

東海大学大学院令和 7 年度博士論文

ヒト胎盤栄養膜細胞合胞体化における
細胞外マトリックス蛋白 SPARC の役割

東海大学大学院医学研究科

東郷敦子

この学位論文は、Reproductive Sciences に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

Reproductive Sciences に掲載された主要公刊論文の一部を学位論文に用いることに加えて、学位論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承認を得ている。

【総括】

胎盤は、胎児の生存、成長、発達に必要な臓器であり、その大部分は胎児由来の絨毛で構成されている。絨毛の外層を構成する合胞体栄養膜細胞

(syncytiotrophoblast: STB) は、その内層に位置する細胞性栄養膜細胞 (cytotrophoblast: CTB) が融合して多核化し、分化する (合胞体化) ことで形成され、妊娠維持において重要な役割を果たしている。さらに、CTB の一部は絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast: EVT) に分化し、脱着膜に侵入して子宮らせん動脈をリモデリング (再構築) することで血管抵抗を低下させ、胎児への酸素や栄養の供給を促進する。これらの過程は、正常な妊娠経過の維持に不可欠である。細胞の増殖や分化において、細胞外マトリックスは重要な役割を果たす。その中で、マトリセルラー蛋白 (matricellular proteins) に属する Secreted Protein Acidic and Rich Cysteine (SPARC) は、組織

のリモデリングや細胞の増殖・分化・遊走などに関与することが知られている。これまでに、SPARC は妊娠初期の正常胎盤において高発現することが確認されている。また、ヒト EVT モデルである HTR8/SVneo 細胞において、SPARC の発現を抑制すると浸潤が抑制されることが報告されている。しかし、SPARC と合胞体化の関連については未解明である。本研究では、SPARC の CTB の合胞体化過程における役割を明らかにすることを目的とした。

適切な倫理対応で得られた正常妊娠の各時期の胎盤を用いて、免疫組織化学染色により SPARC 蛋白の発現や局在を評価し、real-time RT-PCR で SPARC mRNA の発現量を解析した。さらに、CTB の合胞体化モデルとして頻用されている BeWo 細胞を用い、特異的 small interfering RNA を導入して SPARC の発現を抑制し、real-time RT-PCR およびウェスタンブロットを用いて、合胞体化関連因子（human chorionic gonadotropin [hCG] , glial cells missing transcription factor 1 [GCM1] , Syncytin-1, Syncytin-2, ovo-like transcriptional repressor 1 [OVOL1]）の発現への影響を検討した。また、同条件下で蛍光染色を用いて合胞体化への影響を評価した。加えて、SPARC の発現制御機構を探るため、同じく BeWo 細胞を用いて、hCG

添加による SPARC 発現への影響をウェスタンブロットで検討した。

免疫組織化学染色の結果、SPARC 蛋白は妊娠初期の胎盤において、主に STB および胎児血管内皮細胞に高発現し、CTB では発現が弱く散発的だった。妊娠後期の胎盤においても、同様の発現が確認されたが、初期胎盤と比較してそれらの発現は減少していた。さらに、SPARC の mRNA 発現量も妊娠初期から後期にかけて有意に減少することが確認された。一方、BeWo 細胞において SPARC の発現を抑制すると、合胞体化関連因子である hCG と OVOL1 の発現が増加し、合胞体化が促進された。また、SPARC は hCG により発現が増加することが示された。

以上より、SPARC は胎盤形成において重要な働きを担っており、CTB の合胞体化を抑制的に制御している可能性が示唆された。

【研究の背景】

胎盤とは：絨毛と栄養膜細胞

胎盤は、妊娠中に形成される一過性の臓器であり、胎児の生存、成長、発達に不可欠である。その大部分は胎児由来の絨毛で構成される。ヒトでは、受精後約 5～6 日目に胚盤胞が形成される。胚盤胞は、内部細胞塊、

栄養外胚葉、胚盤胞腔から構成される。内部細胞塊は将来胚や胎児に、栄養外胚葉は将来胎盤となる。栄養外胚葉は、胚盤胞の子宮内膜への着床に関与する。その後、細胞性栄養膜細胞（cytotrophoblast: CTB）へと分化し、絨毛の形成が始まる[1]。CTBは絨毛の内層に位置し、高い増殖能を有する単核細胞である。また、CTBは絨毛経路（villous pathway）と絨毛外経路（extravillous pathway）の2つの経路に分かれて、それぞれ合胞体栄養膜細胞（syncytiotrophoblast: STB）と絨毛外栄養膜細胞（extravillous trophoblast: EVT）に分化する（図1）[1]。

絨毛経路：細胞性栄養膜細胞の合胞体化と合胞体栄養膜細胞の機能

絨毛経路では、CTBは融合によって多核化し、分化することでSTBが形成される。この過程は「合胞体化」と呼ばれる。STBは、絨毛の外層を構成し、絨毛間腔にある母体血液と直接接触して、母体と胎児の間でガス交換、栄養物質や代謝産物の輸送を行う。また、胎児を母体の免疫系および外部からの病原体や有害物質から保護する免疫バリアを形成する。さらに、妊娠維持に必要なホルモン（ヒト絨毛性ゴナドトロピン [human chorionic gonadotropin: hCG]、ヒト胎盤ラク

トゲン [human placental lactogen: hPL]、プロゲステロン、エストロゲンなど) の分泌も担っている。このように、STB は多岐にわたる重要な役割を担い、妊娠維持に不可欠である [1,2]。図 2 にヒト胎盤の構造 (a)、絨毛の構造 (b) を示した。

細胞性栄養膜細胞の合胞体化を制御する因子とシグナル経路

合胞体化とは、複数の細胞が融合して 1 つの多核細胞を形成する過程であり、筋肉や骨の発達、胎盤における CTB の合胞体化など、さまざまな生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている [3]。胎盤では、CTB の合胞体化によって形成された STB は、細胞間結合を持たない広く一体化した細胞膜を有する。これにより母体血と直接接する部分の表面積が拡大し、物質交換が効率化される。また、エネルギーや代謝物の移動が円滑に行われ、シグナル伝達も効率化され、胎盤の機能が最適化される。さらに、細胞間に隙間がないため、外部の病原体や有害物質が侵入しにくく、物理的な障壁として機能する [1,2,4]。

合胞体化の過程は、ホルモン、サイトカイン、蛋白質キナーゼ、プロテアーゼ、転写因子、膜蛋白質など、さまざまな因子によって制御されている [5,6]。さらに、

サイクリック AMP (cyclic AMP: cAMP) - プロテインキナーゼ A (protein kinase A: PKA) 経路、Wnt シグナル経路、トランスフォーミング増殖因子- β

(transforming growth factor- β : TGF- β) 経路など、複数の細胞内シグナル伝達経路が関与している [7]。

なかでも、cAMP - PKA 経路は CTB の合胞体化において主要な役割を担っている。cAMP は、細胞内のシグナル伝達に関わるセカンドメッセンジャーであり、ホルモンやサイトカインなどの細胞外シグナルが、細胞表面の受容体に結合すると、アデニル酸シクラーゼ

(adenylate cyclase) が活性化され、ATP から cAMP が生成される。cAMP は PKA を活性化し、細胞内蛋白質のリン酸化を介して、エネルギー代謝、ホルモン応答、細胞の増殖や分化などの多岐にわたる生理機能を調整する [8,9]。CTB の合胞体化においては、cAMP の増加により PKA が活性化されると、グリア細胞欠損転写因子 1 (glial cells missing transcription factor 1:

GCM1) の発現が促進される。GCM1 は、栄養膜細胞の合胞体化に関与する蛋白質である Syncytin-1 と

Syncytin-2 をコードする、内因性レトロウイルス群 W メンバー 1 遺伝子 (endogenous retrovirus group W member 1, envelope: ERVW1) と内因性レトロウイルス群 FRD メンバー 1 遺伝子 (endogenous retrovirus

group FRD member 1, envelope: ERVFRD1) の発現を促進し、CTB の合胞体化を誘導する [10-14]。

絨毛外経路：絨毛外栄養膜細胞の浸潤と子宮らせん動脈のリモデリング

一方、絨毛外経路では CTB は分化して EVT となり、母体脱落膜に浸潤する。妊娠初期から中期にかけて、EVT は絨毛間腔に母体血液を注ぐ子宮らせん動脈の壁に浸潤し、その開口部を拡大するようにリモデリング（再構築）を行う（図 2 b）。これにより、子宮らせん動脈の血管径が広がり、種々の血管作動性物質への反応性が低下する。その結果、血管抵抗が下がり、子宮胎盤灌流が促進され、より多くの母体血液が絨毛間腔に流入することが可能となり、胎児への酸素や栄養供給が増加する [15]。

妊娠合併症と合胞体化および絨毛外栄養膜細胞のリモデリングの関連

妊娠高血圧症候群や類縁病態の胎児発育不全は、代表的な妊娠合併症であり、重症化すると母児の予後に大きな影響を与える。妊娠高血圧症候群は、日本と諸外国で定義が若干異なるが、日本においては、病態に基づいて妊娠高血圧腎症、妊娠高血圧、加重型妊娠高血圧腎症、高血圧合併妊娠に分類される [16]。これら

は、胎盤の機能不全が主な原因であり、EVTの機能不全や子宮らせん動脈のリモデリング不全がこれに関連している[17]。さらに、CTBの過剰な合胞体化が、妊娠高血圧腎症の病態形成に関与する可能性も報告されている[6]。以上より、正常な妊娠経過を維持するには、EVTの浸潤とリモデリング、およびCTBの合胞体化が共に適切に行われることが不可欠であると考えられる。

細胞外マトリックスの種類とその役割

細胞の増殖や分化には、細胞外マトリックス（extracellular matrix: ECM）が重要な役割を果たしている。ECMは、細胞の周囲に存在し、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチンなどの構造的成分と、マトリセルラー蛋白（matricellular proteins）、プロテオグリカン、ヒアルロン酸などの非構造的成分で構成される。ECMは、細胞の物理的支持、シグナル伝達、細胞間相互作用の調節などに関与している[18]。その中で、マトリセルラー蛋白は、細胞と細胞外マトリックスの相互作用やシグナル伝達を調節することで、組織のリモデリングや細胞の増殖・分化・遊走などを制御し、多様な役割を担っている[19]。

SPARC とは：その特性と機能および疾患との関連性

マトリセルラー蛋白に属する Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) は、オステオネクチン (Osteonectin) や基底膜蛋白質 40 (BM-40) と呼ばれる分子量約 43 kDa の分泌性糖蛋白であり、線維芽細胞、筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞などから分泌される [20-22]。SPARC は、組織リモデリングや創傷治癒、血管新生、細胞の増殖、分化、浸潤、遊走、接着などに関与し、関節炎、糖尿病、肥満、心血管疾患、腎臓疾患、悪性腫瘍などとの関連が報告されている [22-26]。乳がんや膵臓がんなどの一部の悪性腫瘍では、腫瘍細胞や腫瘍微小環境の細胞から SPARC が過剰に分泌され、腫瘍の増殖、浸潤、転移に関与していることが示されている [26]。また、SPARC は骨、皮膚、脳、心臓、肺、腎臓、子宮、卵巣など、全身のさまざまな臓器で発現が確認されており、特に組織リモデリングや損傷修復が活発に行われている部分で強い発現がみられる [27]。

胎盤における SPARC の発現とその役割

Tossetta らは、ヒト正常妊娠胎盤では、SPARC 蛋白は妊娠初期に高発現し、その後、後期には発現が減少することを報告した。また、妊娠高血圧腎症と胎児発育

不全の胎盤では、正常胎盤と比較して SPARC 蛋白の発現量がさらに減少していることを示した[28]。一方、Jiang らは EVT モデルの HTR8/SVneo 細胞において SPARC の発現を抑制すると、浸潤が抑制されると報告している[29]。しかし、SPARC が CTB の合胞体化に関与しているかどうかは明らかにされていない。SPARC が胎盤形成過程にどのように影響を与えるのかを明らかにするためには、合胞体化における役割についても解明する研究が必要である。

SPARC と合胞体化の関連性

合胞体化は胎盤以外にも、筋肉や骨の発達の過程などで起こる[3]。筋肉組織では、単核細胞である筋芽細胞が合胞体化することで、多核細胞である筋管細胞となる。その結果、強力で持続的な筋収縮が可能となり、筋組織の修復や再生が促進され、筋肉の耐久性と機能が最適化される[30,31]。これまでに SPARC と合胞体化の関連性についての報告は少ないものの、Cho らは、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株である C2C12 細胞において、合胞体化の過程で SPARC の発現が上昇し、SPARC の発現を抑制すると合胞体化が抑制されることを示した[32]。また、Melouane らは、SPARC が C2C12 細胞の合胞体化の過程において、ECM のリモデ

リングおよびミトコンドリア蛋白の発現に影響を与える可能性を報告している[33]。これらのことから、SPARCは骨格筋芽細胞の合胞体化の過程において、重要な調節因子である可能性が示唆される。

これらの報告に加え、ヒト胎盤の妊娠初期においてSPARCの発現が高いことが報告されていることから、我々はSPARCがCTBの合胞体化に関与しているのではないかと考え、本研究を着想した。

本研究の目的

本研究では、SPARCのCTBの合胞体化における役割について明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

1) ヒト正常妊娠胎盤組織における妊娠各時期のSPARCの発現の解析。

以下はCTBのモデル細胞株として頻用されているBeWo細胞を用いて実施。

2) 特異的siRNA導入によるSPARC発現抑制の条件下における合胞体化関連因子の発現への影響の検討。

3) 同条件下における、合胞体化に及ぼす影響の評価。

4) hCGによるSPARC発現調節の検討。

【考察と展望】

本研究において、ヒト正常妊娠胎盤組織を用いた免疫組織化学染色により、SPARC 蛋白は妊娠初期胎盤の STB と胎児血管内皮細胞に高い発現を示すことが確認され、SPARC mRNA の発現は妊娠初期から後期にかけて減少することが示された。また、CTB モデル細胞株である絨毛癌細胞由来の BeWo 細胞を用いた実験において、特異的 siRNA 導入による SPARC 発現抑制が、合胞体化関連因子である hCG および OVOL1 の発現を増加させ、BeWo 細胞の合胞体化を促進することが示された。これらの結果は、SPARC が CTB の合胞体化の制御に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

マトリセラー蛋白である SPARC は、様々な生物学的プロセスに関与しており、特にリモデリング、細胞増殖、創傷修復が行われる組織で高発現している [20-23,27]。妊娠初期における胎盤形成においても、リモデリングは重要な役割を果たしている [2,15]。Tossetta らは、ヒト正常妊娠胎盤において妊娠初期で SPARC 蛋白が高発現し、その発現は妊娠後期に減少すると報告している [28]。本研究でも、ヒト正常妊娠胎盤組織を用いた免疫組織化学染色により、SPARC 蛋白の発現は妊娠初期に高く、後期には低いことが確認された。さらに、SPARC の mRNA 発現量も妊娠初期から後期にかけて減少し、これらの結果は先行研究と一致した。

BeWo 細胞は、自然に融合する可能性は低いものの、cAMP やその類似物である 8-bromo-cAMP や Forskolin の添加により融合が誘導されることが知られている。そのため、CTB の合胞体化モデルとして確立されており、*in vitro* で広く使用されている [35,44]。Forskolin は、アデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内の cAMP レベルを増加させ、cAMP-PKA 経路を介して GCM1 の発現を増加させることで、Syncytin-1 および Syncytin-2 の発現を誘導し、BeWo 細胞の融合と hCG 産生を促進する [40-42]。

本研究では、BeWo 細胞において SPARC 発現抑制により hCG および OVOL1 の発現が増加し、合胞体化が促進された。一方、GCM1、Syncytin-1、Syncytin-2 の発現には変化が確認されなかった。また、Forskolin の添加は SPARC の mRNA 発現に影響を与えなかった。これらの結果は、SPARC が合胞体化を抑制するものの、上記の cAMP-PKA 経路とは独立したメカニズムで関与していることを示唆している。

この点において、OVOL1 の発現が増加したことは注目に値する。OVOL1 は亜鉛フィンガー蛋白質であり、胚発生の過程において、上皮系の系譜の決定や分化に関与する重要な転写因子である [45,46]。Renaud らは、OVOL1 が CTB の前駆細胞状態を維持する遺伝子を抑制し、合胞体化およびホルモン産生に必要な遺伝子の活性化を促進することで、STB の形成を促進することを報告して

いる[47]。胎盤における OVOL1 の機能はまだ完全に解明されておらず、SPARC と OVOL1 の関連性を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

また、これまでにマウスの骨格筋由来の筋芽細胞株である C2C12 細胞の合胞体化の過程において SPARC の発現が上昇し、さらに、SPARC の発現を抑制すると合胞体化が抑制されることが報告されている[32,33]。一方、本研究では、SPARC 発現抑制により BeWo 細胞の合胞体化が促進されることが示された。このことから、SPARC の合胞体化における役割は、細胞の種類によって異なる可能性が示唆される。

CTB の合胞体化過程における SPARC の制御機構についても、まだ十分に解明されていない。hCG は STB から産生され、卵巣の黄体を刺激してプロゲステロンの分泌を増加させ、妊娠初期の維持に寄与している。hCG の分泌量は、妊娠初期における STB の増殖と分化の促進と関連し、妊娠が進むにつれて増加して、妊娠 9 週または 10 週でピークに達する[39,48]。さらに、hCG は内分泌的役割に加えて、ヒト栄養膜細胞の膜上に位置する G タンパク質共役受容体である黄体形成ホルモン/絨毛性ゴナドトロピン受容体に結合し、cAMP/PKA 経路を活性化する。この活性化により、GCM1 が標的とする遺伝子の発現が増加し、Syncytin-1、Syncytin-2 などの細胞融合関連蛋白をコードする遺伝子が活性化され、合胞体化が促進される[49,50]。本研究では、hCG の添加により

SPARC の蛋白発現量が増加することが示された。この結果から、STB の増加に伴い hCG 産生量が増加し、そのフィードバック作用として SPARC の発現が促進され、合胞体化を抑制している可能性が示唆される。したがって、hCG は CTB の合胞体化を促進および抑制することで、STB の形成を微調整している可能性がある。本研究から推察される SPARC による栄養膜細胞合胞体化の抑制機序を図 9 に示した。

CTB の合胞体化によって STB が形成される一方、老化やアポトーシスに伴い STB は絨毛の末端部に合胞体結節 (syncytial knots) を形成し、最終的に母体血流に放出される。正常な妊娠では、STB はこうした過程を通じた新陳代謝 (ターンオーバー) によって、その機能を保っている [51]。しかし、このターンオーバーのバランスが崩れると、胎盤バリアの不安定化や血管新生の障害が生じ、胎盤形成不全を引き起こす可能性がある。また、アポトーシスした細胞片 (STB 断片) の過剰放出は、母体の免疫系を刺激して、全身性の炎症反応や高血圧を誘発し、妊娠高血圧症候群や胎児発育不全などの発症と関連している可能性が報告されている [52]。Mayhew らは、妊娠高血圧腎症の胎盤と正常胎盤の比較において、物質交換のための表面積や拡散距離に差がなく、絨毛栄養膜細胞の総体積に変化がないことを示した [53]。一方、Arnholdt らは、妊娠高血圧腎症において絨毛栄養膜細胞の増殖が増加していることを報告している [54]。さらに、

妊娠高血圧腎症の発症前から、成長因子やサイトカインなどの融合促進因子が異常に増加していることも報告されており、上記と合わせて、過剰な合胞体化および STB の過剰放出が、妊娠高血圧腎症の発症や病態形成と密接に関わる可能性が示唆されている [6]。

妊娠高血圧腎症と SPARC との関連性については、これまでに、本症および類縁病態の胎児発育不全の胎盤では、正常胎盤と比べ SPARC 蛋白の発現が減少していることが報告されている [28]。本研究において、SPARC が CTB の合胞体化を抑制する可能性が示されたことから、SPARC の発現減少により過剰な合胞体化が起こり、それが妊娠高血圧腎症の病態形成に寄与している可能性がある。したがって、SPARC は妊娠高血圧腎症の発症メカニズムを解明する上で注目すべき要因の一つである。

今後の展望

本研究は、BeWo 細胞を用いて SPARC の CTB の合胞体化における役割を検討したが、胎盤における SPARC の機能をさらに明確にするためには、他の細胞株や初代ヒト栄養膜細胞 (Primary human cytotrophoblast) を用いたさらなる検討が必要である。また、他の調節因子やシグナル伝達経路との関連を明らかにすることで、胎盤形成および機能における分子メカニズムへの理解が一層深まると考えられる。加えて、妊娠高血圧症候群や胎児発育不全との関連性を調べることで、発症機序や病態の

解明、新たな治療法の開発、さらにはこれらの病態における SPARC の診断マーカーとしての利用につながる可能性が期待される。

【結論】

本研究では、BeWo 細胞における SPARC 発現抑制により、合胞体化関連因子である hCG および OVOL1 の発現が増加し、合胞体化が促進されることが確認された。これらの結果は、SPARC が胎盤形成における重要な調整因子として、CTB の合胞体化を抑制的に制御している可能性を示唆している。