



Changes in Proliferative Potential, Apoptosis and Bcl-2 Protein Expression in Cytotrophoblasts and Syncytiotrophoblast in Human Placenta over the Course of Pregnancy

石原, 尚徳

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-12-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2201

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002201>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【70】

氏名・(本籍) 石原 尚徳 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博い第1308号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成12年12月31日

【学位論文題目】

Changes in Proliferative Potential, Apoptosis and Bcl-2Protein Expression in Cytotrophoblasts and Syncytiotrophoblast in Human Placenta over the Course of Pregnancy

(妊娠各期ヒト胎盤の細胞性栄養膜細胞ならびに合体栄養膜細胞における増殖能, アポトーシス, Bcl-2 蛋白発現の解析)

審査委員

主査 教授 丸尾 猛

教授 尾原 秀史 教授 伊藤 宏

ヒト胎盤絨毛性栄養膜細胞には細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast; C細胞) と合胞体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast; S細胞) の2種類がある。着床後、旺盛な増殖能を有する単核のC細胞は融合により多核のS細胞に形態的ならびに機能的分化をとげる。以後、S細胞は妊娠の維持に中心的役割を果たすが、もはや増殖能を有さないことから、S細胞にはアポトーシスを回避する機構の存在することが推察される。そこで本研究ではアポトーシス抑制遺伝子 bcl-2 に着目し、妊娠各期ヒト胎盤絨毛性栄養膜細胞における増殖能、アポトーシス、Bcl-2 蛋白発現の変化をC細胞とS細胞に分けて検討した。

<対象ならびに方法>

対象は合併症を有さない正常妊娠症例 24 例で、妊娠 4・5 週の極初期 6 例、7 週から 9 週の初期妊娠 6 例、19 週から 21 週の中期妊娠 5 例、38 週から 40 週の末期妊娠 7 例である。絨毛組織に肉眼的梗塞、石灰化、血腫を認めるものは除外した。得られた絨毛組織は直ちに 4% 中性ホルマリン溶液で固定し、脱水後パラフィン抱埋した。4 μ m の薄切片を作成し、脱パラフィン後、以下の組織学的検討に供した。絨毛組織における proliferating cell nuclear antigen (PCNA) と Bcl-2 蛋白の発現はアビジン/ビオチン免疫ペルオキシダーゼ法を用いて免疫組織学的に検討した。他方、アポトーシスの発現は TUNEL 法により調べた。TUNEL 法はアポトーシスの過程で切断された DNA の 3'-OH 末端に terminal deoxynucleotidyl transferase が特異的に結合し polydeoxynucleotide polymer を合成する反応を利用したものである。また、走査電子顕微鏡を用いて絨毛性栄養膜細胞におけるアポトーシス発現を観察した。PCNA 陽性率とアポトーシス陽性率は妊娠極初期、初期、中期、末期における C 細胞核と S 細胞核 1000 個当りの陽性率としてそれぞれ算出し、統計学的解析を行った。有意差検定は $P < 0.05$ とした。

<結果>

妊娠各期絨毛性栄養膜細胞の PCNA 発現を免疫組織学的に検討すると、PCNA は C 細胞の核に局在しており、その発現は妊娠 4・5 週の極初期に最も強く認められ、7 週から 9 週の初期、19 週から 21 週の中期では減弱し、38 週から 40 週の末期で最も低下した。全妊娠期間中、S 細胞に PCNA 発現は認められなかった。妊娠各期 C 細胞の PCNA 陽性率は妊娠 4・5 週の極初期では初期、中期、末期に比してそれぞれ $P < 0.001$ で有意に高く、妊娠初期は中期、末期に比してそれぞれ $P < 0.02$ 、 $P < 0.001$ で有意に高く、妊娠中期は末期に比して $P < 0.005$ で有意に高かった。

妊娠各期絨毛性栄養膜細胞の Bcl-2 蛋白発現を免疫組織学的に検討すると、Bcl-2 蛋白は S 細胞の細胞質に局在しており、その発現レベルは妊娠 4・5 週

の極初期に最も弱く、初期、中期でやや増強し、末期に最も強いことが観察された。

妊娠各期絨毛性栄養膜細胞のアポトーシス発現を TUNEL 法で検討したところ、TUNEL 陽性反応は C 細胞核と S 細胞核の両方において認められた。その発現は妊娠極初期に最も強く認められ、初期、中期と減弱し、末期で最も低下した。妊娠 5 週の絨毛組織を走査電子顕微鏡で検討すると、絨毛性栄養膜細胞にアポトーシス核の形成を認めた。TUNEL 法により妊娠各期 C 細胞のアポトーシス陽性率を検討したところ、妊娠 4・5 週の極初期は初期、中期、末期に比して有意にアポトーシス陽性率は高く ($P<0.001$)、また初期は中期に比して ($P<0.05$)、末期は中期に比して ($P<0.05$) アポトーシス陽性率は有意に高かった。一方、妊娠各期 S 細胞のアポトーシス陽性率は、妊娠初期、中期、末期に比して妊娠極初期で有意に高く ($P<0.001$)、初期、中期、末期の S 細胞のアポトーシス陽性率に有意差は認められなかった。

<考察>

PCNA は DNA ポリメラーゼ・デルタの補助蛋白として機能する非ヒストン核蛋白であり、その発現は細胞周期の G1 後期から認められ、S 期に最も強くなるが、休止期細胞には認められない。本研究において PCNA 発現は C 細胞の核に観察され、その陽性率は妊娠 4・5 週の極初期に最も高く、7 週以降は妊娠経過とともに有意に低下した。これまで絨毛細胞の増殖能に関連して妊娠 4・5 週の極初期 C 細胞に EGF や EGF 受容体、IGF や IGF 受容体の強い発現が認められたこと、また *in vitro* 培養系において EGF や IGF が妊娠 4・5 週の C 細胞の増殖能を刺激することが報告されている。また、*c-myc* 蛋白発現は妊娠初期の C 細胞核に認められ、末期には認められないことから細胞成長因子や癌遺伝子が妊娠極初期から初期の C 細胞増殖能に関与していることが示唆されており、今回の我々の成績もこれらに一致した。

bcl-2 遺伝子はヒト濾胞性リンパ腫の染色体転座点近傍から発見された癌遺伝子で、ミトコンドリア内膜や核膜に局在する 26kDa の蛋白質をコードしている。*Bcl-2* 蛋白は様々な細胞でアポトーシスを抑制することが報告されている。今回、我々は *Bcl-2* 蛋白が S 細胞の細胞質に局在しており、その発現レベルは妊娠 4・5 週の極初期に最も弱く、初期、中期に増強し、末期に最も強くなることを示した。このことから *Bcl-2* 蛋白はより分化した S 細胞において、その細胞死を抑制することにより妊娠の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

アポトーシスは細胞死の一形態であるが、光学的ならびに電子顕微鏡的な構造的変化の観察によりネクローシスとは区別されうる。さらに、細胞構造の観察と TUNEL 法を組み合わせることでアポトーシスとネクローシスをより明確に区別できる。我々は電子顕微鏡レベルで妊娠 5 週の絨毛性栄養膜細

胞にアポトーシス特有の超微細構造的形態の核を認めた。これまで絨毛細胞のアポトーシス発現に関する報告は散見されるが、妊娠4・5週の極初期も含めて妊娠各期絨毛細胞のアポトーシス発現をC細胞とS細胞に分けて検討した成績は皆無である。TUNEL法を用いたC細胞のアポトーシス陽性率の検討では、妊娠4・5週の極初期にその陽性率は最も高く、その後は妊娠経過とともに減少を示した。しかし妊娠末期のアポトーシス陽性率は中期に比して有意に高かった。妊娠末期のC細胞でアポトーシス陽性率が増加したことは、胎盤の老化もしくは分娩に関連した生物学的変化である可能性が示唆された。一方、S細胞のアポトーシス陽性率は妊娠極初期にのみ有意に高く、妊娠7週以降の初期、中期、末期には著しく低下した。妊娠4・5週の極初期に絨毛性栄養膜細胞であるC細胞ならびにS細胞にアポトーシス発現が著明に観察された。このことは妊娠4・5週の極初期が胎盤絨毛形成の臨界期であることを示していると考えられる。

結論として、妊娠4・5週の極初期胎盤絨毛はC細胞の高い増殖活性とC細胞ならびにS細胞の高いアポトーシス発現に特徴付けられる。そして妊娠7週以後、C細胞の増殖能とアポトーシス発現およびS細胞のアポトーシス発現は著明に減少した。末期胎盤絨毛ではS細胞におけるBcl-2蛋白の発現が強く、アポトーシス陽性率が低いことから、分化したS細胞ではBcl-2蛋白によるアポトーシス抑制機構の存在が推察された。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|------------|--|-----|------|
| 受付番号 | 甲 第 1309 号 | 氏 名 | 石原尚徳 |
| 論文題目 | <p>Changes in Proliferative Potential, Apoptosis and Bcl-2 Protein Expression in Cytotrophoblasts and Syncytiotrophoblast in Human Placenta over the Course of Pregnancy</p> <p>妊娠各期ヒト胎盤の細胞性栄養膜細胞ならびに合体体栄養膜細胞における増殖能、アポトーシス、Bcl-2蛋白発現の解析</p> | | |
| 審査委員 | <p>主 査 丸 尾 猛</p> <p>副 査 尾 原 秀 史</p> <p>副 査 伊 東 宏</p> | | |
| 審査終了日 | 平成 12 年 12 月 5 日 | | |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

ヒト胎盤絨毛性栄養膜細胞には細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast; C細胞) と合胞体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast; S細胞) の2種類がある。着床後、旺盛な増殖能を有する単核のC細胞は融合により多核のS細胞に形態的ならびに機能的分化をとげる。以後、S細胞は妊娠の維持に中心的役割を果たすが、もはや増殖能を有さないことから、S細胞にはアポトーシスを回避する機構の存在することが推察される。そこで本研究ではアポトーシス抑制遺伝子 bcl-2 に着目し、妊娠各期ヒト胎盤絨毛性栄養膜細胞における増殖能、アポトーシス、Bcl-2 蛋白発現の変化をC細胞とS細胞に分けて検討した。

対象は合併症を有さない正常妊娠症例 24 例で、妊娠 4・5 週の極初期 6 例、7 週から 9 週の初期妊娠 6 例、19 週から 21 週の中期妊娠 5 例、38 週から 40 週の末期妊娠 7 例である。絨毛組織における PCNA と Bcl-2 蛋白の発現は ABC 法を用いて免疫組織学的に検討した。他方、アポトーシスの発現は TUNEL 法により調べた。また、走査電子顕微鏡を用いて絨毛性栄養膜細胞におけるアポトーシス発現を観察した。PCNA 陽性率とアポトーシス陽性率は妊娠極初期、初期、中期、末期における C 細胞核と S 細胞核 1000 個当りの陽性率としてそれぞれ算出し、統計学的解析を行った。

PCNA は C 細胞の核に局在し、その発現陽性率は妊娠極初期に最も高く、初期、中期では減弱し、末期で最も低下した。全妊娠期間中、S 細胞に PCNA 発現は認められなかった。Bcl-2 蛋白は S 細胞の細胞質に局在し、その発現レベルは妊娠極初期に最も弱く、初期、中期でやや増強し、末期に最も強いことが観察された。アポトーシスは C 細胞核と S 細胞核の両方において認められ、その発現は妊娠極初期に最も強く、初期、中期と減弱し、末期で最も低下した。妊娠 5 週の絨毛組織を走査電子顕微鏡で検討すると、絨毛性栄養膜細胞にアポトーシス核の形成を認めた。C 細胞のアポトーシス陽性率の検討では、妊娠 4・5 週の極初期は初期、中期、末期に比して有意に高く、また末期は中期に比して有意に高いことを認めた。一方、S 細胞のアポトーシス陽性率は、妊娠初期、中期、末期に比して妊娠極初期で有意に高く、初期、中期、末期では有意な差は認められなかった。

これまで EGF や EGF 受容体、IGF や IGF 受容体、c-myc 蛋白などの細胞成長因子や癌遺伝子が妊娠極初期から初期の C 細胞増殖能に関与していることが示唆されている。bcl-2 遺伝子はミトコンドリア内膜や核膜に局在し、様々な細胞でアポトーシスを抑制することが報告されている。今回、我々の示した結果より、Bcl-2 蛋白は S 細胞の細胞死を抑制することにより妊娠の維持に重要な役割を果たすことが示唆される。

アポトーシスは細胞死の一形態である。これまでに妊娠 4・5 週の極初期も含めて妊娠各期絨毛細胞のアポトーシス発現を C 細胞と S 細胞に分けて検討した成績は皆無である。本研究では、妊娠 4・5 週の妊娠極初期胎盤の絨毛性栄

養膜細胞であるC細胞ならびにS細胞にアポトーシス発現が著明に観察された。このことは妊娠6週が胎盤絨毛形成の臨界期であることを示唆している。また、妊娠末期のC細胞でアポトーシス陽性率が増加したことは、胎盤の老化もしくは分娩に関連した生物学的変化であると推察される。

以上のごとく、妊娠4・5週の極初期胎盤絨毛ではC細胞の高い増殖能とC細胞ならびにS細胞の高いアポトーシス発現に特徴付けられることが明らかとなった。妊娠7週以後、C細胞の増殖能とアポトーシス発現とS細胞のアポトーシス発現は著明に減少するが、これに付合して末期胎盤絨毛ではS細胞におけるBcl-2蛋白の発現が最強となることを認め、分化したS細胞でのBcl-2蛋白発現が胎盤でのアポトーシス抑制機構の中で重要な役割を果たすことが明らかとなった。

本研究は妊娠各期のヒト胎盤絨毛性栄養膜細胞における増殖能、アポトーシスとBcl-2蛋白発現を検討し、合胞体栄養膜細胞でのBcl-2蛋白発現が、胎盤でのアポトーシス抑制機構の中で重要な役割を果たしていることを初めて明らかにしたものであり、従来ほとんど知られていなかった妊娠維持機構の分子メカニズムの一端を解明したものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。