

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18649

研究課題名（和文）CTRP6の胎盤における発現分布と機能解析-流産予防薬としての可能性検証-

研究課題名（英文）The localization and function of CTRP6 in placenta

研究代表者

近藤 愛（武下愛）（Takeshita, Ai）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：50733557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新たな流産予防薬の候補となり得る新規補体第二経路抑制因子CTRP6について、その機能や妊娠への影響を調べた。CTRP6は非妊娠期の子宮にも発現しており、妊娠に伴ってその発現が増加することが分かった。遺伝子レベルでは胎児由来細胞での発現が高く、タンパクレベルでは母体由来のCTRP6も機能していた。その役割は必須ではないが、血管新生に関与しており、胎児発育遅延の抑制する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で自然流産モデルマウスにCTRP6を投与したところ、流産率の減少傾向と胎児体重の増加が認められた。子宮内胎児発育遅延は胎児の周産期死亡率が高いだけでなく、低体重出生児の生活習慣病発症リスクが高いことから注目されている。また、CTRP6は多くの哺乳類で保存されている補体抑制因子である。ヒトにおける流産や胎児発育遅延の予防だけでなく、家畜動物の繁殖効率の上昇にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the function and effects of CTRP6 during pregnancy. It is a novel inhibitor of alternative complement pathway that may be a candidate for a new prophylactic agent for miscarriage. CTRP6 was expressed in the non-pregnant uterus and its expression increased during pregnancy. At the gene level, its expression was higher in fetal-derived cells, and at the protein level, CTRP6 secreted from maternal tissue was also functional. Although its role is not essential, it is involved in angiogenesis and may improve fetal growth retardation.

研究分野：生殖生物学

キーワード：胎盤 補体 子宮内胎児発育遅延 流産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎盤における補体の活性化は流産を引き起こす。これまでの研究で、補体第二経路が流産誘発に関与していることを見出した(引用文献)。補体第二経路は古典経路やレクチン経路と異なり、抗原抗体反応による免疫複合体の形成を必要としない自然免疫機構である。本研究では新規第二経路抑制因子 C1q/TNF-related protein 6 (CTRP6; gene symbol C1qtnf6) に着目した。CTRP6 は、補体活性化経路のうち第二経路のみを特異的に抑制することが報告されており(引用文献) 網羅的遺伝子発現解析により CTRP6 は胎盤内での発現が高いことが知られている(引用文献)。しかし、胎盤内における機能や発現分布は不明である。

2. 研究の目的

自然流産モデルマウスや C1qtnf6 欠損マウスを用いて、妊娠中の CTRP6 の発現分布や機能を明らかにし、さらに流産や胎児発育遅延の抑制効果の検証を行う。

3. 研究の方法

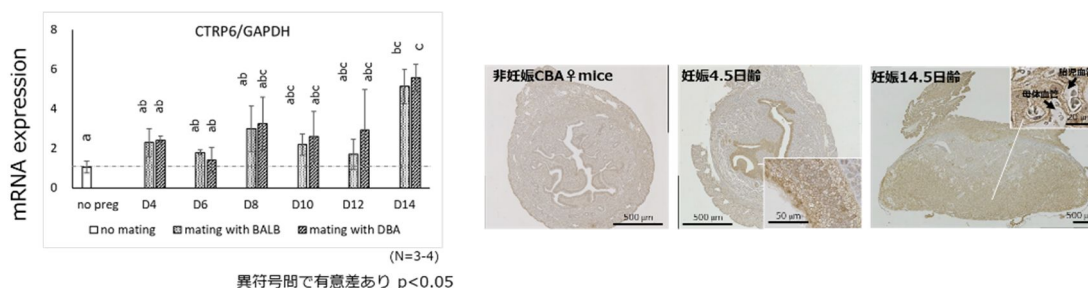
(1) まず、子宮および胎盤における CTRP6 発現動態を調べた。CBA 雌マウスを DBA 雄マウスと交配させた CBA×DBA マウスと、CBA 雌マウスを BALB 雄マウスと交配させた CBA×BALB マウスを使用した。膣栓確認日を妊娠 0.5 日目とし、妊娠 4.5 日目から 14.5 日目まで 2 日毎に子宮もしくは胎盤を採取した。CTRP6 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により、組織内のタンパク質の発現分布を免疫組織学的解析法により検討した。

(2) CBA×DBA マウスは、自然流産や子宮内胎児発育遅延のモデルマウスとして知られている。この CBA×DBA マウスに CTRP6 のリコンビナントタンパク質を尾静脈投与し、妊娠への影響を調べた。妊娠 4.5 日目と 6.5 日目に CTRP6 を投与した群(CC 群)、妊娠 4.5 日目に CTRP6 を投与し 6.5 日目に PBS を投与した群(CP 群)、対照群として妊娠 4.5 日目と 6.5 日目に PBS を投与した群(PP 群)を使用した。妊娠 14.5 日目に胎児と胎盤を採取し、組織学的および生化学的解析を行った。

(3) C1qtnf6 欠損マウスを用いて、CTRP6 の妊娠への直接的な影響を調べた。ヘテロ欠損マウス雌雄を交配し、妊娠 14.5 日目および妊娠 18.5 日目に胎盤および胎児を採取した。それぞれの重量を測定し、胎児組織を用いて genotyping を行った。各遺伝型胎児を含む胎盤について、形態的および機能的変化を解析した。

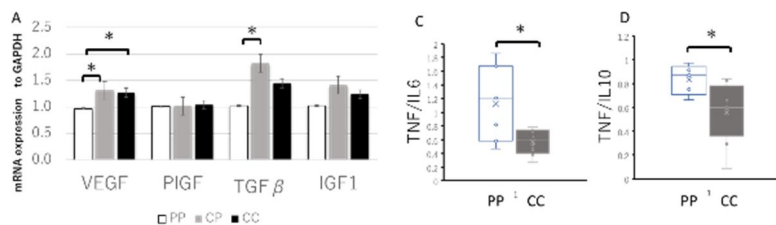
4. 研究成果

(1) 妊娠子宮および胎盤における CTRP6 の mRNA 発現は、非妊娠子宮と比較して全体的に高い傾向にあり、妊娠 14.5 日目には有意に高いことが分かった(下左図)。免疫染色では、非妊娠子宮では子宮内膜上皮に、胎盤では迷路部での発現が高いことが明らかとなったが、CBA×DBA マウスと CBA×BALB マウスで有意な差は認められなかった(下右図)。

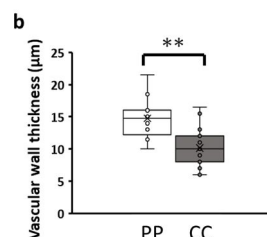


(2) CBA×DBA マウスに CTRP6 を投与した。妊娠 14.5 日目における胎児死亡率は PP 群 21%、CP 群 20%、CC 群 13%で統計学的な差はなかったが、減少傾向であった。着床数に差はなかった。胎児重量は PP 群 148 ± 21 mg、CP 群 148 ± 21 mg、CC 群 162 ± 25 mg で有意に増加した ($p < 0.05$)。胎盤重量に差は認められず、胎盤各領域の割合も変化しなかった。

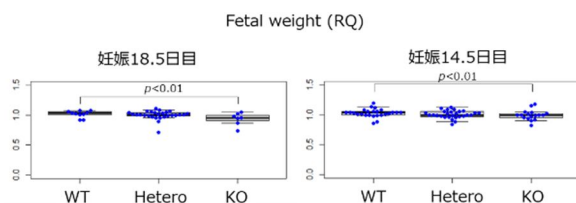
胎盤内免疫寛容や胎盤発育に関与する遺伝子の発現変化を検討した。PP 群と比較し、CC 群では Th1/Th2 サイトカインバランスが Th2 優位となっており、VEGF の発現も増加していた(下図)。



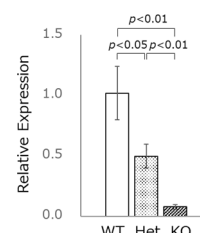
VEGF は胎盤内のらせん動脈再構築に関わる。そこでらせん動脈について組織学的に解析した。脱落膜に存在するらせん動脈の血管壁の厚さは PP 群 ($14.8 \pm 3.1 \mu\text{m}$) と比較し CC 群 ($10.1 \pm 2.7 \mu\text{m}$) で有意に薄くなっていた。



(3) C1qtnf6 ヘテロ欠損マウス雌雄の交配における胎児もしくは産子の遺伝型は、野生型 53 匹(31.4%)、ヘテロ遺伝型 78 匹(46.2%)、ホモ遺伝型 38 匹(22.5%)であった。妊娠 14.5 日目および妊娠 18.5 日目における胎児体重は、野生型に比べホモ遺伝型で有意に低かった(下図)。胎盤重量については各遺伝型で差は認められなかった。

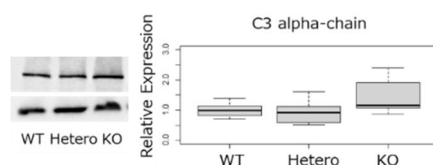


胎盤における CTRP6 の mRNA 発現量は、野生型胎児を含む胎盤で有意に高く、ホモ遺伝型胎児を含む胎盤で有意に低かった。胎盤における CTRP6 の遺伝子発現は胎児由来細胞によることが明らかとなった(右図)。



胎児重量変化や胎児の要因となり得る因子について同定を試みた。結果、Th1/Th2 サイトカインバランスや、VEGF・PIGF、グルコース輸送チャネルなどの遺伝子発現は、各遺伝型胎児を含む胎盤で有意な差は認められず、胎児体重変化の要因を明らかにすることは出来なかった。

胎盤内における補体 C3 発現を western blotting により解析した。ホモ遺伝型胎児を含む胎盤で増加傾向にあったが、有意な差は認められなかった(下図)。正常妊娠時において、CTRP6 による補体抑制の重要性は低いと考えられた。



以上より、胎盤における CTRP6 は、遺伝子レベルでは胎児由来細胞における発現が高いが、母体由来タンパク質も機能していることが示唆された。また CTRP6 は妊娠に必須ではないが、胎児胎盤局所もしくは母体内で分泌された CTRP6 は、胎盤内でらせん動脈再構築に関与し、流産や胎児発育遅延を抑制できる可能性が明らかとなった。

< 引用文献 >

Takeshita et al., Immunobiology, 2014.
 Murayama et al., Nat Commun., 2015.
 BioGPS : <http://biogps.org/#goto=genereport&id=72709>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武下愛、奥村真侑、橋本周、森本義晴
2. 発表標題 新規補体抑制因子CTRP6は着床部位において継続的に発現している
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川真侑、武下愛、羽室明洋、三杉卓也、橘大介、橋本周、森本義晴、古山将康
2. 発表標題 補体第二活性化経路抑制による流産・子宮内胎児発育遅延の予防
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	黒川 真侑 (Kurokawa Mayu)	大阪市立大学・産婦人科・大学院生 (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------