

論文の内容の要旨

論文題目「ヒトおよびマーモセットの妊娠関連タンパク質に関する研究」

学位申請者 柏木 寛史

キーワード：妊娠関連タンパク質、LC-MS、マーモセット、Pregnancy Zone Protein、プロテアーゼインヒビター

背景) 哺乳動物の進化の過程において、胎盤の構造と妊娠の分子メカニズムは大きく変化した。旧世界ザル以降の霊長類の胎盤は母児境界を構築し、胎児組織が同種異型として母親の免疫によるチェックを受ける。さらに、母体全身を循環する胎児トロフォブラストやその組織片、非メチル化CpG DNAが血中に存在する。これらは胎盤外で同種異型反応または炎症反応を引き起こす可能性があるため、子宮外での免疫調節は母親の健康を維持するために重要である。妊娠関連タンパク質の機能の一つは同種異型の細胞または組織片に対する免疫反応を抑制することと推測されている。妊娠関連タンパク質の機能分析の多くは、妊娠経過に異常のある妊婦の検体、またはマウス等の実験動物モデルの検体を使用される。ヒト検体は遺伝的背景が一致せず、マウスは妊娠期間が約3週間と短くトロフォブラストの浸潤性がわずかであることから、これらを用いて妊娠関連タンパク質の役割を完全に解明することは困難である。そのため、浸潤性のトロフォブラストを持ち、免疫システムがヒトにより近い新たなモデルシステムを開発する必要があると考えた。マーモセットは約5か月の妊娠期間を持つ新世界ザルであり、浸潤性のトロフォブラストを持つことが推測される。また免疫機能に関してヒトとマウスから進化的に等距離にあると考えられている。よって、マーモセットとヒトの妊娠関連タンパク質を比較解析することにより、霊長類に特徴的な調節機構を明らかにできると考えた。

目的) 本研究では、ヒトとマーモセットの血漿と胎盤の両方で妊娠中に変動する妊娠関連タンパク質の比較分析を行い、これら2つの種に共通する妊娠関連タンパク質の役割を明らかにすることを目的とした。

方法) 妊娠第1期、第2期および第3期にヒトおよびマーモセットの血漿を採取した。ヒト、マーモセットの胎盤組織を予定帝王切開および経膣分娩後に採取した。GFPマーモセットのキメラ胎盤も同様に採取し、マーモセットのトロフォブラストの浸潤性を検討した。次に、LC-MSを用いて全身性に検出される妊娠血漿タンパク質動態を解析した。LC-MSで著明な変化を認めたタンパク質について、IHCおよびRT-PCRにより胎盤局所での発現を解析した。最も顕著な変化を示したタンパク質の機能をIn silicoで解析した。

結果) GFPマーモセットの胎盤は、母仔境界面の血管を含む脱落膜へ浸潤する細胞外トロフォブラストを持ち、旧世界ザルやヒトの胎盤と似た浸潤性を示すことが示唆された。LC-MSでは、ヒトではPregnancy Zone Protein(PZP)が、マーモセットではPZPと同じAlpha-2-Macroglobulin(A2M)ファミリー分子であるA2M-like-1(A2ML1)が妊娠第2期に著明に増加する同じ血中動態を示した。またプロテアーゼインヒビターの増加とプロテアーゼの減少が共通した。ヒトPZPとマーモセットA2ML1は胎盤局所に集積した。これらの

タンパク質はヒトとマーモセット間に約90%の相同性を持ち、各機能領域の構造が共通した。しかし、A2Mファミリー分子の特徴的領域であるベイト領域に限ると約60%の低い相同性しか持たなかった。ベイト領域に反応し得るプロテアーゼを推測したところ、ヒトPZPとマーモセットA2ML1ではProline Endopeptidase (PE)を含め共通するプロテアーゼが多く存在した。また、ベイト領域は他の領域と比べてSNPが蓄積しやすいが、SNP存在下でもそのプロテアーゼの種類に変化がなかった。コラーゲンの分解の際に好中球の遊走と炎症の増悪に関与するPEを経膣分娩由来と予定帝王切開由来の胎盤で比較したところ、経膣分娩由来の胎盤により多く局在することが示された。

考察) 新世界ザルにおけるトロフォブラストの浸潤に関して明確に検討された報告はこれまでなく、GFPマーモセット胎盤を使用し、マーモセットが浸潤性のトロフォブラストを持つということを本研究で初めて報告した。マーモセットは、げっ歯類よりも長期間妊娠が維持され、浸潤性のトロフォブラストにより母児境界を構築する。よって胎児組織に対する母体の免疫寛容の分子メカニズムを調査するためのヒトモデル動物として、マーモセットはげっ歯類より優れていると考えられた。

LC-MS分析から、妊娠関連タンパク質であるPZPおよびA2ML1が妊娠第2期に増加することが明らかとなった。しかし、妊娠関連タンパク質以外に共通の動態を示すタンパク質は存在せず、プロテアーゼやプロテアーゼインヒビターなどの類似の特性を持ついくつかのタンパク質だけが同じ動態を示した。PZPは肝臓、胎盤、その他の組織で産生され、妊娠中に血中濃度が上昇する。またPZPのmRNAは胎盤において発現するが、その量はヒト最大の分泌源である肝臓の1000分の1程度である。予定帝王切開施行時まで胎盤におけるPZPの集積は維持されており、絨毛間腔のほとんどで検出された。一方、胎盤におけるPZPのmRNAの発現はわずかであった。そのため、絨毛間腔のPZPの大部分が肝臓で分泌され、妊娠中に母体血を介して胎盤に流入すると考えられた。

PZPおよびA2ML1のベイト領域はプロテアーゼ反応部位を含むため、PZPおよびA2ML1の上昇は、プロテアーゼ活性の減少に影響を与えている可能性があることが示唆された。さらに、減少したタンパク質には組織破壊および再構成に関わるプロテアーゼが含まれており、プロテアーゼの減少およびプロテアーゼインヒビターの増加により組織が保護され、これらの機構により母体に流入した胎児組織の一部が引き起こす母体組織の炎症が抑制されている可能性があると考えられた。

タンパク質の配列解析により、タンパク質全体ではベイト領域よりも相同性が高いことが示された。ベイト領域は、ヒトと旧世界ザルの間で高い相同性を有したが、ヒトとマーモセット間の相同性は著しく低かった。このことは、マーモセットに特徴的な妊娠と胎盤形成の進化に伴ってこれらの妊娠関連タンパク質もそれに適応するように進化した可能性が示唆された。マーモセットは通常、2葉が融合した胎盤を持つ双胎で妊娠しているため、単一の胎盤を持つヒトや旧世界ザルとは異なる独自の同種異型組織に対する反応性の抑制メカニズムを持つ可能性があると考えられた。

結論) ヒトPZPとマーモセットA2ML1は、同じプロテアーゼインヒビターとしての機能部位を持つ、進化的に類似した妊娠関連タンパク質である。