

京都大学	博士（医学）	氏 名	堀江 昭史
論文題目	Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation（Laeverin/アミノペプチダーゼ Q はヒトの初期胎盤形成期において栄養膜細胞の浸潤を促進させる）		
背景: ヒトの胎盤形成において胚由来の絨毛外栄養膜細胞（EVT）は母体の免疫系から拒絶されることなく母体脱落膜組織に浸潤し、子宮のらせん動脈を再構築するが、その浸潤制御機序はいまだ不明な点が多い。そこで我々は新しい知見を得る目的で、EVT を含むヒトの卵膜を免疫源としてモノクローナル抗体を作成した。作成した抗体の一つが認識する抗原を胎盤から精製し、全アミノ酸配列を同定したところ精製抗原は新規の細胞膜結合型 aminopeptidase であることが判明し、ヒト絨毛膜（chorion laeve）由来の新規蛋白であることより laeverin/aminopeptidase Q と命名した。胎盤での laeverin（LVRN）の発現は EVT に特異的であり、さらに通常の peptidase と異なり胎盤以外の組織には観察されず、LVRN が EVT の重要な機能に関与している可能性が推察された。そこで LVRN の分子学的特徴の解析およびヒト EVT に対する生理学的な役割をさらに解明することを目的として本研究を行った。 方法: 本学内倫理委員会の承認のもと患者の同意を得て、ヒト妊娠初期および後期の胎盤組織を採取したのち、妊娠初期の絨毛組織からはさらに EVT 培養細胞を分離して以下の実験に供した。 まず採取した組織および細胞、また陰性コントロールとしてヒト絨毛癌由来の細胞株である BeWo 細胞における LVRN の mRNA 発現を RT-PCR 法により検索した。続いて胎盤組織における LVRN 蛋白の発現を免疫染色法で観察した。またウェスタンブロット法で胎盤組織内の LVRN の isotype を含めた分子量を同定した。 続いて絨毛組織の器官培養系で増殖後に遊走してくる EVT 細胞での LVRN 発現を免疫染色法で観察した。次に LVRN 遺伝子に特異的に作用する siRNA を作成して EVT 細胞に導入し、細胞増殖および細胞浸潤に与える影響を検討した。さらに recombinant LVRN（r- LVRN）を作成し、EVT 培養細胞並びに BeWo 細胞に添加して同様に増殖能と浸潤能における変化を検討して EVT 機能に対する LVRN の役割を解析した。 結果: RT-PCR 法によりヒト胎盤組織および EVT 培養細胞に LVRN mRNA の発現が確認された。免疫組織染色法により LVRN 蛋白は HLA-G に一致して妊娠初期および後期胎盤組織の EVT に特異的に発現していた。胎盤組織のウェスタンブロット法で、LVRN は 130、160、200～270 kDa の 3 つのバンドとして検出された。そこでさらに N 結合型の糖鎖の酵素切断処理を行ったところ、胎盤由来 LVRN は 115 kDa の単一バンドに収束し、LVRN が N 結合型の糖鎖修飾を受けていることが示された。 一方で、器官培養系では増殖して遊走する EVT に LVRN 蛋白の発現が観察さ			

れ、さらに flow cytometry 法により HLA-G 陽性の EVT 細胞の約 40%において細胞表面への LVRN 発現が示された。また LVRN の siRNA 導入により、EVT 細胞の増殖能には変化はみられなかったものの、細胞の遊走能が有意に抑制された。一方で r- LVRN の添加により、EVT 培養細胞の遊走は促進されることが示され、また BeWo 細胞においても同様の作用が観察された。
結論: 以上の結果から LVRN は N 結合型糖鎖を有する糖蛋白であり、ヒト胎盤形成期に妊娠初期絨毛から遊走する EVT の細胞表面に特異的に発現が誘導されることが示され、さらに EVT の母体組織内への遊走を促進している可能性が提示された。
（論文審査の結果の要旨） 本論文では、申請者らがヒト絨毛外栄養膜細胞（EVT）に特異的に発現する分子として同定した新規の膜結合型ペプチダーゼ laeverin（LVRN）について、その分子学的特徴および生理的役割に関して新たに得た知見を報告している。 まず申請者らは胎盤組織を用いた免疫組織染色を施行し、LVRN 蛋白が妊娠全期にわたって EVT に限局して発現することを観察した。続いてウェスタンブロット法で LVRN を 3 つのバンドとして検出し、さらに糖鎖切断処理にて LVRN が単一バンドに収束することを示して糖鎖の存在を実証した。次に絨毛器官培養から分化・遊走してくる EVT に LVRN が発現誘導されること、さらにその発現部位が細胞表面であることを観察した。以上の知見を得た後、LVRN 特異的 siRNA を遺伝子導入して EVT の機能変化を検討し、EVT の遊走能が抑制されることを示し、一方で申請者らが作成したリコンビナント LVRN の添加培養にて EVT および LVRN を発現しない絨毛癌細胞株 BeWo 細胞の遊走能が増強されることを確認した。以上の結果より、LVRN が EVT の特異的な分化関連分子であり、その機能の一つとして母体組織内での EVT の遊走を促進している可能性を提示した。
上の研究はヒト胎盤形成における EVT の機能の解明に貢献し、周産期医療の進歩に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 3 月 1 日 実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日 以降