、以降プロトコール通りに RNA を抽出した。抽出した RNA は吸光度を測定し、OD260/280=1.8~2.0 であることを確認した。

Total RNA1 μ g をテンプレートとし、ReverTraAce- α - (東洋紡、大阪) を用いて cDNA を作成した。SYBR[®] Premix Ex Taq (TaKaRa、滋賀) を用い、 thermal cyclers system (CFX-96 Real-Time system, C1000 Thermal Cycler, Bio-rad, 東京) を使用して real-time PCR を行った。使用したプライマーは以下のとおりである。

mouse GAPDH;

5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'(S)

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3' (AS)

mouse VEGF164 (mVEGF164);

5'-GCCAGCACATAGAGAGAATGAGC-3'(S)

5'- CAAGGCTCACAGTGATTTTCTGG-3' (AS)

mouse soluble VEGFR1;

5' -ACTCTCAGACCCCTGGAATC -3'(S)

5'- GATCCGAGAGAAAATGGCCT -3' (AS)

mouse PIGF;

5'-CTGGTCATGAAGCTGTTCAC-3'(S)

5'-TGCTCTGTGAATGCAGACCT-3'(AS)

mouse GCM1(Glial Cell Missing 1);

5'- TCCAACCTCCTTACGGATGAA -3'(S)

5'- GGG CGT TAG CTA TTA AAG GTG-3' (AS)

SynB;

5'- TCTCACTGGCACTTCATTCC -3'(S)

5'- TCAGGTTATGAGGTGAGAGG-3' (AS)

SynA;

5'- TTGGTTGACTTCCCTCATGG -3'(S)

5'- AGCAGAAGGATCTTGTCCAC -3' (AS)

Housekeeping 遺伝子は 7 つの遺伝子(GAPDH、mB2M、mHPRT1、mRPLPO、mACTB、mGUSP、mTBP)を用いて検討し、野生型マウスとノックアウトマウスで発現が安定していた GAPDH を用いることとした。各遺伝子の発現量は、GAPDH を internal control、野生型の胎生 12.5 日目サンプルの発現を 1 とし、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。統計処理は VEGF、sVEGFR1、PIGF については Steel-Dwass 検定を、SynA、SynB および Gcm1 については Mann-Whitney 検定を用いた。

各種血管作動性因子の定量 (ELISA)

Mouse VEGF、soluble VEGFR1(sVEGFR1)、PlGF の血中濃度測定に ELISA kit を使用した [Mouse VEGF Quantikine ELISA kit (MMV00, R&D systems, MN, USA), Mouse VEGF R1/Flt-1 Quantikine ELISA Kit (MVR100, R&D systems), and Mouse PlGF-2 Quantikine ELISA kit (MP200, R&D systems)]。検体はマウスを犠牲死させた際に EDTA 採血し遠心分離して得た血漿を -80℃ で保管していたものを用いた。プロトコール通りに測定を行った。

ヒト絨毛癌セルライン、BeWo 細胞を用いた検討

BeWo 細胞の培養、継代

BeWo 細胞は、理研バイオリソースセンター（茨城）より購入した。10% fetal calf serum (FCS) 加 Ham'sF10(Sigma-Aldrich)を用いて 5%CO₂ 存在下、37℃ で継代培養した。培地は 1 日おきに交換し、4 日ごとに継代した。

Fusion assay (RNA 単離と PCR、免疫染色)

1.5×10⁵/ml の細胞を 6cm dish に撒き一晩インキュベートしたのち、翌日 Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent(Invitrogen Life Technologies, CA, USA) と Opti-MEM[®] Medium、small-interfering RNA(si-RNA 最終濃度 25nM)(Control または humanVASH2)と Opti-MEM[®] Medium を各々混和、それらを 1:1 で混ぜ 5 分室温でイ

ンキュベートしたのち新しいメEDIUMに交換した dish に 1ml ずつ添加、インキュベートした。その 4~6 時間後にメEDIUMを交換し、翌日(si-RNA 添加後 24 時間後)メEDIUMを再度交換後フォルスコリン (Forskolin(Sigma-Aldrich)) を 20 μ M 添加、48 時間インキュベートし、RNA 回収または細胞の免疫染色をおこなった。Synthetic Stealth siRNAs 、Non-specific StealthRNAi Negative Control Medium GC Duplex #2 は Invitrogen Life Technologies より購入した。

siVASH2;

5'-CACUCUGAAUGAAGUGGGCUAUCAA-3'(S)

5'-UUGAUAGCCCACUUCAUUCAGAGUG-3'(AS).

RNA 単離と定量 PCR

RNA 単離は上述通り ISOGEN を用いて単離し、RNA 1 μ g をテンプレートとし ReverTraAce- α - を用いてプロトコール通りに cDNA を作成した。real-time PCR は SYBR^R Premix Ex Taq を用いて、上述の thermal cycler system を使用した。

使用したプライマーは以下のとおりである。

Human β -actin;

5'-ACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3'(S)

5'-TCTCCTTAATGTCACGCACGA-3'(AS)

Human VASH2;

5'-ACGTCTCAAAGATGCTGAGG-3'(S)

5'-TTCTCACTTGGGTCGGAGAG-3'(AS)

Human GCM1

5'-GCTGGGACTTGAACCAGCAGTAA-3'(S)

5'-CTCAAGCACCTTGGACCAGGA-3'(AS)

Syncytin1;

5'-CGCCTGCTCTTCAAACAA3'(S)

5'-GGCCATGGGGATTATGATT-3'(AS)

Syncytin2;

5'-TCGGATACCTTCCCTAGTGC-3'(S)

5'-TGTATTCCGGAGCTGAGGTT-3'(AS)

である。

また各遺伝子の発現量は β -actin を internal control とし、なにも添加していないサンプルの発現を 1 とし、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。統計処理は Steel-Dwass 検定を用いた。

細胞免疫染色および Fusion index の算出

細胞染色用の 6cm dish に事前にカバーグラスをいれておき、そこに前述通り細胞を播種した。また siRNA を導入した処理、およびフォルスコリンの添加処理も前述同様におこなった。0.3%ホルムアルデヒド液(WaKO)で 10 分間固定後、Tris Buffered Saline (TBS) で洗浄、0.3%Triton/TBS に 10 分間浸し細胞膜の透過処理を行った。再度 TBS で洗浄後、5%BSA/PBS で室温 30 分間ブロッキングした。その後 1 次抗体 [E-cadherin(Code No.M108 ,TaKaRa)を 10 μ g/ml に希釈、またはコントロールとして normal Rat IgG (sc-2026, Santa Cruz Biotechnology)を同濃度で希釈] をカバーグラスにのせ 4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。翌日 TBS で洗浄後、二次抗体[200 倍希釈した Alexa Fluor $^{\circledR}$ 488 Goat Anti-Rat IgG (H+L) Antibody (Invitrogen Life Technology)と 10000 倍希釈した DAPI(Invitrogen Life Technology)を混合]を切片にのせ室温で 45 分間反応させ封入した。検体は蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence)を用いて 400 倍で観察し、1 検体あたり 10 か所撮影後、Adobe Photoshop CS6(Adobe, CA, USA)を用いて解析し Fusion index を計算した。2 核以上をもつ細胞を syncytia と定義し、syncytia の細胞数、全細胞数、syncytia の核数、全核数を算出し、Fusion index(%)=[(syncytia の核数) - (syncytia の細胞数)]/全核数 \times 100 で計算した^{30,31)}。統計処理は Steel-Dwass 検定でおこなった。

5. 結果

胎盤における Vasohibin1、Vasohibin2 の局在について

Vasohibin1 は従来¹⁵⁾の報告通り、胎児の血管内皮細胞にその局在を確認した (Fig2A)¹⁵⁾。また Vasohibin2 は絨毛を取り囲むように発現し、トロフォブラストにその局在をみとめた (Fig2B)。

胎盤の血管形成における VASH1、VASH2 の役割

ノックアウトマウスの表現型について

妊娠中のノックアウトマウスの表現型について検討した。

妊娠前体重は野生型 19.7 ± 0.2 g、VASH1(-/-)マウス 18.2 ± 0.2 g、VASH2(-/-)マウス 19.0 ± 0.4 g であり、野生型に比べ VASH1(-/-)マウスが小さかった ($P < 0.0001$) (Fig.3A)。一腹あたりの胎児数は 3 群間に有意な差はなかった (野生型 7.3 ± 1.5 匹、VASH1(-/-)マウス 6.7 ± 2 匹、VASH2(-/-)マウス 7.2 ± 1.4 匹) (Fig.3B) (以上の統計解析は Steel-Dwass 検定を用いた)。妊娠中の血圧の推移は、野生型で収縮期は妊娠中期(胎生 12.5 日目)にかけてやや低下し、その後上昇傾向をしめすヒトと同様の変化がみられた³²⁾。VASH1(-/-)マウスは収縮期血圧最低点が野生型同様胎生 12.5 日目であり、最低点の血圧に差はないが、その前後は野生型に比べ有意に収縮期血圧は低値であった ($P < 0.05$)。拡張期血圧も同様の変動を示し、最低点である胎生 12.5 日目を除いた他の時点において野生型に比し有意に低値を示した ($P < 0.05$) (Fig.2 C)。一方、VASH2(-/-)マウスは収縮

期、拡張期ともに妊娠中を通じて野生型マウスに比べ有意に低値をしめした($P<0.05$) (Fig.3C) (野生型マウス $N=16$ 、VASH1(-/-)マウス $N=15$ 、VASH2(-/-)マウス $N=7$)。VASH2(-/-)マウスの胎盤重量は胎生 18.5 日目においては野生型マウスに比し 12.5%、VASH1(-/-)マウスに比し 11.1%小さく、野生型マウスに比し有意に小さかった。 $(P=0.0002)$ 。(野生型 $83\pm9.2\text{mg}$ 、VASH1(-/-)マウス $81.7\pm10.6\text{mg}$ 、VASH2(-/-)マウス $72.6\pm6.5\text{mg}$) (Fig.3D)

マウス胎盤の病理学的検討

tomato lectin を用いた還流固定を行い、蛍光免疫染色で胎盤内のラビリンスの血管構築を検討した。母体血管腔が lectin により緑色に囲まれた腔、胎児血管腔が赤色 (typeIV collagen、基底膜を染色)に覆われた青色(CD31、血管内皮細胞を染色)に囲まれた腔で示される。1 視野全体に占める胎児血管腔面積の割合を定量すると、VASH1(-/-)マウスは野生型マウスに比し明らかに広く($p=0.006$)、VASH2(-/-)マウスは野生型マウスに比し明らかに小さかった($p=0.0001$) (野生型マウス $35.5\pm6.9\%$ 、VASH1(-/-)マウス $40.8\pm6.1\%$ 、VASH2(-/-)マウス $28.6\pm4.5\%$) (Fig4)。

血管作動性因子の検討

血管作動性因子の発現を検討するため、real-time PCR を行った。

VEGF164、sVEGFR1、PlGF の real-time PCR では野生型マウスおよび VASH1(-/-)

マウスと VASH2(-/-)マウスにあきらかな発現の差はなかった(Fig.5)。VEGF の血中濃度は野生型に比し、胎生 12.5 日目で VASH1(-/-)マウスにおいて明らかに低下($P<0.05$)し、また胎生 18.5 日目で VASH2(-/-)マウスにおいて明らかに上昇していた($P<0.01$)。PlGF、sVEGFR1 の血中濃度については 3 群間に有意な差はなかった (Fig6) (Steel-Dwass 検定を使用)。

マウス胎盤のトロフォブラストの構造

semi-thin 切片(0.5 μ m)の観察により、胎児血管腔は血球を含み、一方絨毛間腔はその中に血球を含まない腔で、二つの腔に挟まれるようにトロフォブラスト層をみとめた。蛍光免疫染色の結果同様、胎児血管腔は VASH1(-/-)マウスで大きく、VASH2(-/-)マウスで小さい印象があった(Fig.7 上段)。また電子顕微鏡を用いてより詳細にトロフォブラストを観察したところ、野生型マウスおよび VASH1(-/-)マウス、VASH2(-/-)マウスで2層のシンシチオトロフォブラスト層と1層のモノヌクレアトロフォブラスト層を確認した。野生型マウスでは細胞融合の結果一つの細胞がシンシチオトロフォブラスト一層を形成しているのに対し、VASH2(-/-)マウスでは一部のシンシチオトロフォブラスト、SynT-IIにおいて細胞融合が障害されていた(Fig.7 下段)。

VASH2(-/-)マウスにおける胎盤形成に関与する遺伝子の変化

野生型マウスと VASH2(-/-)マウスの胎盤を用いた real-time PCR は、Gcm1 の発現

は 2 群にあきらかな差がなかったが、VASH2(-/-)マウスの SynB の発現は野生型マウスに比し胎生 16.5 日目から低下傾向を示し、胎生 18.5 日目では有意に低かった ($P=0.01$) (Fig. 9 D-E)。

BeWo 細胞で VASH2 が細胞融合に与える影響

BeWo 細胞はトロフォブラスト由来のヒト絨毛癌細胞株で、フォルスコリン添加により細胞融合が誘導されていることが報告されている^{30,31,33,34}。まず、BeWo 細胞で VASH2 の mRNA の発現が確認できた(Fig. 8C)。次に Matsuura らがしめしている Fusion index をもちいて細胞融合を評価すると、BeWo 細胞にフォルスコリンを添加し培養すると、細胞融合があきらかに促進された(Fusion index:添加なし群; $19.3 \pm 6.8\%$ 、フォルスコリン添加群; $56.6 \pm 14.5\%$ 、 $p < 0.001$)(Fig. 8A,B)³⁰。また siRNA を導入し内在性の VASH2 をノックダウンさせると、フォルスコリンによる細胞融合の誘導があきらかに障害された(Fusion index : siControl+フォルスコリン群: $63.6 \pm 14.6\%$ 、siVASH2+フォルスコリン群; $38.0 \pm 18.5\%$ 、 $p < 0.001$)(Fig. 8A,B)。

BeWo 細胞で VASH2 が細胞融合を誘導する遺伝子発現に与える影響

同様に siRNA を導入し VASH2 をノックダウン後フォルスコリンで細胞融合を誘導した BeWo 細胞から RNA を抽出し、Gcm1、Syncytin1、Syncytin2 について real-time PCR を施行したが、siControl+フォルスコリン群と siVASH2+フォルスコリン群で発

現に差はなかった (Fig.9A-C) 。また VASH2 はフォルスコリン添加により、発現が上昇した(Fig.8 C)。

6. 考察

今回ヒト胎盤における VASH1 および VASH2 の局在について検討したところ、従来の報告通り胎盤組織において VASH1 が血管内皮細胞に局在していることを確認した¹⁵⁾。一方 VASH2 は胎盤のトロフォブラストに局在していることが確認された。従来の報告同様、胎盤においても VASH2 は血管内皮細胞以外の部位に局在していた²⁴⁻²⁷⁾。また胎盤における VASH2 の発現部位を確認、報告したのは本研究が初めてである。

VASH1、VASH2 ともに胎盤で発現がみとめられたため、マウスを用いて胎盤におけるその働きを検討した。まず妊娠中の VASH1(-/-)マウスと VASH2(-/-)マウスの表現型について検討した。哺乳類の胎盤重量は胎児重量の発育に比し胎盤発育の大部分は妊娠前半でおこるといふ報告があるが、本研究でもこの報告同様、3 群とも胎生 18.5 日目の胎盤重量は胎生 16.5 日目にピークを示していた³⁴⁾。また妊娠中期までは 3 群間で胎盤重量に差はないが、胎生 18.5 日目に VASH2(-/-) マウスで野生型マウスに比し胎盤重量が有意に小さかった(野生型マウスに比し 13.9%減、 $P=0.0005$)。マウスは多胎であるため胎児数が胎盤重量に影響を与える可能性を考慮し検討したが、胎児数に差はなかった。以上より、VASH2 (-/-) マウスの胎盤は妊娠後期において胎盤発育が障害されている可能性が示唆された。

今回の検討で胎生 18.5 日目の胎盤発育に差があると考えられたため、同時期のラビリンス構造に着目した。今回の検討では、胎児血管面積が野生型マウスに比べ VASH1(-/-)マウスでは明らかに増加し、一方 VASH2(-/-)マウスでは明らかに減少する

ことがわかった。この結果は従来の報告同様 VASH1 の血管新生抑制作用、VASH2 の血管新生促進作用を反映しており、マウス胎盤においても VASH1、VASH2 の血管新生制御作用が働いていると考えられた¹⁴⁾。また血管作動性因子の検討では、血中の VEGF-A 濃度が VASH1(-/-)マウスでは胎生 12.5 日目に有意に低く、一方 VASH2(-/-)マウスでは胎生 18.5 日目に高値を示した。この変化は、血管新生抑制作用を有する VASH1 が存在しない VASH1(-/-)マウスでは、血管新生促進因子である VEGF が誘導されないため低値を示し、一方血管新生促進因子である VASH2 が存在しない VASH2(-/-)マウスでは、その働きを補うように血管新生因子 VEGF が増加する、というノックアウトマウス体内において VEGF による代償が生じている可能性が考えられた。そのため血管作動性因子であるバソヒビンがノックアウトされたマウスが胎生致死とならずに、またこれらの代償性変化により恒常性が保たれることで胎盤の形態学的変化を最小限に抑えられている可能性が考えられた。このように今回胎盤の血管形成過程においてバソヒビンファミリーが関与し、その働きは VEGF ファミリーが関係している可能性が示唆されたが、いまだその作用機序については不明である。今後その解明がのぞまれる。

ヒト、マウスの胎盤分化過程において、Gcm1 がその下流遺伝子である Syncytin を制御している系があることは前述したとおりである^{7, 8)}。この系の重要性および胎盤における細胞融合の重要性を示す報告として Syncytin のノックアウトマウスを用いた報告がある。たとえば SynA (-/-) マウスは SynT- I の形成不全により SynT- II と

の結合が異常となり胎生 11.5~13.5 日目で胎生致死となることが報告されている¹⁰⁾。

また、SynB(-/-)マウスでは SynT- II 層が細胞融合を起こさないため、母体腔の拡大、胎児数の減少、胎児発育不全がみとめられる⁹⁾。今回の検討で VASH2(-/-)マウスの胎盤構造では一部 SynT- II 層の融合障害がおこっており SynB(-/-)マウスと類似していた。

そこで real-time PCR で SynB の発現を検討したところ、野生型に比し VASH2(-/-)マウスの Gcm1 の発現は同程度であるのに対し SynB の発現が低下していることから、VASH2(-/-)マウスの胎盤構造の異常は SynB の発現低下に関係する可能性が推察された。同所見をより直接的に観察するために、In vitro で検討を行った。今回用いたヒト絨毛癌細胞株 BeWo 細胞は、トロフォブラストの融合の研究によく用いられるモデルである^{30,31,33,35,36)}。これらは自然に細胞融合をおこすがその融合率は低く、また cAMP を増加させると融合が促進され、フォルスコリンが cAMP/PKA シグナルを介して Gcm1、さらには Syncytin の発現調節を行い、細胞融合をひき起こすことが報告されている^{7,35-39)}。同様に JEG3 というヒト絨毛癌細胞株はフォルスコリンによる細胞融合がおこらず、JEG3 は Syncytin の発現が低いことから、フォルスコリンの細胞融合には Syncytin を要するという報告もある³³⁾。今回の検討では、従来の報告通り BeWo 細胞にフォルスコリンを添加することで細胞融合が促進された。また BeWo 細胞において mRNA レベルで VASH2 の発現を確認でき、内在性 VASH2 をノックダウンするとフォルスコリンによる細胞融合が低下した。これは動物モデルの実験において VASH2(-/-)マウスで細胞融合が障害されている可能性があったが、その結果と同様で

あり、VASH2 はトロフォブラストの細胞融合に関与している可能性が示された。一方この状態の BeWo 細胞から単離した RNA を用いた real-time PCR の結果は、Gcm1、Syncytin1、Syncytin2 の発現において VASH2 をノックダウンしてもその発現に差はなく in vivo の結果とは異なるものであった。以上より、VASH2 の発現低下により細胞融合阻害がおこる可能性が示唆された。しかし、その作用機序について従来いわれている Gcm1-Syncytin の系が関与するののかについては明らかにすることができなかった。その理由として、今回 VASH2 のノックダウンの程度が軽度であるため Syncytin1 または Syncytin2 の発現に大きな変動がみられなかった可能性もある。またヒトとマウスの Syncytin はその機能は類似するもののそもそも異なる蛋白であるため、種により細胞融合制御システムが異なる可能性も考えられる。今回の検討は BeWo 細胞のみを用いた結果であり、今後 VASH2 が細胞融合を障害する作用機序については他種の細胞株や primary なトロフォブラストを用いてさらなる検討が必要であると考えられる。

トロフォブラストの細胞融合が胎盤形成に重要であることは前述のとおりである。子宮内胎児発育不全、妊娠高血圧症候群、その亜系である HELLP 症候群患者から採取した胎盤のサイトトロフォブラストを用いた検討で、Syncytin1 のプロモーター領域のメチル化が亢進しその発現が抑制されている、という報告がある⁴⁰⁾。また同疾患群からえられたサイトトロフォブラストを用いた検討で、疾患群において細胞融合が障害され β -hCG の産生量の減少、Syncytin の発現低下がみとめられた、という報告もある⁴¹⁾。以上より細胞融合は正常妊娠を継続するうえで必要な過程であり、それ

が障害されると胎盤機能が障害されると考えられる。VASH2 の発現低下と細胞融合障害が関係するという今回の結果をふまえると、胎盤機能不全例では胎盤での VASH2 発現が低下している可能性が考えられる。一方今回用いた VASH2 ノックアウトマウスの検討では胎児発育が障害されない可能性がある(data not shown)。ヒトの胎盤機能不全例で細胞融合障害と臨床症状が相関をしめすという報告があることより、今回用いた VASH2(-/-)マウスのトロフォブラスト融合障害は部分的であったため胎児発育が障害されなかった可能性が考えられる⁴¹⁾。今後、VASH2 がどのように細胞融合を制御しているのか、その受容体やシグナル伝達機構を含めた作用機序の解明により、VASH2 が胎盤機能不全例の予測因子の一つとなりうるかもしれない。

7. 結論

今回初めて胎盤のトロフォブラストに **VASH2** が局在していることを発見した。さらに従来の報告同様、胎盤組織においても **VASH1** と **VASH2** は異なる部位で発現し、胎盤において **VASH1** は血管新生抑制因子として、**VASH2** は血管新生促進因子として機能していることを確認した。今回の検討より、胎盤形成において **VASH1** はオートクライン的に血管新生抑制に、**VASH2** はパラクライン的に血管新生促進およびシンシチオトロフォブラストの形成(促進)に関与している可能性がある。一方 **VASH2** の新たな機能として細胞融合に関与している可能性があり、今後その制御機構について検討していきたい。(Fig10)

8. 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行にあたり御指導と御鞭撻を賜りました、

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻 発生・発達医学講座 周産期医学分野

八重樫 伸生 教授に深く謝意を表します。

本研究遂行および本論文作成に際し、多大なる御指導、有益な御助言および御校閲を賜りました、東北大学加齢医学研究所 腫瘍循環研究分野 佐藤 靖史 教授に心より感謝いたします。

本研究遂行に際し有益な御助言、御指導を賜りました、東北メディカル・メガバンク機構 母児医科学分野 菅原 準一 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究遂行に際し懇親な御指導、および実験に御協力を頂きました、東京女子医科大学医学部 解剖学・発生生物学講座 江崎 太一 教授、北原 秀治 助教に心より感謝申し上げます。

9. 参考文献

- 1). 佐川 典正:胎盤形成と血管増殖. 産科と婦人科 67 卷 12 号, 株式会社 診断と治療社, 東京, 2000;1719-1726
- 2). Simmons DG, Natale DR, Begay V, et al. Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth. *Development* 2008 ;135:2083-91.
- 3). Enders AC, Carter AM. What can comparative studies of placental structure tell us?--A review. *Placenta* 2004 ;25 Suppl A:S3-9.
- 4). Dupressoir A, Lavalie C, Heidmann T. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* 2012 ;33:663-71
- 5). Elizabeth H.Chen, Eric N.Olson. Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 2005;308:369-373
- 6). Chenchou Yu, Koufeng Shen, Meiyao Lin, et al. GCMA Regulates the Syncytin-mediated trophoblast fusion. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;277 50062-50068
- 7). Yu C, Shen K, Lin M ,et al; GCMA regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J Biol Chem.* 2002, 20;277:50062-8.

- 8). A.J.G.Po'tgens¹, S.Drewlo, M.Kokozidou, et al. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. Human Reproduction Update 2004;10-6:487-496
- 9). Dupressoir A, Vernochet C, Harper F, et al. A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:E1164-73
- 10).Dupressoir A, Vernochet C, Bawa O, et al. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:12127-32
- 11).Arroyo JA, Winn VD. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. Semin Perinatol 2008 Jun;32(3):172-7.
- 12).Barut F, Barut A, Gun BD, et al. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. Diagn Pathol 2010;5:24.
- 13).佐藤 靖史、高倉 伸幸:血管新生研究の最先端.医薬ジャーナル社,大阪,2013;154-161
- 14).Sato Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation. J Biochem 2013;153:5-11
- 15).Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an

- endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest* 2004;114:898-907
- 16). Tamaki K, Moriya T, Sato Y, et al. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Sci* 2009;100:88-94
- 17). Tamaki K, Sasano H, Maruto Y, et al. Vasohibin-1 as a potential predictor of aggressive behavior of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Sci* 2010;101:1051-8.
- 18). Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, et al. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas. *Cancer Sci* 2011;102:446-51.
- 19). Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, et al. Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Sci* 2008;99:914-9.
- 20). Hosaka T, Kimura H, Heishi T, et al. Vasohibin-1 expression in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis. *Am J Pathol* 2009;175:430-9.
- 21). Wakusawa R, Abe T, Sato H, et al. Expression of vasohibin, an antiangiogenic factor, in human choroidal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* 2008;146:235-243
- 22). Wakusawa R, Abe T, Sato H, et al: Suppression of choroidal

- neovascularization by vasohibin-1, a vascular endothelium-derived angiogenic inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3272-80
- 23). Samaneh Yazdani, Yasuhiro Miki, Kentaro Tamaki, et al. Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. *Human Pathology* 2013;44:1586-1986
- 24). Shibuya T, Watanabe K, Yamashita H, et al. Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1051-7
- 25). Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, et al. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* 2009;113:4810-8
- 26). Takahashi Y, Koyanagi T, Suzuki Y, et al: Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2012;10:1135-46
- 27). Xue X, Gao W, Sun B, et al. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2013; 32:1724-34
- 28). Suzuki Y., Kobayashi M., Miyashita H. et al: Isolation of a small

- vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. *J Cell Sci* 2010;123:3094-101
- 29).Kitahara S, Morikawa S, Shimizu K ,et al: Alteration of angiogenic patterns on B16BL6 melanoma development promoted in Matrigel. *Med Mol Morphol* 2010;43(1):26-36
- 30).Matsuura K, Jigami T., Taniue K, et al:Identification of a link between Wnt/ β -catenin signaling and the cell fusion pathway. *Nature communications* 2011;2:548doi:10:1038/ncomms1551
- 31).Yoshie M., Kaneyama K, Kusama K, et al:Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP(Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells. *Human Reproduction*. 2010;25:2229-2238
- 32).目時弘仁, 八重樫伸生, 今井潤 : 家庭血圧測定とその有用性. *産婦人科治療* , 102(1),永井書店, 大阪, 2011; 82-87
- 33).Mi S, Lee X, Li X et al; Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000 , 17 ; 403 (6771) : 785-9.
- 34).Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, et al: Animal models of placental angiogenesis. *Placenta*. 2005;26:689-708

- 35).Lyden TW, Ng AK, Rote NS ; Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment. *Placenta*. 1993 ;14(2):177-86.
- 36).Kristina Orendi, Martin Gauster, Berthold Huppertz, et al; The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* 2010;140:759-766
- 37).Frendo JL, Olivier D, Cheynet V ,et al;Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol*. 2003 ;23:3566-74.
- 38).Chen CP, Chen LF, Yang SR,et al;Functional characterization of the human placental fusogenic membrane protein syncytin 2. *Biol Reprod*. 2008 ;79:815-23
- 39).Muroi Y, Sakurai T, Imakawa K, et al;CD9 regulates transcription factor GCM1 and ERVWE1 expression through the cAMP/protein kinase A signaling pathway.*Reproduction* 2009;138:945-951
- 40).Ruebner M, Strissel PL, Ekici AB, et al. Reduced syncytin1 expression levels in placental syndromes correlates with epigenetic hypermethylation of the ERVW-1 promotor region. *PLoSOne*. 2013;8
- 41).Manuela Langbein, Reiner Strick, Pamela L.Strissel, et al. Impaired

cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Molecular reproduction and development*. 2008;75:175-183



絨毛間腔
(母体血)

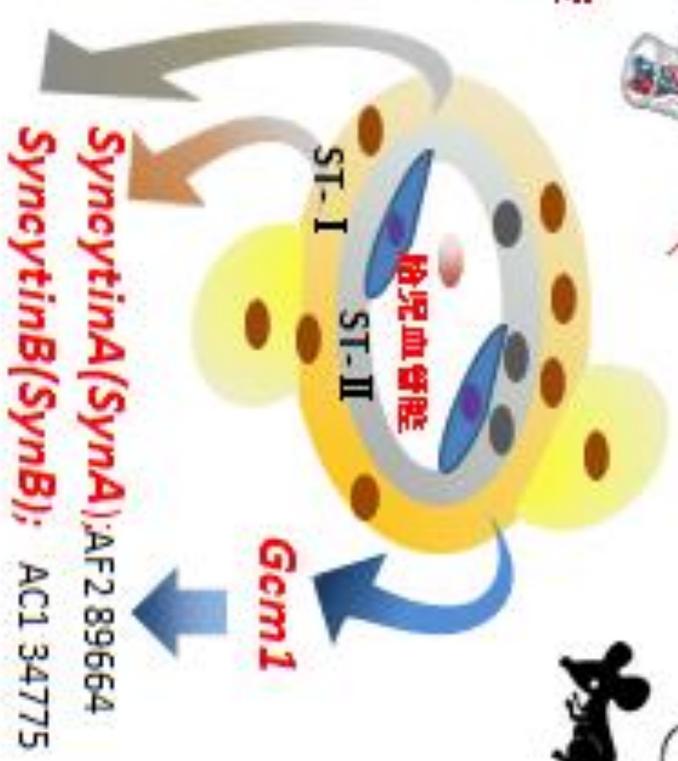
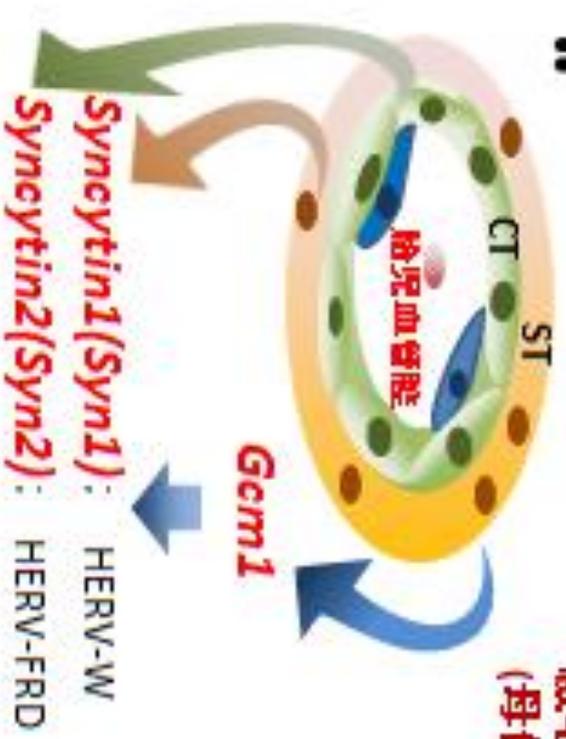
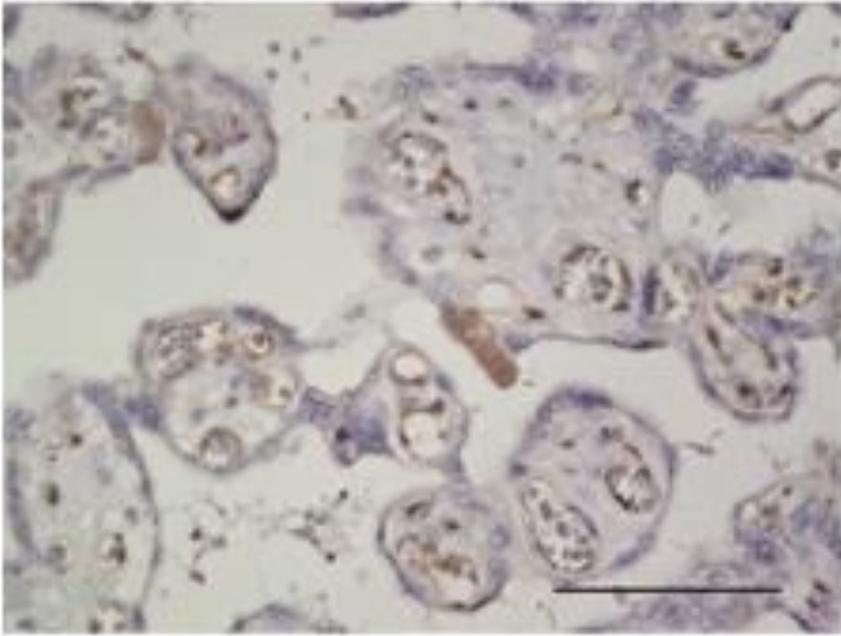


Figure 1 ✕ *Gcm1*; Glial cell missing-1

A



B

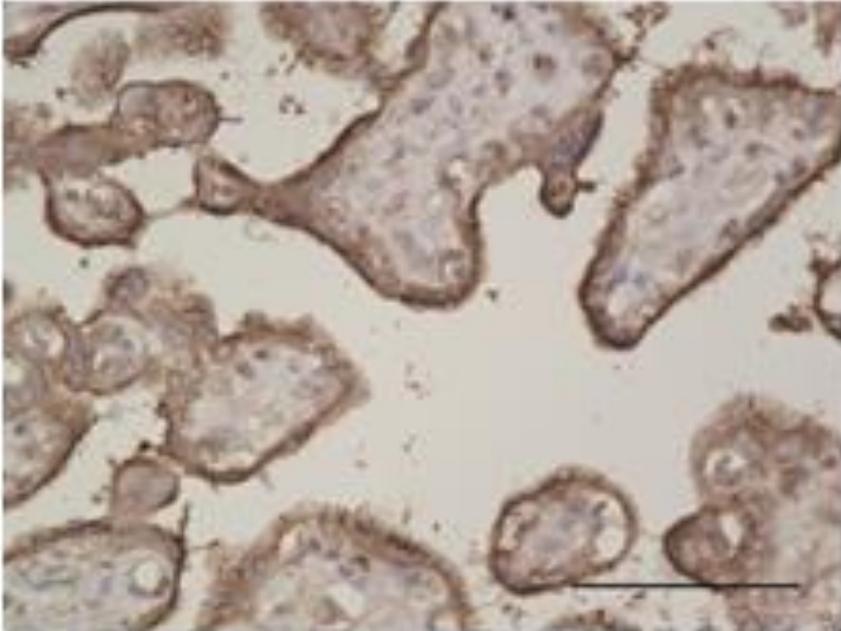


Figure 2

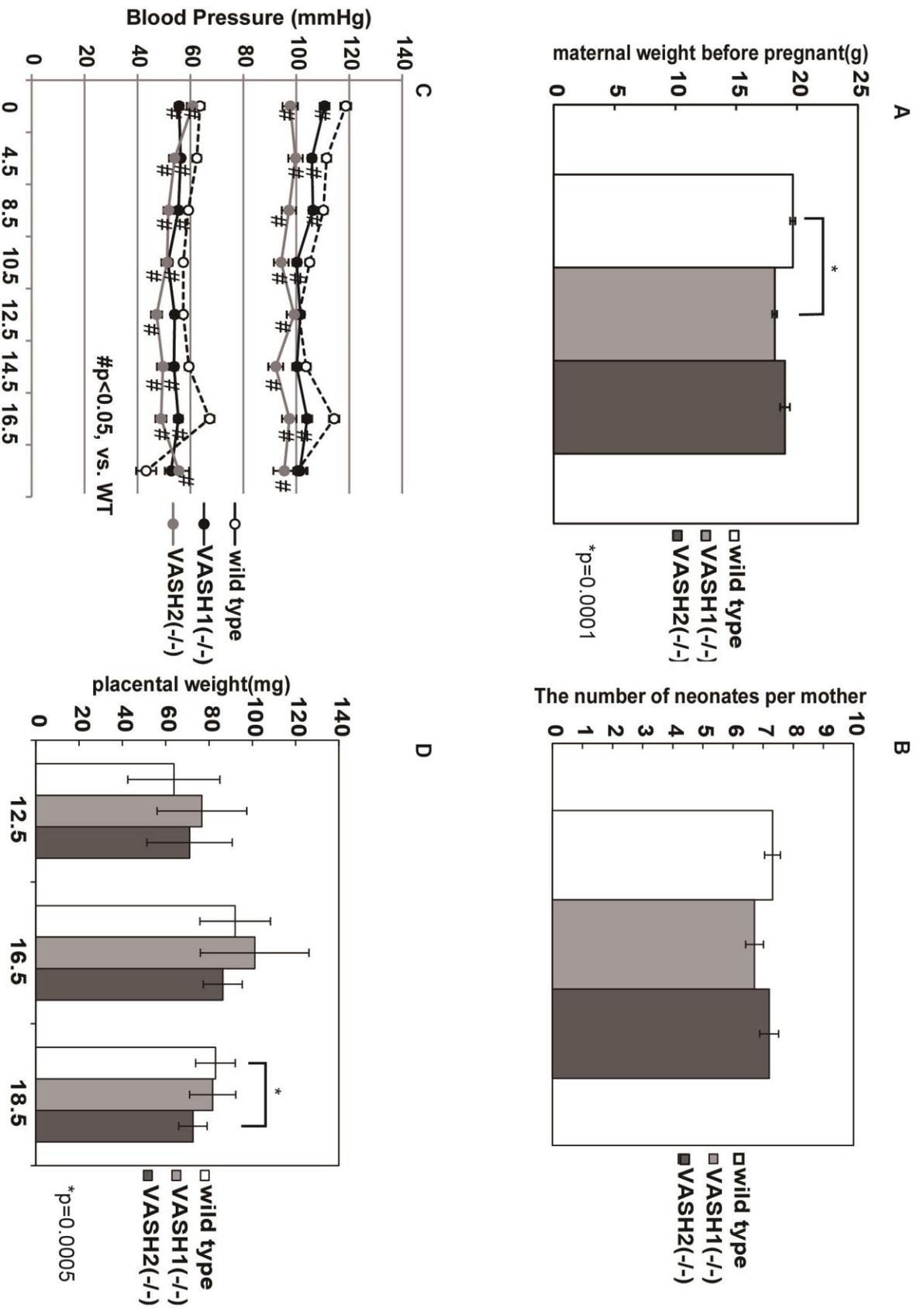


Figure 3

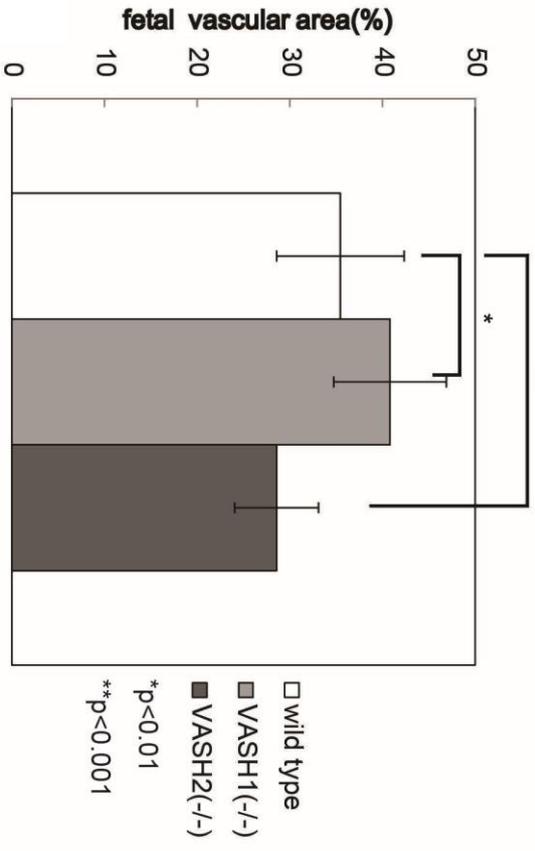
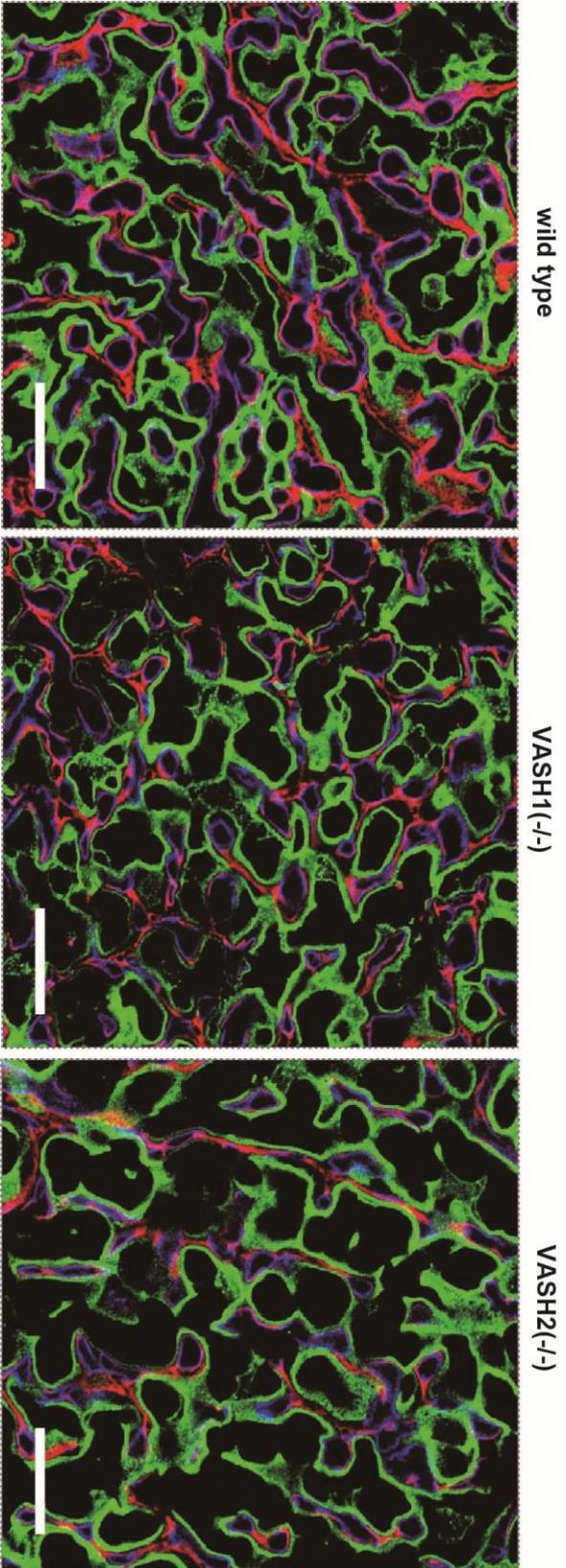


Figure 4

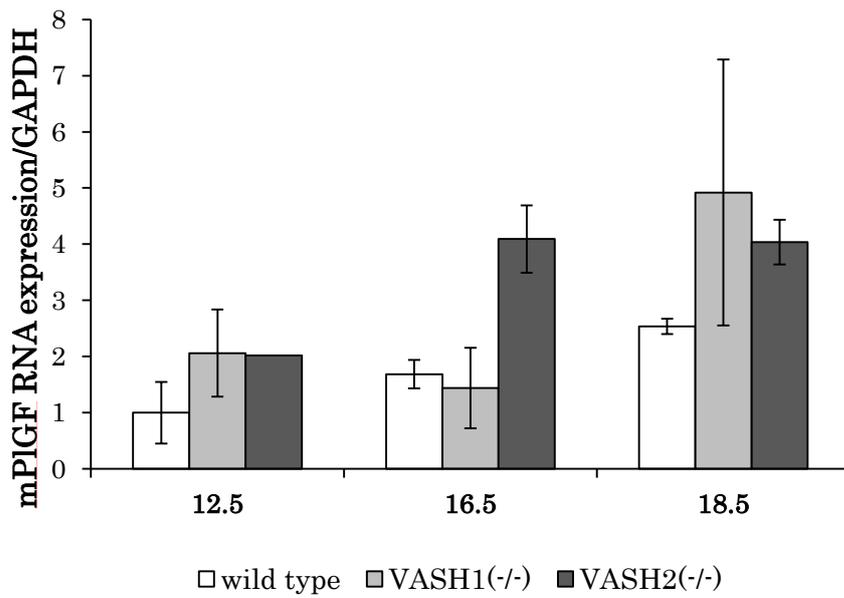
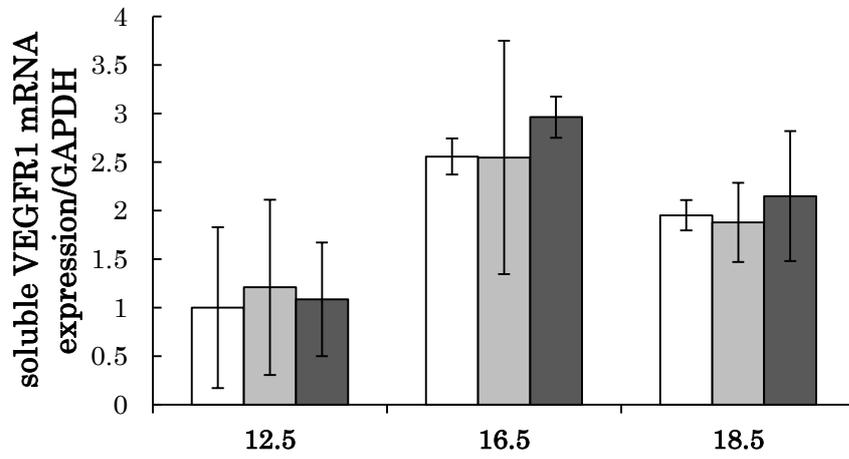
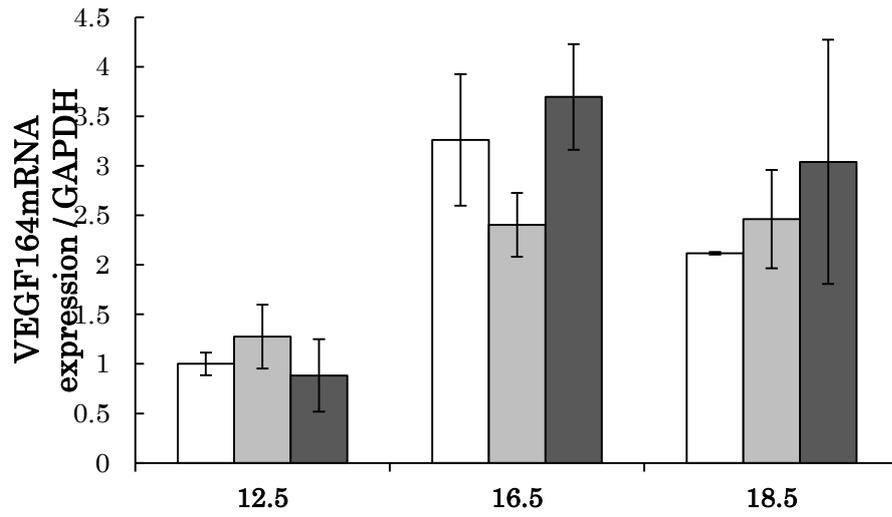


Figure 5

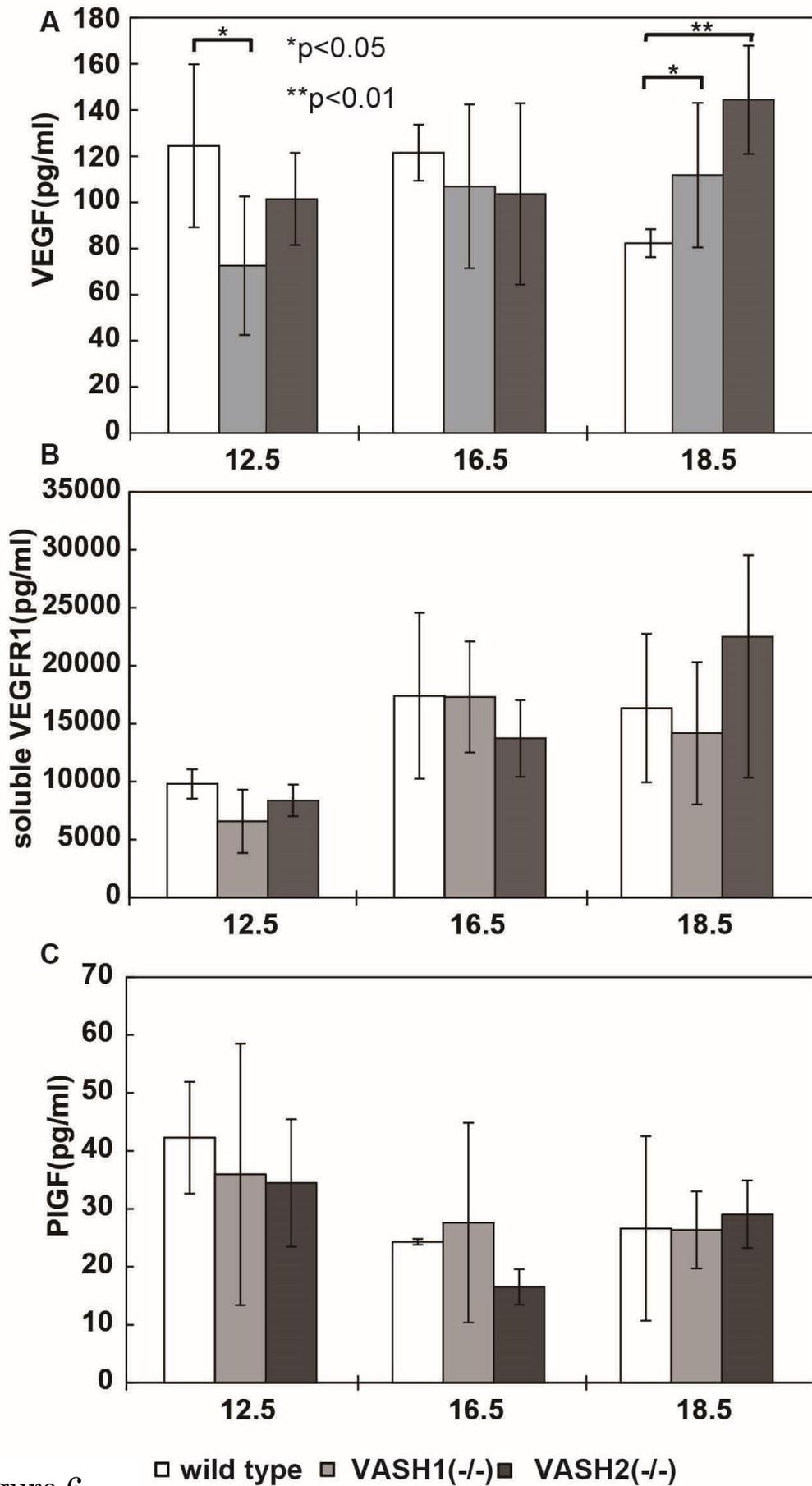
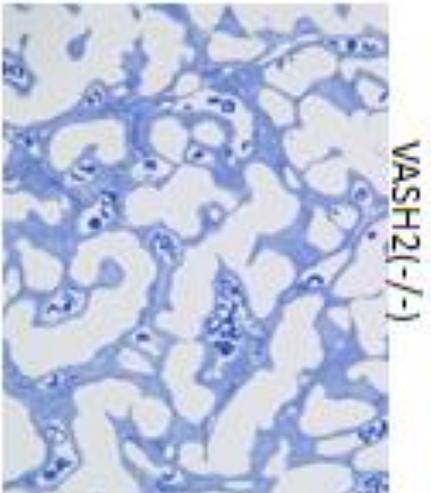
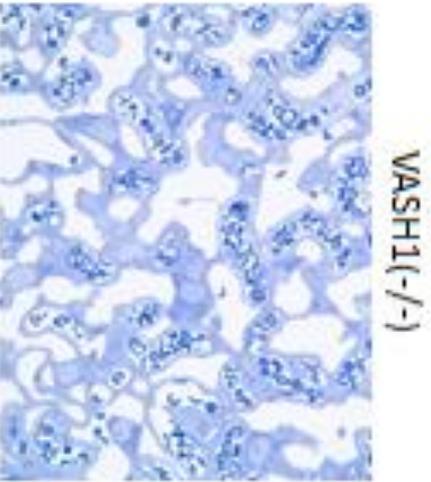
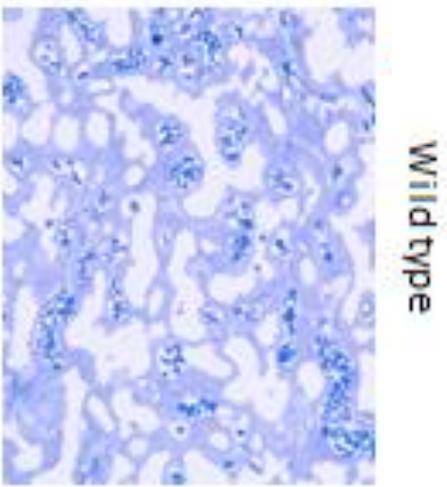


Figure 6



wild type

VASH2(-/-)

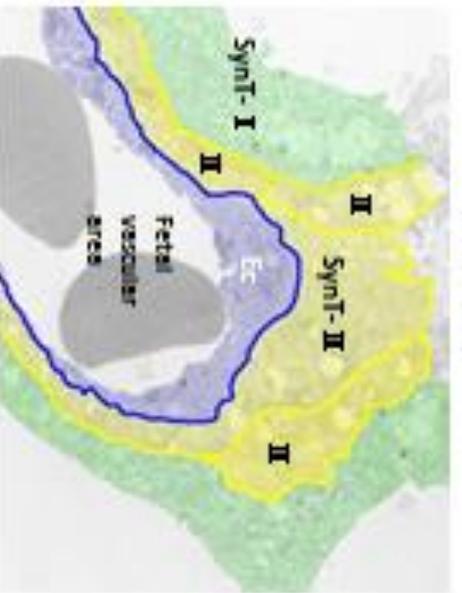
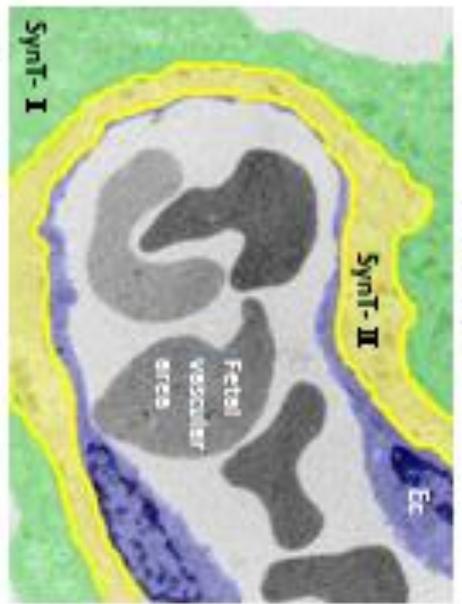


Figure 7

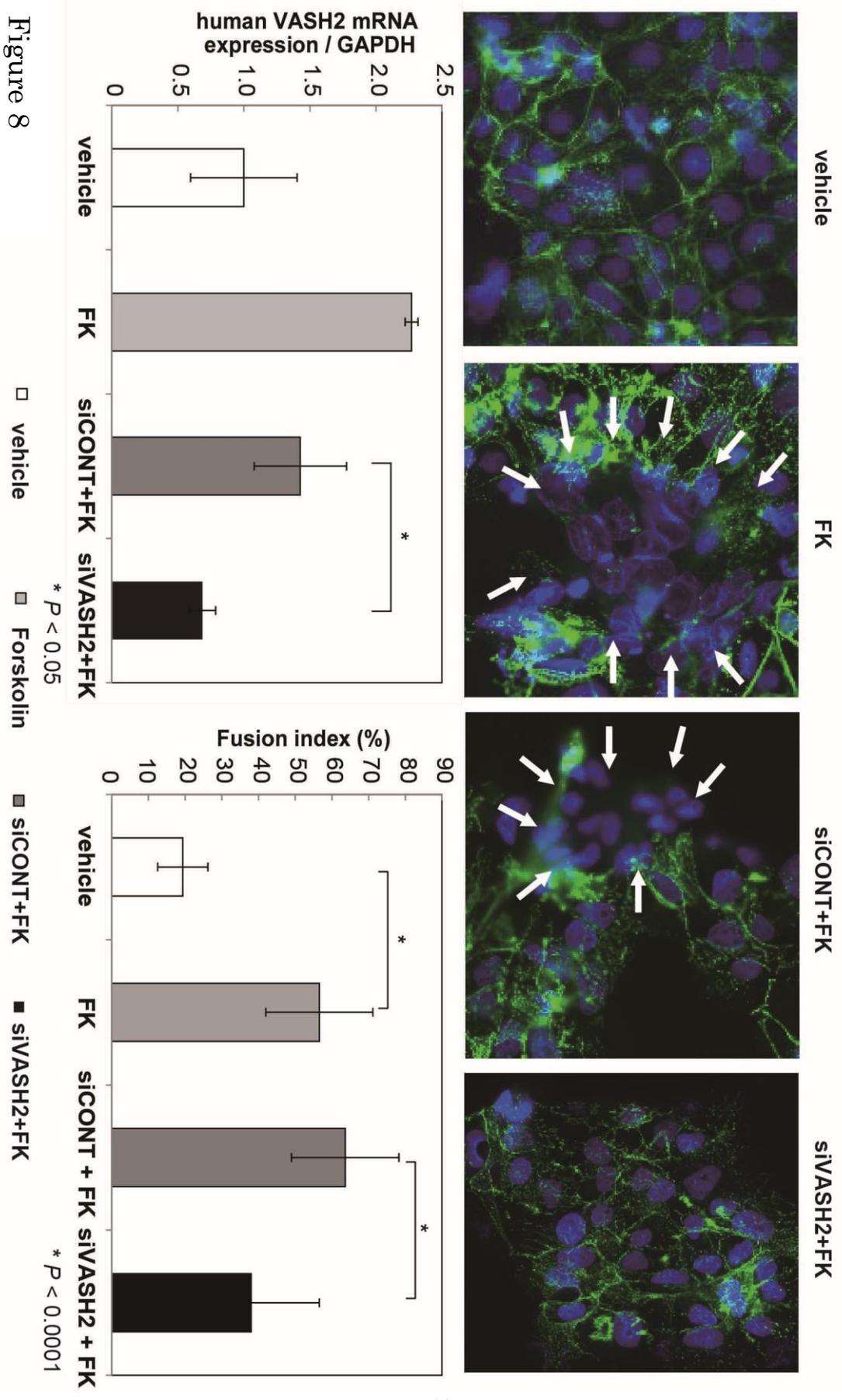


Figure 8

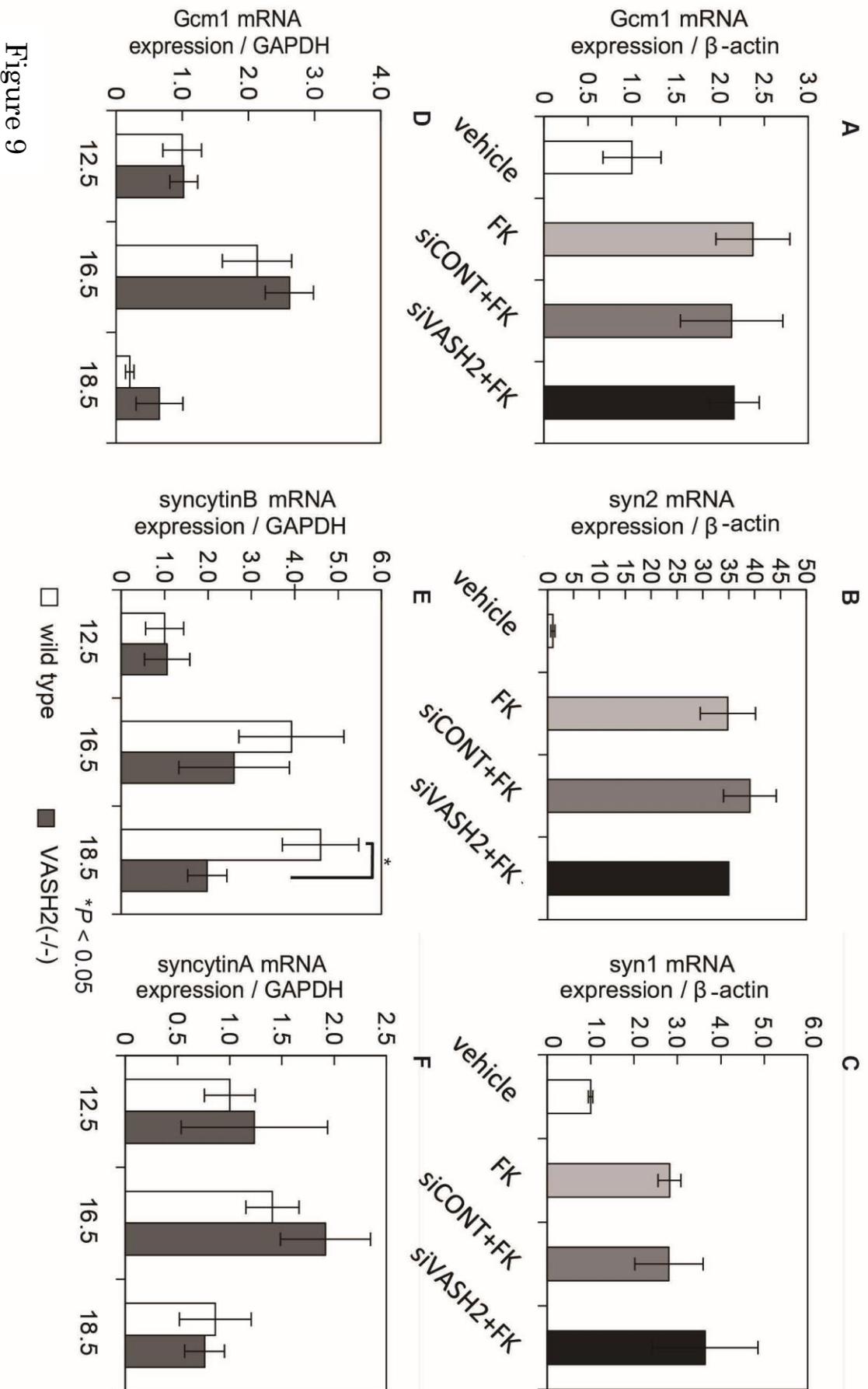


Figure 9

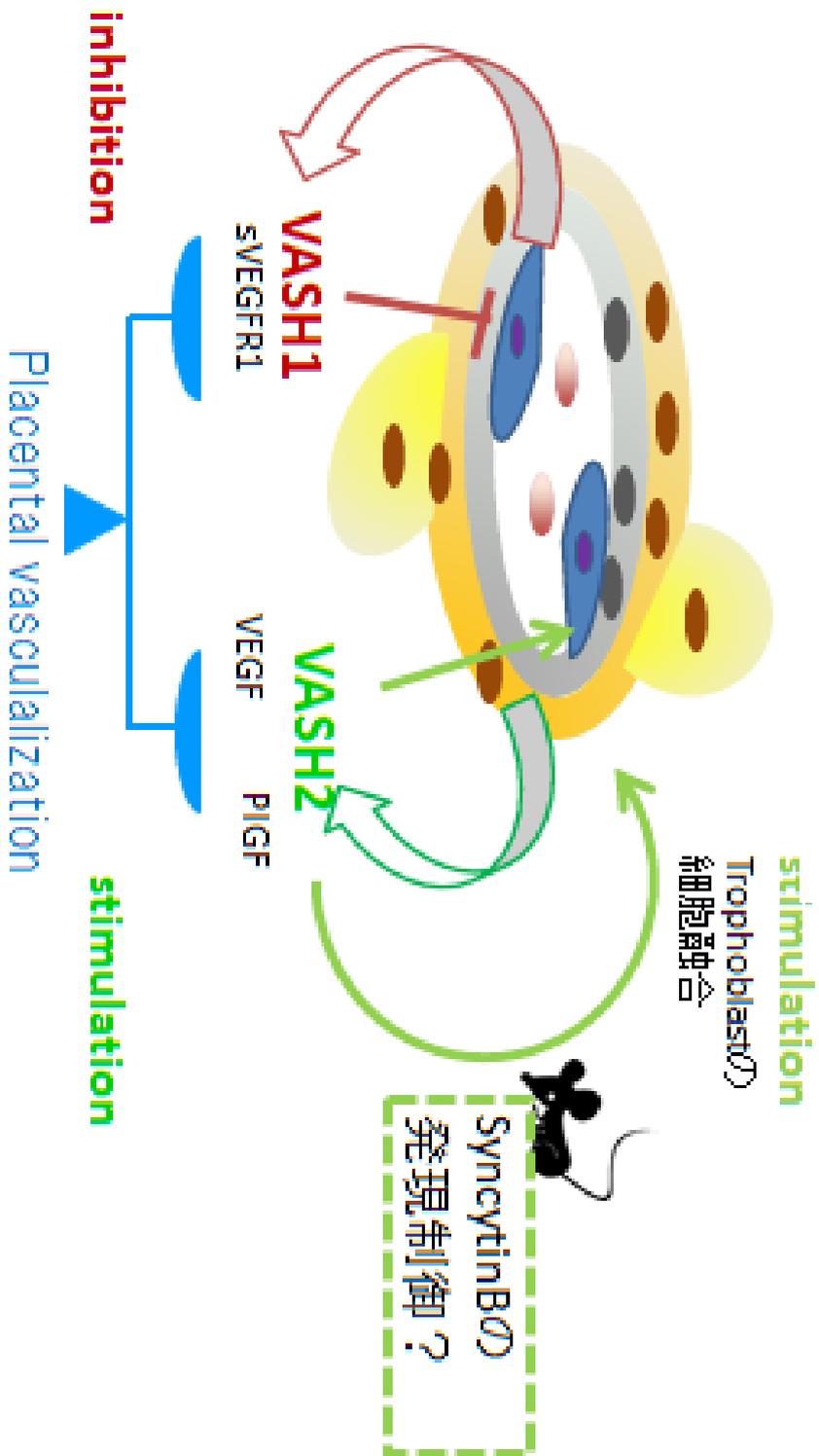


Figure 10

11. 図説

Fig1. ヒトの絨毛部とマウスのラビリンスの相違について(模式図)。

ヒトの絨毛部では胎児血管内皮細胞層、サイトトロフォブラスト層、シンシチオトロフォブラスト層が形成され、この3層を介して母体血と胎児血が接している。一方マウスはこの絨毛部がラビリンスとよばれ、三層のトロフォブラスト細胞層[母体側にモノヌクレアトロフォブラスト層(mononucleartrophoblast layer ; 単核合胞体層)、その外側(胎児側)に2層のシンシチオトロフォブラスト層 (syncytiotrophoblast layer ; 栄養膜合胞体層。母体側から SynT- I 層、SynT- II 層が存在)]および胎児血管内皮細胞を介して母体血と胎児血が接する構造である。このシンシチオトロフォブラストはトロフォブラストが細胞融合した結果形成された多核の細胞である。

このトロフォブラストの細胞融合に必要な蛋白のひとつに Syncytin[マウスでは SyncytinA (SynA) 、SyncytinB (SynB) 、ヒトでは HERV-W の Syncytin1 と HERV-FRD の Syncytin2]があり、Glial cell missing1(Gcm1)という転写因子に誘導されることがわかっている。

Fig. 2 ; ヒト胎盤組織における免疫組織学的染色。A は VASH1 を、B は VASH2 を染色した。400 倍で撮影。Scale bar=100 μ m

Fig. 3 ; 野生型、VASH1(-/-)、VASH2(-/-)の表現型

A:母体体重。WT (N=30), VASH1(-/-) (N=45),VASH2(-/-) (N=20)

B:母体一腹あたりの胎児数。WT (N=32), VASH1(-/-) (N=45), VASH2(-/-) (N=20)

C:妊娠中の血圧の推移 (妊娠前, 胎生 4.5, 8.5,10.5, 12.5, 14.5, 16.5, 18.5 日目に測定)

WT (N=16), VASH1(-/-) (N=15),VASH2(-/-) (N=7)

D:胎盤重量。WT (N=37), VASH1(-/-) (N=37),VASH2(-/-) (N=19)

Fig4. (上段) 胎生 18.5 日目の胎盤の免疫染色。写真は 630 倍で撮影。Scale bar=50 μ m。

左側から野生型、VASH1(-/-)、VASH2(-/-)。緑色が Lectin で母体血管腔を示す。また、青が CD31 で血管内皮細胞を、赤が typeIVcollagen で基底膜を染色し、青で囲まれた面積が胎児血管腔である。

(下段) 胎児血管腔を定量。400 倍視野で、3~5 サンプルを使用。1 サンプルあたり 10 か所をランダムに撮影、胎児血管腔をキーエンス付属のソフトウェアを用いて解析。

Fig. 5 胎盤の VEGF164, sVEGFR1, PlGF の発現について検討した real-timePCR。

GAPDH を internal control として $\Delta\Delta$ Ct 法で算出。野生型胎生 12.5 の発現を 1 とした。

胎生 12.5、16.5、18.5 日目で検討し、野生型 N=3/10/2、VASH1(-/-)N=4/3/5、

VASH2(-/-)N=3/3/2

Fig. 6 VEGF, sVEGFR1, PlGF の血中濃度

A:VEGF-A の血中濃度を胎生 12.5、16.5、18.5 日目に測定。野生型 N=6/3/4、

VASH1(-/-)N=7/10/22、VASH2(-/-)N=4/4/8

B:sVEGFR1 の血中濃度を胎生 12.5、16.5、18.5 日目に測定。野生型 N=5/4/5、

VASH1(-/-)N=6/8/17、VASH2(-/-)N=4/4/5

C:PlGF の血中濃度を胎生 12.5、16.5、18.5 日目に測定。野生型 N=4/2/2、

VASH1(-/-)N=5/5/5、VASH2(-/-)N=3/3/4

Fig. 7 (上段) 胎生 18.5 日目のラビリンスの semi-thin 切片。720 倍で撮影。Scale

bar=20 μ m

(下段) 胎生 18.5 日目のラビリンスの電子顕微鏡画像。野生型 (左側) が SynT-2 層が融合した一つの細胞で形成されているのに対し、VASH2(-/-)(右側)では SynT-2 層が複数の細胞から形成され、細胞融合が障害されている。Scale bar=5 μ m

Fig. 8

(上段) Fusion assay の免疫染色の写真。左側から、添加なし群、フォルスコリン添加群、siControl+フォルスコリン添加群、siVASH2+フォルスコリン添加群。フォルスコリン添加により、細胞融合がおこり、siVASH2 では融合が障害されている。

(下段) 左側は Fusion index. 1 サンプルあたり 10 視野を 400 倍で撮影、1 視野あたり

の syncytia の細胞数、核数を測定し (Adobe Potoshop CS6 使用)、Fusion index を算出。

右側は上段各群の VASH2 の mRNA の発現。

Fig. 9 マウス胎盤や BeWo 細胞における Gcm1、ENV 蛋白の発現

A-C; BeWo 細胞における Gcm1, syn1, syn2 の発現。β-actin を internal control とし、ΔΔCt 法で検討した。BeWo 細胞の添加なし群の発現を 1 とした。N=3 を duplicate で検討。

D-F; 野生型と VASH2(-/-)の胎盤における Gcm-1、SynB、SynA の発現。胎生 12.5、16.5、18.5 日目に検討した。野生型 N=7/6/5、VASH2(-/-)N=5/7/6。

Fig.10 胎盤におけるバソヒビンファミリーの役割(模式図)

VASH1 は従来の報告同様血管内皮細胞に、VASH2 はトロフォブラストに局在していた。さらに従来の報告同様、胎盤組織においても VASH1 と VASH2 は異なる部位で発現し、胎盤形成において VASH1 はオートクライン的に血管新生抑制に、VASH2 はパラクライン的に血管新生促進およびシンシチオトロフォブラストの形成(促進)に関与している可能性が考えられた。