HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Switching of integrins under hypoxic stress in early placenta and Be Wo cells

メタデータ	言語: Japanese
	出版者: 浜松医科大学
	公開日: 2014-10-30
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 岩城, 孝行
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1187

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第　３３４号	学位授与年月日	平成１３年　３月２７日
氏　　名	岩 城 孝 行		
論文題目	Switching of integrins under hypoxic stress in early placenta and BeWo cells (妊娠初期胎盤と BeWo 細胞の低酸素ストレスによるインテグリンの変換)		

博士(医学)　岩 城 孝 行

論 文 題 目

Switching of integrins under hypoxic stress in early placenta and BeWo cells
(妊娠初期胎盤とBeWo細胞の低酸素ストレスによるインテグリンの変換)

論 文 の 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

胎盤の栄養膜細胞の増殖、浸潤の異常が妊娠中毒症の発症に深く関連することが明らかになってきた。妊娠中毒症の胎盤から分離された栄養膜細胞は正常妊娠のものに比べて、分裂能力が高いことが知られている。また、正常妊娠の栄養膜細胞は子宮の母体血管に浸潤し母体血管の構築を行なうが、妊娠中毒症の栄養膜細胞はそのような現象は見られない。このように、妊娠中毒症では、栄養膜細胞の浸潤、増殖の異常が報告されているが、その機序については不明であった。最近、低酸素下では栄養膜細胞の細胞分裂が増加することが見出された。一方、栄養膜細胞の浸潤においてはインテグリンファミリーが重要な働きをしていることが報告されている。そこで、我々は低酸素ストレスがインテグリンの発現異常を惹起し、栄養膜細胞の浸潤異常を引き起こすという仮説を立て、低酸素ストレスと絨毛組織のインテグリンの発現について検討した。

〔材料〕

1. 細胞外基質の接着蛋白質として、フィブロネクチン、フィブロネクチンのvariantとして、細胞性フィブロネクチンに特異的なextra domain A(フィブロネクチンEDA)、extra domain B(フィブロネクチンEDB)を、そのレセプターとしてインテグリンα1、インテグリンα5、インテグリンβ1のPCRプライマーを設定した。
2. 妊娠8週から12週で、同意を得られた人工妊娠中絶例(n=5)より得られた絨毛組織を用いた。
3. 絨毛癌細胞株であるBeWo細胞を使用した。

〔方法〕

1. 妊娠初期の子宮内膜における酸素分圧は約40mmHgと報告されている。培養時の低酸素分圧の条件として2%O_2/93%N_2/5%CO_2にて気体濃度を設定した。2%O_2は14mmHgの酸素分圧に相当する。正常酸素分圧の条件として95%Air/5%CO_2にて気体濃度を設定した。20%O_2は98mmHgの酸素分圧に相当する。
2. 定量RT-PCR用のコントロールRNAを作成するために、2つのコントロールプラスミドを構築した。具体的には、細胞外基質の接着蛋白質のための競合体及びインテグリンのための競合体を作成した。採取した絨毛組織約1μg及びBeWo細胞1.0x10^6をRPMI 1640培地3mlを加えて、正常酸素分圧下及び低酸素分圧下にて12時間培養した。培養後1、3、8、12時間経過した時点で組織を回収し、RNA-Stat 60システムにて全RNAを採取した。得られた全RNAはOD_{260}にて濃度を測定した。
3. 組織又は細胞中の全RNAを1遺伝子につき1μg使用し、42℃で30分間逆転写反応を行った。細胞外基質の接着蛋白質としてフィブロネクチン、フィブロネクチンEDA、フィブロネクチンEDB及び、そのレセプターとしてインテグリンα1、インテグリンα5、インテグリンβ1をリアルタイムPCR機のABI prism 7700を用いて定量した。

4. BeWo細胞の接着能を正常酸素分圧、低酸素分圧の条件にて無血清の状態で培養し培養後に測定した。測定法は培養開始時に播種した細胞数と24時間に残存した細胞数を除することで測定した。
5. BeWo細胞を正常酸素分圧、低酸素分圧の条件にて10%のFCS存在下にて72時間培養し細胞数を測定し増殖能を測定した。
6. BeWo細胞を正常酸素分圧、低酸素分圧の条件にて24時間培養後、インテグリンα1、インテグリンα5、インテグリンβ1の発現をフローサイトメトリーにて測定した。一次抗体には抗ヒトインテグリンα1、インテグリンα5、インテグリンβ1を用いた。二次抗体にはFITC標識抗マウスIgG抗体を用いた。

〔結果〕

1. 妊娠初期の絨毛組織では、低酸素群でフィブロネクチン、フィブロネクチンEDA、フィブロネクチンEDBのmRNAの発現量が増加した($p<0.05$)。インテグリンについては、インテグリンα1のmRNAの発現量は正常群で増加し($p<0.05$)、低酸素群では変化しなかった。逆に、インテグリンα5については正常群では軽度に増加したのみであるが、低酸素群においては有意に増加した($p<0.05$)。インテグリンβ1については両群間に差を認めなかった。
2. BeWo細胞の接着能は低酸素群で正常群に比べて有意に高かった($p<0.05$)が、増殖能については有意差を認めなかった。
3. BeWo細胞のフローサイトメトリーにおけるインテグリンα1、インテグリンα5、インテグリンβ1の発現の結果は正常群に対して低酸素群では、インテグリンα1の蛍光強度が小さく、インテグリンα5の蛍光強度が大きくなった($p<0.05$)。また、インテグリンβ1については両群間に差を認めなかった。mRNAの定量においては組織の結果と同様インテグリンα1が増加し($p<0.05$)、インテグリンα5が低下した($p<0.05$)。

〔考察ならびに結論〕

インテグリンα5の発現は絨毛組織及びBeWo細胞とも、正常酸素分圧下では軽度亢進したが、低酸素分圧下では有意に亢進した。そのリガンドであるフィブロネクチンの発現は正常酸素分圧下では軽度亢進したのみであるが、低酸素分圧下では有意に亢進した。インテグリンα1の発現は絨毛組織及びBeWo細胞とも、正常酸素分圧下で有意に亢進し、低酸素分圧下では有意な変化がなかった。このことは、低酸素分圧下ではインテグリンα5の発現が増加するのに伴って接着物質であるフィブロネクチンが増加し、接着が亢進したことを示している。一方、浸潤する絨毛細胞に特徴的なインテグリンα1が正常酸素分圧下に比較して低酸素分圧下では相対的に減少していたことは、低酸素分圧下では絨毛細胞の浸潤が抑制されていることが予想された。

実際に妊娠中毒症では脱落膜直下の浅い層に存在するフィブリノイド層が肥厚していることが知られているが、このような低酸素分圧下におけるインテグリンの変化が妊娠中毒症にみられる絨毛細胞の浸潤異常に関連することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

妊娠中毒症の発症に絨毛細胞の増殖、浸潤の異常が関連していることが明らかになってきている。妊

娠中毒症の胎盤から得られた絨毛細胞は正常妊娠のものに比べて、細胞分裂能が高いことが示されている。また、正常妊娠の絨毛細胞は子宮の母体血管に浸潤し母体血管の構築を行うのに対し、妊娠中毒症の絨毛細胞は構築に異常が認められる。一方、最近、低酸素下では絨毛細胞の細胞分裂が増加することが報告された。また、細胞の浸潤においてインテグリンファミリーが重要な働きをしていることも報告されている。本論文では、絨毛細胞の浸潤と増殖に関わるインテグリンの発現が低酸素条件下でどのように変化するかを正常初期胎盤および培養細胞を用いて検討している。

絨毛の栄養膜細胞層は子宮内に浸潤するにつれ、その表面に存在するインテグリンを変化させる。例えば、フィブリノイド層にある栄養膜細胞はフィブロネクチンの受容体であるα5β1が発現し、脱落膜近くの栄養膜細胞はコラーゲンの受容体であるα1β1が発現する。そこで、インテグリンのα1，α5，β1および栄養膜細胞が産生する基質のフィブロネクチンとそのスプライシングイソフォームの発現量を正常酸素分圧下と低酸素分圧下で定量して、比較した。サンプルとしては、8～12週の妊娠初期胎盤より絨毛を取り出し、無血清培地中で正常酸素分圧および低酸素分圧下で培養した後、絨毛よりRNAを抽出して測定検体とした。一方、標準RNAには各インテグリンやフィブロネクチンおよびイソフォームの配列を直列に連結したものをプラスミッドDNAにサブクローニングしたものからインビトロ転写系を用いて作製したRNAを希釈したものを用いている。検体RNAと標準RNAから、まず逆転写酵素によりcDNAをつくりそれに対して、各プライマーセットを用いて、目的のPCRをABI7700で行い、目的のmRNAの定量を行った。

その結果、絨毛を低酸素分圧下で培養すると、インテグリンβ1では正常酸素分圧下に培養したものと差を認めなかったが、インテグリンα5が正常酸素分圧下で培養したものより有意に増加した。また、インテグリンα1は正常酸素分圧下の培養では増加するが、低酸素分圧下の培養では増加が認められないという結果を得た。

続いて、絨毛では検討しにくい細胞の接着能、増殖能を栄養膜細胞由来の培養細胞BeWoを用いて、低酸素分圧下で検討した。はがしたBeWo細胞を無血清培地中で一方は正常酸素分圧で、一方は低酸素分圧で1日培養してシャーレ面に付着した細胞を計測して接着能の指標としているが、低酸素分圧下で培養した方が接着細胞数が有意に多く、低酸素分圧下では細胞接着能が亢進していることが明らかになった。細胞増殖能に対しては低酸素は影響がなかった。

さらに、BeWo細胞における低酸素分圧のインテグリン蛋白量に対する影響をフローサイトメーター分析して、低酸素分圧下で培養すると細胞表面のインテグリンα5蛋白が増加し、インテグリンα1蛋白は減少し、インテグリンβ1蛋白は変化しないという結果を得ている。

培養細胞で低酸素下で培養したときの各インテグリン蛋白の変動は胎盤絨毛でのmRNAの変動と一致しており、得られた結果が信頼できることを意味している。また、細胞接着能が亢進していることが示されており、これは今回測定したインテグリンの変動が一つのメカニズムではないかということを示唆していると考えられる。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

1) 妊娠何週の胎盤を用い、それは材料として適切かどうか。
2) 培養に用いた絨毛はどのような細胞を含んでいるか。
3) 標準RNAの作製法について。
4) 低酸素分圧下で細胞の状態はどうなっているのか。

5) 細胞接着能の測定法は適切か。
6) mRNAの定量的PCRの原理は何か。
7) コントロールRNAとして何を用いたか。
8) 他のインテグリンや他のフィブロネクチンイソフォームの結果はどうだったか。
9) BeWo細胞はどのような性状をもつ細胞なのか。
10) 栄養膜細胞はどのような機能を営んでいるのか。

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　三 浦 直 行
副査　筒 井 祥 博　副査　鈴 木 一 也