

# 主論文

## Upregulation of angiogenic factors via protein kinase C and hypoxia-induced factor-1 $\alpha$ pathways under high-glucose conditions in the placenta (高血糖条件下の胎盤における PKC 及び HIF-1 $\alpha$ を介した血管新生因子の産生)

### 【緒言】

妊娠高血圧腎症とは妊娠 20 週以降、分娩後 12 週までに高血圧がみられ、高血圧に蛋白尿を伴い、かつこれらの症状が単なる妊娠の偶発合併症によるものではないものと定義されている。妊娠高血圧腎症は、母体には母体死亡や脳出血などの重篤な合併症を引き起こし、また、胎児には子宮内胎児死亡や子宮内胎児発育遅延(fetal growth restriction; FGR)などを引き起こし、その妊娠の予後に多大な影響を与えている。妊娠高血圧腎症の病態は Roberts JM らが提唱した two-stage disorder theory によって明らかとなりつつあり、その発症には低酸素誘導因子(Hypoxia induced factor; HIF-1 $\alpha$ )の発現の増加や血管新生因子と抗血管新生因子の不均衡が関与していると報告されている。しかし、その重症度や発症時期により病態が異なるとの報告や、病型により母体や胎児に与える影響が異なることが報告されており、未だ解明されていない病態が存在すると考えられている。

妊娠高血圧腎症にはいくつかのリスク因子が知られており、妊娠中の糖代謝異常に合併することはよく知られている。妊娠中の糖代謝異常において、母体の血糖コントロールが不良の場合、胎盤の病理学的変化は大型で絨毛間腔の狭い Immature villi が増加し、末梢絨毛での虚血性変化が生じる。その結果として、絨毛内の低酸素状態の持続により新生血管や chorangiogenesis が認められるようになる。すなわち、妊娠中の糖代謝異常に合併した妊娠高血圧腎症の発症機序においても胎盤での虚血性病変による HIF-1 $\alpha$  の産生の増加や血管新生因子や抗血管新生因子の産生が関与している可能性が考えられる。

糖尿病などの高血糖状態において細胞内に取り込まれた多量のグルコースは Denovo DAG 合成経路を介してプロテインキナーゼ C (Protein kinase C; PKC) を活性化すると考えられている。PKC とは、10 種類以上のアイソザイムから構成されるタンパク質ファミリーである。セリン-スレオニン残基のヒドロキシル基をリン酸化し、MAPK, NF- $\kappa$ B, NADPH oxidase などの細胞内シグナル伝達において中心的な役割を担っている。PKC の活性化は糖尿病性網膜症や糖尿病性腎症などの糖尿病性微小血管障害の発症に深く関与しており、また、PKC $\beta$  特異的阻害剤 LY333531 の投与により、それらを改善もしくは抑制することが報告されている。

本研究では高血糖条件下におけるヒト絨毛癌由来細胞における血管新生因子及び抗血管新生因子の発現を調査する。それらの発現における HIF-1 $\alpha$  の関与を明らかにする。さらには低酸素誘導因子の産生増加における経路として高血糖に伴う PKC の活性化に焦点をあて、PKC $\beta$  阻害剤が低酸素誘導因子の産生を低下させ、血管新生因子及び抗血管新生因子の発現を抑制することが可能か検討を行った。

### 【材料と方法】

#### 細胞培養

絨毛癌細胞(BeWo 細胞)を Ham's F-12K 培養液にて培養した。絨毛癌細胞(JEG-3 細胞)を DMEM 培養液にて培養した。絨毛細胞(HTR-8/SVneo 細胞)を RPMI 培養液にて培養した。BeWo 細胞と JEG-3 細胞は 10 mmol/L(コントロール群)と 25 mmol/L(高血糖群)でそれぞれ 6 時間、24 時間培養を行った。HTR-8/Svneo 細胞は 10 mmol/L(コントロール群)と 25 mmol/L(高血糖群)で 24 時間培養を行った。いずれの細胞も 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の条件下で培養した。さらに BeWo 細胞の 24 時間培養には、200 nM の ruboxistaurin hydrochloride, PKC $\beta$ -specific 阻害剤(LY333531), 10  $\mu$ M の methyl 3-[[2-[4-(2-adamantyl)phenoxy]acetyl]amino]-4-hydroxybenzoate, HIF-1 $\alpha$  阻害剤を負荷した。それぞれの細胞は RNeasy Mini Kit を用いて Total RNA を回収し、-80°C で保存した。上清は-30°C で保存した。

#### Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction

Total RNA を high-capacity cDNA reverse transcription kit で逆転写を行い、STEP ONE PCR system を用いて、soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), placental growth factor (PlGF),

vascular endothelial growth factor (VEGF), HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -actin で Real time reverse transcriptase PCR を行った。 $\beta$ -actin はコントロールとして使用した。

#### Enzyme-linked immunosorbent assay

BeWo 細胞と JEG-3 細胞の細胞培養液の上清を用いて, sFlt-1, PlGF, VEGF の ELISA を行なった。

#### Protein kinase C kinase activity

BeWo 細胞と JEG-3 細胞を用いて, PKC kinase activity assay kit で PKC の活性化を測定した。サンプルはタンパク分解酵素阻害剤を含有した lysis buffer で回収し, 分析まで -80°C で保存した。

### **【結果】**

#### コントロール群と高血糖群における BeWo 細胞と JEG3 細胞の s-Flt1, PlGF 及び VEGF の mRNA の発現

ヒト絨毛癌由来細胞 (BeWo, JEG-3) を用いて, コントロール群及び高血糖群の条件下で各々 6 時間, 24 時間培養を行い, Real time PCR 法によって, sFlt-1, PlGF 及び VEGF の mRNA の発現を検討した。6 時間培養のコントロール群と高血糖群の比較においては有意差を認めなかったが, 24 時間培養においては sFlt-1, PlGF 及び VEGF のいずれもコントロール群に比較し, 高血糖群で有意な増加を認めた。

#### コントロール群と高血糖群における BeWo 細胞と JEG3 細胞の s-Flt1, PlGF 及び VEGF の発現

ヒト絨毛癌由来細胞 (BeWo, JEG-3) を用いて, コントロール群及び高血糖群の条件下で各々 6 時間, 24 時間培養を行い, ELISA 法によって, sFlt-1, PlGF 及び VEGF の発現を検討した。6 時間培養のコントロール群と高血糖群の比較においては差を認めなかったが, 24 時間培養においては sFlt-1, PlGF 及び VEGF のいずれもコントロール群に比較し, 高血糖群で増加を認めた。

#### コントロール群と高血糖群における BeWo 細胞と JEG3 細胞の PKC の活性化

ヒト絨毛癌由来細胞 (BeWo, JEG3) を用いて, コントロール群及び高血糖群の条件下で各々 6 時間, 24 時間培養を行い, ELISA 法を用いて PKC の活性を検討した。6 時間培養の CG 群と HG 群の比較においては有意差を認めなかったが, 24 時間培養においては CG 群に比較し, HG 群で有意な増加を認めた。

さらに, 200nM の PKC $\beta$  阻害剤を投与し, sFlt-1, PlGF 及び VEGF の mRNA の発現を検討した結果, それらの発現の増加を抑制することが可能であった。

#### コントロール群と高血糖群における BeWo 細胞と JEG3 細胞の HIF-1 $\alpha$ の発現

ヒト絨毛癌由来細胞 (BeWo, JEG3) を用いて, コントロール群及び高血糖群の条件下で各々 6 時間, 24 時間培養を行い, Real time PCR 法を用いて HIF-1 $\alpha$  の mRNA の発現を検討した。HIF-1 $\alpha$  の mRNA での発現に関しても高血糖群で有意な上昇を認め, 200nM の PKC $\beta$  阻害剤の投与を行うことにより, HIF-1 $\alpha$  の発現の有意な上昇を抑制することが可能であった。

さらに 20nM の HIF-1 $\alpha$  阻害剤を投与し, HIF-1 $\alpha$ , sFlt-1, PlGF 及び VEGF の mRNA level での発現を検討した結果, それらの発現を抑制することが可能であった。

#### コントロール群と高血糖群における HRT8-SVneo 細胞の s-Flt1, PlGF, VEGF 及び HIF-1 $\alpha$ の mRNA の発現

不死化絨毛外トロフォブラストである HRT8-SVneo を用いてコントロール群及び高血糖群の条件下で 24 時間培養を行い, Real time PCR 法によって, sFlt-1, PlGF, VEGF 及び HIF-1 $\alpha$  の mRNA の発現を検討した。sFlt-1, PlGF, VEGF 及び HIF-1 $\alpha$  のいずれもコントロール群に比較し, 高血糖群で有意な増加を認めた。

### **【考察】**

本研究において, 高血糖群において sFlt-1, PlGF, VEGF の発現は有意な上昇を示した。また, 高血糖群において PKC の活性値は上昇しており, PKC $\beta$  阻害剤を投与することにより, 高血糖群における sFlt-1, PlGF, VEGF の有意な上昇を抑制することが可能であった。さらに, 高血糖群において HIF-1 $\alpha$  の発現も有意に上昇しており, PKC 阻害剤を投与することにより有意な上昇を抑制することが可能であった。また, HIF-1 $\alpha$  阻害剤を投与することにより, 高血糖群における sFlt-1, PlGF, VEGF の有意な上昇を

抑制することが可能であった。

妊娠高血圧腎症の病態は Roberts JM らが提唱した two-stage disorder theory によって明らかとなりつつある。その発症には HIF-1 $\alpha$  の産生の増加や sFlt-1 や soluble endoglin (sEng) のような抗血管新生因子の産生が深く関与していると考えられている。妊娠高血圧腎症では sFlt-1 のような抗血管新生因子は上昇しており、PlGF のような血管新生因子は低下しており、VEGF に関しては減少しているとの報告や上昇しているとの報告があり、一定の見解は得られていない。これらの抗血管新生因子と血管新生因子の不均衡が発症において重要であり、その妊娠高血圧腎症における多彩な臨床像の原因と考えられている。本研究においては、高血糖条件下における絨毛癌細胞において HIF-1 $\alpha$ 、sFlt-1、PlGF 及び VEGF いずれも上昇を認めた。糖代謝異常を合併した妊婦における胎盤では、大型で絨毛間腔が狭い Immature villi や dysmature villi が増加し、末梢絨毛での虚脱絨毛、虚血性病変が生じ、その結果として、絨毛内の低酸素状態の持続による新生血管や chorangiogenesis が認められるようになる。これらの胎盤における虚血性変化や血管新生を合併すると母体の血圧の上昇や胎児の FGR を合併するとされており、妊娠高血圧腎症を発症した胎盤と同様の病理所見とされている。すなわち、高血糖に暴露した絨毛細胞においても低酸素誘導因子の上昇や抗血管新生因子の産生の増加が想定され、本研究において高血糖条件下の絨毛細胞における HIF-1 $\alpha$  の産生が増加し、抗血管新生因子である sFlt-1 の産生の増加を認めた。妊娠初期の螺旋動脈のリモデリング不全によって引き起こされる妊娠高血圧腎症では PlGF は低値であることが報告されているが、これまでに我々は妊娠高血圧腎症を発症した妊婦における非肥満群に比較し、肥満群では sFlt-1 は比較的に低値であり、PlGF は高値であり、肥満など有するインスリン抵抗性高い妊婦ではその妊娠高血圧腎症の病態が異なることについて報告した。本研究においても、高血糖条件下で PlGF や VEGF も産生の増加を認め、抗血管新生因子と同様に上昇していた。すなわち、高血糖条件下における胎盤では低酸素誘導因子や sFlt-1 と共に PlGF や VEGF も産生が増加しており、糖代謝異常合併妊娠や肥満などのインスリン抵抗性の高い妊婦における妊娠高血圧腎症は、妊娠初期の螺旋動脈のリモデリング不全による妊娠高血圧腎症とは病態が異なる可能性が示唆された。

これまでの研究において、高血糖によって引き起こされる PKC の活性化が網膜や腎臓、心臓血管組織における血管の異常に関連していることは確認されている。PKC は MAPK や NF- $\kappa$ B や NADPH oxidase を活性化させることが報告されており、MAPK は PI3K-Akt pathway や mTOR pathway を介して、また、NF- $\kappa$ B は低酸素誘導因子の産生を増加させる。すなわち、高血糖条件下の絨毛細胞における PKC の活性化はこれらの経路を介して、HIF-1 $\alpha$  を増加させ、抗血管新生因子や血管新生因子を増加させ、異常な血管新生を引き起こしていると考えられる。本研究において、我々は高血糖条件下において PKC の活性化、HIF-1 $\alpha$  の増加を証明し、さらには血管新生因子や抗血管新生因子の産生の増加を証明した。また、PKC の活性化や HIF-1 $\alpha$  を抑制することで血管新生因子や抗血管新生因子の産生を抑制できることを明らかとした。これはすなわち、糖代謝異常合併妊娠やインスリン抵抗性の高い肥満妊婦などにおける胎盤の血管病変を制御できる可能性を示しており、将来的にはこれらの患者の妊娠高血圧腎症の発症を制御、予防できる可能性を示唆している。

## 【結論】

高血糖条件下のヒト絨毛癌由来細胞における PKC $\beta$  及び HIF-1 $\alpha$  は胎盤の血管新生因子や抗血管新生因子の発現に関与している。PKC $\beta$  阻害剤の投与により、HIF-1 $\alpha$  及び sFlt-1、PlGF、VEGF の発現を抑制でき、妊娠中の糖代謝異常における妊娠高血圧腎症の発症を予防できる可能性が示唆された。