

胎盤機能不全の病態生理における赤血球の役割と新規治療法の開発に向けて

東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科 佐山 晴亮

要約

胎盤機能不全に伴う周産期疾患(胎児発育不全(Fetal growth restriction: 以下FGRと略す)や妊娠高血圧腎症(Preeclampsia: 以下PEと略す))発症の病態機序として、胎盤形成初期の子宮らせん動脈のリモデリング不全を原因とした胎盤形成不全と胎盤への低酸素負荷が契機となることが知られているが、赤血球(以下RBCと略す)は酸素運搬における中心的な役割を果たすのにも関わらず、これまで母体RBCとFGR/PEとの関連を示した研究はない。そこで我々は、母獣のRBCの酸素運搬能を低下させた遺伝子改変マウスを用いて、その表現型を検証した。その表現型がFGRであることに着目して、その分子学的背景を解明するために胎盤のメタボロミクス解析を行ったところ、同マウスにおいてはコントロール群と比較して有意に胎盤でのアミノ酸濃度の低下、および血清のアミノ酸濃度の上昇を認めた。また、母獣RBCの酸素運搬能の低下は胎盤局所での低酸素状態を惹起し、低酸素で誘導される転写因子Hypoxia inducible factor-1 α (以下HIF-1 α と略す)の胎盤での発現が上昇することを確認し、HIF-1 α の上昇が胎盤でのアミノ酸トランスポーターの発現低下を誘発することを示した。最終的に、同妊娠マウスにアミノ酸を投与し、胎盤を介したアミノ酸の取り込みが阻害されることも示し、母体RBCの酸素運搬能の低下が母児間の栄養輸送機構を阻害し、FGRの発症に関与することを明らかとした。また、絨毛細胞セルライン、HTR-8/SVneoをHIF-1 α 安定剤であるDimethylloxaloylglycine (DMOG)と共培養することで、HIF-1 α 存在下でのアミノ酸トランスポーター発現の関連についても検証した。

緒言

妊娠初期の胎盤形成障害は、胎盤での低酸素を惹起し、胎盤機能不全に伴う産科疾患である胎児発育不全(Fetal growth restriction: FGR)や妊娠高血圧腎症(Preeclampsia: PE)の病態に深く関与していることが知られている。赤血球は酸素運搬に関わる最も重要な「臓器」ともいえるが、赤血球の機能とFGRやPEとの関連を示した報告は極めて少ない。赤血球は体内で唯一酸素を運搬する細胞であると同時に、末梢組織での低酸素を感知する能力も備えている。周辺環境に適応するために赤血球は自身の酸素運搬能を修飾する機能を有しており、酸素とヘモグロビンの親和性を調整することでその酸素運搬能を調整している。その調整機構で最も中心的な役割を果たしているのが2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG)であり、赤血球内で解糖系により生合成される。赤血球の酸素運搬能は、酸素がヘモグロビンの50%結合飽和するときの酸素分圧であるp50で評価され、p50は2,3-BPGと正の相関を示し、p50及び2,3-BPGは酸素運搬能と正の相関を示す。1990年に、胎

児発育不全症例の母体の2,3-BPG及びp50は正常の胎児発育の母体と比較して有意に低値を示していたが、その分子機序を同定するには至らず、この赤血球の酸素運搬能の低下が如何にしてFGRをきたすかは不明であった[1]。

高地などの低酸素ストレスに赤血球が対応する際は、赤血球の膜上に存在する核酸トランスポーターであるENT1が、低酸素ストレスによって増加した細胞外のアデノシンを取り込み、酸素運搬能を上昇させるという調節機構が行われることで低酸素に応答する[2]。赤血球からENT1を除去すると低酸素応答に障害をきたすと考えられるため、本研究では、ENT1を母獣赤血球からノックアウトし、その妊娠における表現型を検証し、その分子機序の解明も行なった。

方法

母獣のRBCの酸素運搬能を低下させた遺伝子改変マウスを用いて、その表現型を検証し、その分子学的背景を解明するために、胎盤および母獣血清の

メタボロミクス解析を行った。また、胎盤局所での低酸素が及ぼす転写因子HIF-1 α の発現状況をウエスタンブロット法にてタンパク発現を定量的に評価し、胎児発育に影響を及ぼす各種トランスポーターの発現状況もリアルタイムPCR法及びウエスタンブロット法を用いてmRNA及びタンパク発現を定量的に評価した。最終的に、同妊娠マウスにアミノ酸を投与し、胎盤を介したアミノ酸の取り込みも胎盤のメタボロミクス解析で評価した。また、細胞レベルでの反応を評価する目的でHTR-8/SVneo細胞を用いて、低酸素下でのアミノ酸とランスポーターの評価も行った。統計学的解析は、Prism 5 softwareを用いてコントロール群と遺伝子改変群を比較してStudent's t testを用いた。P<0.05を統計学的有意差ありと判断した[3]。

結果

遺伝子改変群はp50及び2,3-BPGの低下を認め、FGRの表現型を呈する

lox-Cre systemを用いて、母獣の赤血球のENT1のみを除去したコンディショナルノックアウトモデルマウス、Ent1flox/flox EpoR-Cre+ (E1FE)を作成し、その妊娠における表現型を検証した。コントロール群はEpoR-Cre+ (EPO)を用いて、共にwild typeの雄と交配させることで、両群の唯一の違いはE1FE群での母獣赤血球のENT1が欠損しているという交配モデル(図1)を作成した。膣プラグを確

認した日を妊娠0.5日とし、妊娠13.5、15.5、17.5日でtail cuff法での血圧測定を実施し、妊娠18.5日でELISAによる蛋白尿測定、採血、解剖、胎盤重量、胎仔の体重の測定を行なった。

また、p50及び2,3-BPGの測定は以前の報告と同様の方法で行なった[4]。E1FE及びEPOの妊娠18.5日での赤血球のp50及び2,3-BPGを測定したところ、EPO群と比較してE1FE群でp50及び2,3-BPG共に有意に低下しており、これはE1FEの母獣の赤血球酸素運搬能が低下していることを示している。それに伴い、胎盤でのHypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α) の発現を蛍光免疫染色で検証したところ、EPO群と比較してE1FE群のspongiotrophoblastでのHIF-1 α の発現亢進を認め、赤血球の酸素運搬能の低下が胎盤局所での低酸素を惹起していることを示していた。また、E1FEの妊娠における胎盤形成不全の表現型を呈するかを検証するためにEPO群とE1FE群の母獣の蛋白尿、血圧、胎仔の重量を測定したところ、E1FE群で有意に胎仔の体重低下を認めていたものの、蛋白尿や高血圧は認めず、PEではなくFGRの表現型を呈していることが示された(図2)。

E1FEの胎盤ではアミノ酸濃度が低いが、母獣血清中のアミノ酸濃度は高い

FGRをきたす背景に存在する代謝経路を同定するために、EPO群及びE1FE群の母獣の血清及び

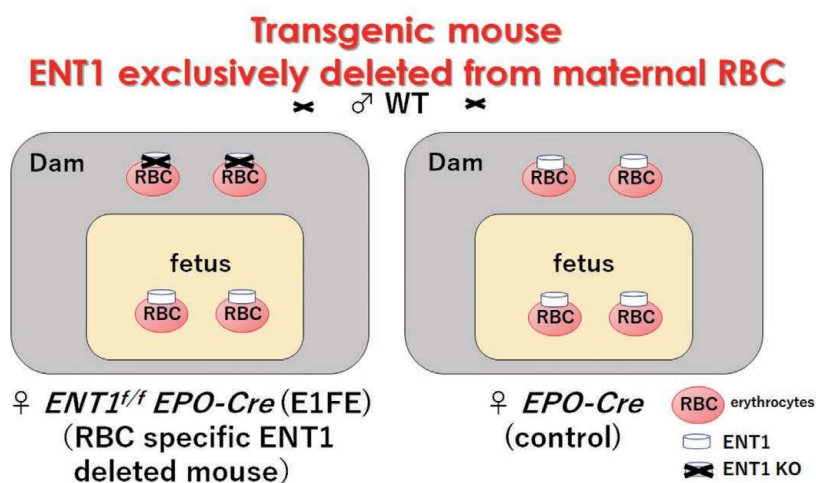


図1. 母獣の赤血球のみENT1を除去するような交配モデル

母獣の赤血球のENT1のみを除去したコンディショナルノックアウトモデルマウス、Ent1flox/flox EpoR-Cre+ (E1FE)を実験モデルとして使用する。Wild typeの雄と交配することで、胎仔のfloxは全てflox/wild typeになるため、胎仔はCreには影響されない。Cre自体が表現型を有する可能性があるため、母獣のコントロールにはEPO-Creを使用することで母獣の赤血球のENT1を除去した影響のみを検証できる交配モデルを確立した[3]。

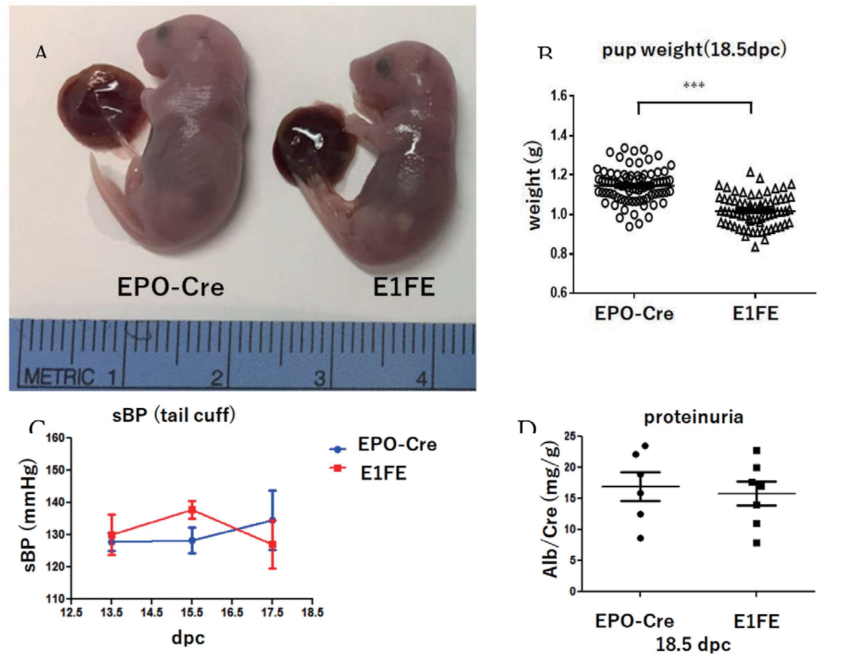


図2. E1FE母獣の表現型

E1FEの胎仔はEPOと比較して有意に体重が低かった(A,B)が、血圧(C)と蛋白尿は両群間で有意差は認めず、E1FEはFGRの表現型を有することを確認した[3]。 (**P<0.005)

胎盤でのメタボロミクス解析を行なった。すると、ほぼ全てのアミノ酸に関してEPO群と比較して、E1FE群の胎盤で低値、血清で高値を示しており、FGRの表現型をきたす背景に母獣から胎盤へのアミノ酸の取り込み阻害の存在が示唆された(図3)。

E1FEの胎盤ではLarge neutral amino acid transporter1 (LAT1)のmRNA及びタンパク発現が低下している

母獣からのアミノ酸取り込みにおいて中心的な役割を担うのが胎盤でのアミノ酸トランスポーターであるため、EPO群及びE1FE群での胎盤での主要なアミノ酸トランスポーターのmRNAをrealtime RT-

PCRを用いて比較したところ、EPO群と比較してE1FE群の胎盤においてLAT1のmRNAが有意に低下しており、ウエスタンブロットでも同様の結果が確認され、EPO群と比較してE1FE群の胎盤でのLAT1タンパクの発現低下を認めた(図4)。

HTR-8/SVneo細胞でHIF-1 α を安定化させることでLAT1のmRNAが抑制される

胎盤局所での低酸素と胎盤でのLAT1の発現低下との関連を検証するために、HIF-1 α の安定剤であるDimethylloxaloylglycine (DMOG)存在下で絨毛細胞セルライン、HTR-8/SVneo細胞を培養し、LAT1のmRNAをrealtime PCRを用いて検証し

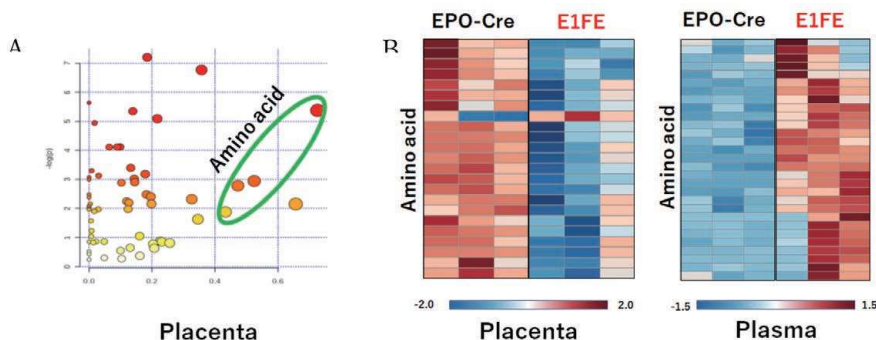


図3. E1FE及びEPOの胎盤及び血清のメタボロミクス解析

胎盤におけるメタボロミクス解析でEPOとE1FEを比較したところ、アミノ酸代謝に関わる経路が強く影響を受けていた(A)。胎盤及び血清のアミノ酸の代謝を検証したところ、EPOと比較してE1FEではほぼ全てのアミノ酸において胎盤で低下しており、血清中で増加を認めた(B) [3]。

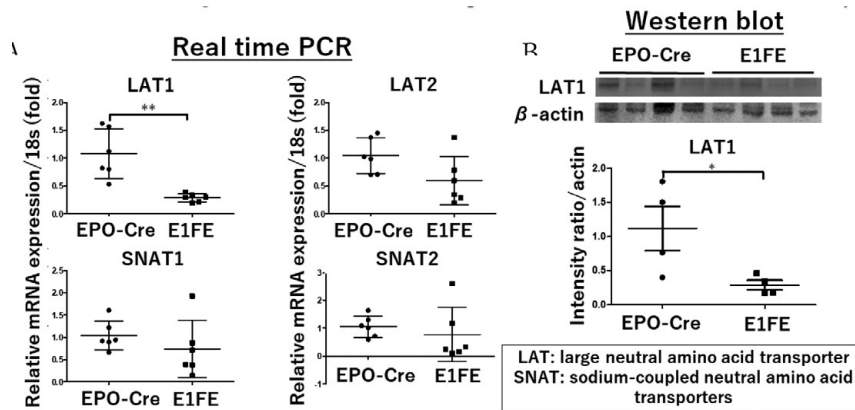


図4. E1FE及びEPOの胎盤でのアミノ酸トランスポーターの発現

EPO及びE1FEの胎盤での主要なアミノ酸トランスポーターの発現をrealtime RT-PCRで検証したところ、EPOと比較してE1FEにおいて、LAT1のmRNAが有意に低下していた(A)。タンパクレベルでの発現も低下していることをウエスタンブロット法で確認した(B) [3]。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

た。DMOG存在下では非存在下と比較してLAT1のmRNAは有意に低下していた。よって、胎盤でのLAT1発現低下の背景に胎盤局所でのHIF-1 α の発現上昇があることが示された。

考察

本研究では以下を明らかとした

- ①母体赤血球の酸素運搬能の低下が胎盤局所でのHIF-1 α 発現上昇を惹起する。
- ②胎盤でのHIF-1 α の発現亢進は胎盤でのLAT1の発現低下をきたし、母体から胎盤へのアミノ酸取り込みを阻害することでFGRの表現型をきたす。

1990年にFGR症例の母体から採取した赤血球のp50及び2,3-BPGが低下、すなわち酸素運搬能が低下していることが示されたが、赤血球の酸素運搬低下がFGRをきたす分子機序は未解明であった。本研究により、母体の赤血球酸素運搬能の低下が胎盤局所での低酸素を惹起し、HIF-1 α の発現を亢進させ、胎盤のアミノ酸トランスポーターの発現を低下させるという機序をマウスモデルで示すことができた。ヒトとマウスでは胎盤の構造が違うが、母体赤血球の酸素運搬能が低下している症例では同様の機序によりFGRをきたしている可能性があり、これまで注目されていなかった側面からFGRの病態生理へのアプローチが可能となった。これによって、新たな治療戦略の可能性も拓け、母体赤血球をターゲットとしたFGRの治療、ひいては胎盤形成不全という意味では類似の疾患であるPEへの応用も可能であると考えられる。今後は、このような視点からFGR及びPEの新たな治療戦略を確立することを目

標とする。

参考文献

1. Brown, E.G., et al., The relationship of maternal erythrocyte oxygen transport parameters to intrauterine growth retardation. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1990. 162(1): p. 223-229.
2. Song, A., et al., Erythrocytes retain hypoxic adenosine response for faster acclimatization upon re-ascent. Nature Communications, 2017. 8: p. 14108-14108.
3. Sayama, S., et al., Maternal erythrocyte ENT1-mediated AMPK activation counteracts placental hypoxia and supports fetal growth. JCI Insight, 2020. 5(10).
4. Liu, H., et al., Beneficial Role of Erythrocyte Adenosine A2B Receptor-Mediated AMP-Activated Protein Kinase Activation in High-Altitude Hypoxia. Circulation, 2016. 134(5): p. 405-421.

Abstract

Background: Insufficient oxygen supply is closely associated with the pathophysiology of fetal growth restriction (FGR). Although the erythrocyte is the most abundant and only cell type to deliver oxygen in our body, its function and regulatory mechanism in FGR remains unknown. Recently, intracellular adenosine uptake by equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1), a key adenosine transporter predominantly expressed in erythrocytes, was reported to be crucial for erythrocytes to deliver oxygen. Current study was aimed to investigate the involvement of erythrocytes' oxygen delivering capacity in maintaining fetal growth by focusing on erythrocyte ENT1.

Methods and Results: Conditional knockout mice with erythrocyte-specific gene deletion of ENT1 were utilized in this study. These mice indeed showed reduction in oxygen delivering capacity during pregnancy compared to control mice. We found that genetic ablation of mouse erythrocyte ENT1 in dams results in FGR without showing any maternal features of preeclampsia. Unbiased high-throughput metabolic profiling led us to discover that these transgenic mice have lower amino acid concentration in the placenta and higher amino acid concentration in the serum compared to the control dams. Mechanistically and functionally, we revealed genetic ablation of maternal erythrocyte ENT1 increases placental HIF-1 α , preferentially reduces placental large neutral amino acid (AA) transporter 1 (LAT1) expression and activity, and results in FGR. Translationally, we revealed elevated HIF-1 α directly reduces LAT1 gene expression in cultured human trophoblasts. **Conclusion:** Our findings suggest that maternal erythrocytes' oxygen delivering capacity mediated by ENT1 is essential for maintaining adequate placental oxygenation to support fetal growth. Strategies to improve erythrocytes' function to deliver oxygen may provide new therapeutic possibilities for FGR.