



## Fibrin-mediated growth restriction of early-stage human trophoblasts is switched to growth promotion through fibrinolysis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2022-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 浅野, 有希子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/00004103">http://hdl.handle.net/10271/00004103</a>

博士（医学） 浅野 有希子

論文題目

Fibrin-mediated growth restriction of early-stage human trophoblasts is switched to growth promotion through fibrinolysis

（フィブリンを介した初期ヒト栄養膜の成長制限は、線溶活性化により成長促進に切り替えられる）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

哺乳動物の胚着床は、胚盤胞と子宮内膜上皮の付着に始まり、胚盤胞の栄養外胚葉は栄養膜に分化しながら段階的に胎盤を形成する。胎盤構造のひとつであるフィブリノイド層は、母体のフィブリノゲン欠乏が初期流産に至ることから妊娠維持に必須とされている。また、フィブリンは線維芽細胞など特定の細胞の増殖を促進することが知られている。ヒト生殖補助医療において、着床効果を高める目的でフィブリン含有の胚移植培養液が利用されたが、初期の胚着床に対するフィブリンの効果は殆ど知られていない。しかし、妊娠維持に対するフィブリンの重要性から、着床期の栄養膜にも影響する可能性がある。

ヒト胚の研究では倫理的に制限されるため、これまでマウスモデルが多く利用され、得られた所見がヒトにしばしば外挿されてきた。しかし、マウス所見への過度な信頼はヒトのメカニズムに対して誤った理解を生じさせる可能性がある。

そこで、本研究は、フィブリンが着床期のヒト胚盤胞の付着とその後の栄養膜増殖に対して促進的に作用する可能性を想定し、フィブリンと胚盤胞を共培養することでそれらを評価し、さらに線溶因子の影響を検討した。また、本研究では、マウスとヒトの胚盤胞におけるフィブリンの効果の違いも検証した。

〔患者、材料ならびに方法〕

凍結ヒト胚盤胞（ $n = 177$ ）は、医療法人葵鐘会の不妊治療施設から、治療をした夫婦より得た。ICR系マウス（ $n = 97$ ）の凍結胚盤胞はトランスジェニック（株）より購入した。解凍した胚盤胞をフィブリンコートしたディッシュで培養し、栄養膜の成長を形態及び細胞面積の計測により評価した。胚盤胞周辺のフィブリン陰性領域を計測してフィブリン分解を評価した。プラスミノゲン・カゼインザイモグラフィーにより培養上清中の線溶活性を評価した。培養液中に同定されたウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター（uPA）に焦点を当て、uPA 阻害剤を用いて栄養膜成長における uPA 機能を検証し、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）により胚盤胞の線溶遺伝子の発現レベルを評価した。続いて、ヒト胚盤胞において、外因性 uPA 添加剤及びプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1（PAI-1）阻害剤により uPA 活性を上昇さ

せ、さらにフィブリン分解産物 (FDP) 溶液を用いて、栄養膜への影響を検証した。本研究は浜松医科大学臨床研究倫理委員会 (承認番号 15-252)、医療法人葵鐘会倫理委員会 (承認番号 2015\_003)、日本産科婦人科学会倫理委員会内登録・調査小委員会 (承認番号 137) の承認を得て行われた。

#### [結果]

マウス栄養膜 (n=9) の成長はフィブリンによる影響を受けず (P=0.14)、そして周辺フィブリンを急速に分解した。一方、ヒト (n=6) ではフィブリンによって栄養膜成長が顕著に抑制され (P<0.01)、緩慢なフィブリン分解と共に栄養膜が成長した。培養上清に uPA 活性が認められたが、ヒト (n=6) はマウス (n=6) と比較して活性が弱かった (P<0.01)。uPA 活性阻害によりヒト (n=8) 及びマウス (n=9) の栄養膜の成長は抑制されたが (それぞれ P<0.01)、マウスでは成長初期に顕著であり、一方ヒトでは成長に伴う抑制が観察された。そして、uPA 活性を抑制するインヒビター *Serpina2* (*PAI-2*) の mRNA は、ヒト (n=5) では発現し、マウス (n=5) では検出されなかった。続いて、ヒト胚盤胞では、フィブリンの非存在下では uPA 活性を上昇させても栄養膜成長に影響を与えなかったが、フィブリン存在下での uPA 添加 (n=11) および PAI-1 阻害剤添加 (n=9) による uPA 活性の上昇及び FDP (n=10) の存在は、栄養膜の成長を促進した (それぞれ P<0.01)。

#### [考察]

##### 1) ヒト胚盤胞に対するフィブリンの効果

フィブリンにより成長抑制されたヒト栄養膜は、線溶活性亢進によりその成長を開始したことから、フィブリン分解と栄養膜成長との関連が示された。先行研究ではマウス胚盤胞が uPA による線溶活性を有することが示されているが、ヒトでは類似の検証はされていない。本研究では、薬剤を用いてヒト胚盤胞の uPA 活性を増減させると、uPA がヒト栄養膜の成長に必要であることが確認でき、さらにフィブリンの存在下での uPA 活性の増加が、おそらく FDP の産生を通じて、ヒト栄養膜の成長に促進的に機能することを明らかにした。したがって、細胞外での uPA によるフィブリン溶解が胚盤胞の uPA の活性化を誘導する可能性を示した。

##### 2) フィブリンに対するヒトとマウスの反応の違い

ヒトと異なり、マウス胚盤胞は高い uPA 活性によりフィブリンの影響を受けなかった。着床期胚盤胞の uPA 活性の制御機構がヒトとマウスで異なる可能性があり、とりわけ PAI-2 の関与の違いが示唆された。これまでヒト胚盤胞の uPA 機能はマウスの所見から推定されてきたが、本研究では胚盤胞の uPA と栄養膜成長におけるヒトとマウスの差異を検証することで、マウスとは異なる機序でヒト胚盤胞は着床することを明らかにした。

[結論]

ヒト栄養膜において、フィブリン及び FDP との接触がヒト胚盤胞の表現型転換を誘導することを明らかにした。さらに、マウスとは異なる機序でヒト胚盤胞は着床することを明らかにした。