

流速シェアストレスで起こる栄養膜細胞の分化・融合におけるプロゲステロン受容体膜構成因子1の役割

津留 涼也¹⁾, 吉江 幹浩¹⁾, 森岡 和大²⁾, 東海林 敦²⁾, 草間 和哉¹⁾, 柳田 顕郎²⁾, 田村 和広¹⁾

1) 東京薬科大学薬学部 内分泌薬理学教室

2) 東京薬科大学薬学部 生体分析化学教室

はじめに

胎盤は、胎児成長に必須な栄養、酸素の供給やホルモン産生を担う。胎盤を構成する絨毛は、その内側に存在する単核の細胞性栄養膜細胞 (cytotrophoblast; CTB) と CTB が分化・融合した多核の合胞体栄養膜細胞 (syncytiotrophoblast; STB) の2つの層で形成されている (図1左)。STB からは、妊娠維持に関わるプロゲステロン (P4) やヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) が産生される。CTB から STB への分化・融合異常は、妊娠高血圧症候群や胎児発育不全の原因となる。In vitro 実験系において、cAMP 誘導体およびアデニル酸シクラーゼの活性化薬フォルスコリン (FSK) の処置により、STB への細胞融合および hCG と P4 の産生を誘導することが可能である。

絨毛は、胎盤の絨毛間腔にて母体血中に浮遊しており、母体血流による流速シェアストレス (flow shear stress; FSS) に常に曝されている。近年、FSS がメカノセンサーである transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 (TRPV6) を活性化し、AKT シグナルの活性化や細胞骨格関連タンパク質のエズリンがリン酸化されることで STB 細胞表面の微絨毛を形成することが示されている¹⁾。この微絨毛には、グルコーストランスポーターが発現しており、胎児の成長に関与するグルコースの吸収を促進する。

P4 は、子宮や卵巣において生殖機能に必須のホルモンであり、主に核内の古典的 P4 受容体を介したゲノミック作用を発揮する。この P4 受容体とは異なり細胞膜に存在し、ノンゲノミックな作用を示す非古典的 P4 受容体も知られている。その一つがプロゲステロン受容体膜構成因子1 (progesterone receptor membrane component 1; PGRMC1) であり、P4 に親和性を示す膜型 P

4 受容体として同定された²⁾。PGRMC1 は、さまざまながん組織で高発現しており、がん細胞の増殖^{3,4)}や化学療法薬に対する耐性獲得に関与している^{5,6)}。また、子宮特異的 PGRMC1 欠損マウスは、妊娠能が低いことから、PGRMC1 と生殖機能との関連性が重要視されている⁷⁾。

われわれは、以前にヒト妊娠初期絨毛において PGRMC1 の発現が CTB に比べ分化・融合した STB で低いこと、ヒト栄養膜細胞株 (BeWo) において分化・融合に伴いベルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ) を介して PGRMC1 発現レベルが減少すること、さらにこの PGRMC1 発現の減少は、cAMP 誘導体処置による hCG 分泌と細胞融合を促進することを明らかにした⁸⁾ (図1右)。また、妊娠高血圧症候群および胎児発育不全併発胎盤において対照胎盤と比較して PGRMC1 発現が高いことが分かった⁸⁾。しかしながら、シェアストレス環境下での PGRMC1 の役割は不明である。そこで、胎盤内での母体血流シェアストレスを模倣した流速シェアストレス負荷下での栄養膜細胞の分化・融合・微絨毛形成における PGRMC1 の役割についてマイクロ流体デバイスを用いて調べた。

シェアストレスで誘導される微絨毛形成に対する PGRMC1 ノックダウンの効果

まず、母体血流によるシェアストレスを再現するため、マイクロ流体デバイスを作製した。本デバイスは、3D プリンターで作成した鋳型に、ポリジメチルシロキサンを流し込み、細胞培養部位にコラーゲンビトリゲル膜を敷き、成形した。BeWo 細胞をデバイス中心に播種した後、流入用の穴から培養液を灌流することで母体血流が細胞に与えるシェアストレスを再現した (図2A)。

FSS による微絨毛形成を観察するため、微絨毛を構成するエズリンを指標とした免疫蛍光染色を行った。FSS を負荷していない静的条件下 (Static) においてコントロール siRNA を導入した細胞では、線状の形態を持つ微絨毛は観察されなかった。これに対して、低 FSS

連絡先: 津留涼也 東京薬科大学薬学部内分泌薬理学教室
〒192-392 東京都八王子市堀之内1432-1
TEL : 042-676-4530
FAX : 042-676-4529
E-mail : tsuru@toyaku.ac.jp

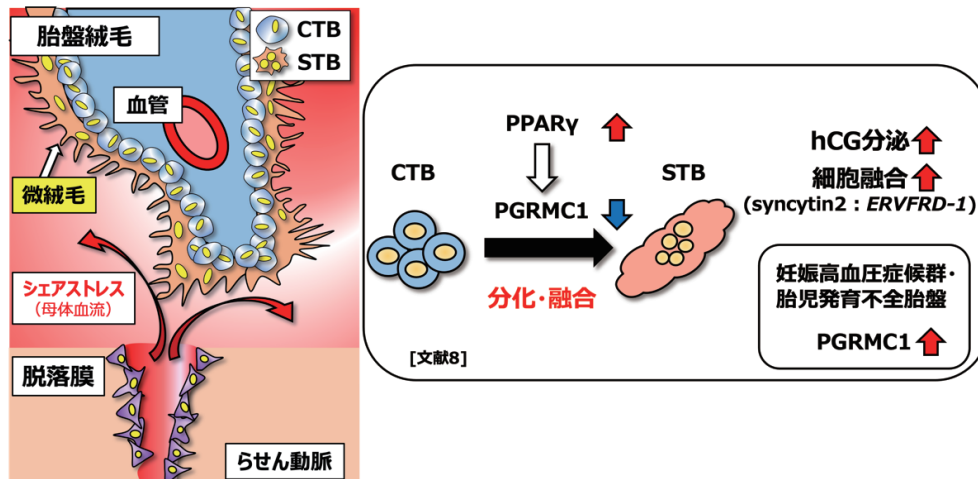


図1 ヒト胎盤栄養膜細胞の分化・融合・微絨毛形成の関係と栄養膜細胞における PGRMC1 の役割

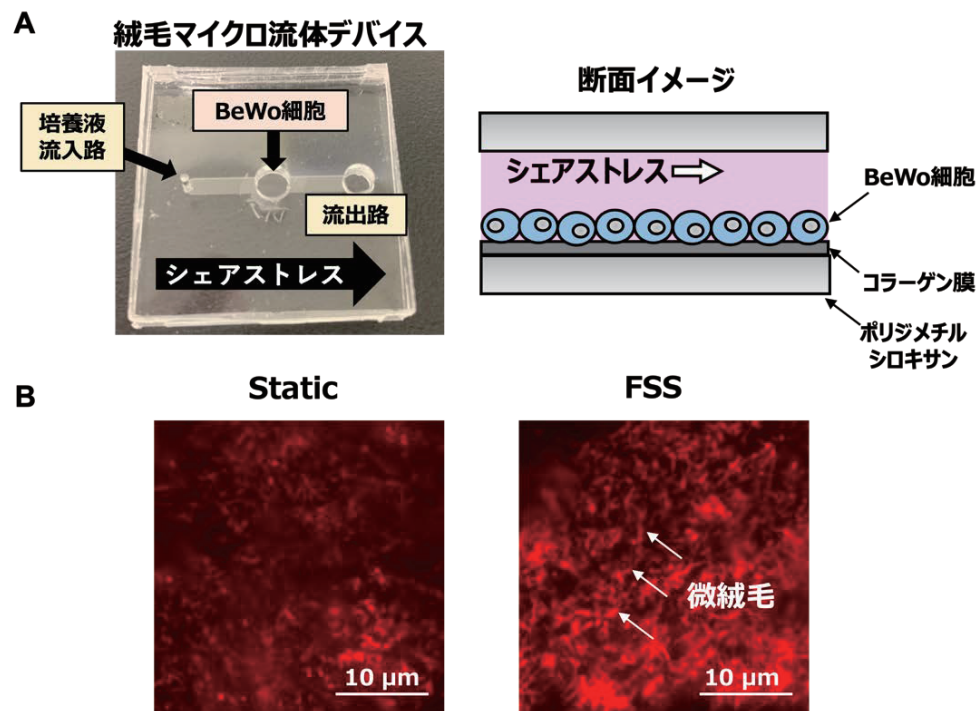


図2 シェアストレス誘導性の微絨毛形成に対する PGRMC1 ノックダウンの効果

マイクロ流体デバイス上で培養した BeWo 細胞にシェアストレス (FSS : 1.1 $\mu\text{L}/\text{min}$) を 1 時間負荷し、抗エズリン抗体を用いた免疫蛍光染色にて微絨毛を観察した。

(A) 絨毛マイクロ流体デバイス像および断面イメージ図

(B) 微絨毛形成に対するシェアストレスの効果

(1.1 $\mu\text{L}/\text{分}$: 0.01 dyn/cm^2 , 図 2 B) もしくは 高 FSS (5.3 $\mu\text{L}/\text{分}$: 0.05 dyn/cm^2) の負荷により微絨毛が形成された。siRNA により、PGRMC1 発現をノックダウンした細胞では、低 FSS および高 FSS 曝露下で起こる微絨毛形成が抑制された。

シェアストレスによる分化・融合に対する PGRMC1 ノックダウンの効果

栄養膜細胞におけるシェアストレス負荷は、微絨毛形成だけでなく STB への分化を促進させることも報告されている⁹⁾。そこで、FSS 負荷環境での分化・融合に及ぼす PGRMC1 ノックダウンの効果について検証した。Static と比較して FSS は、分化マーカーである hCG サ

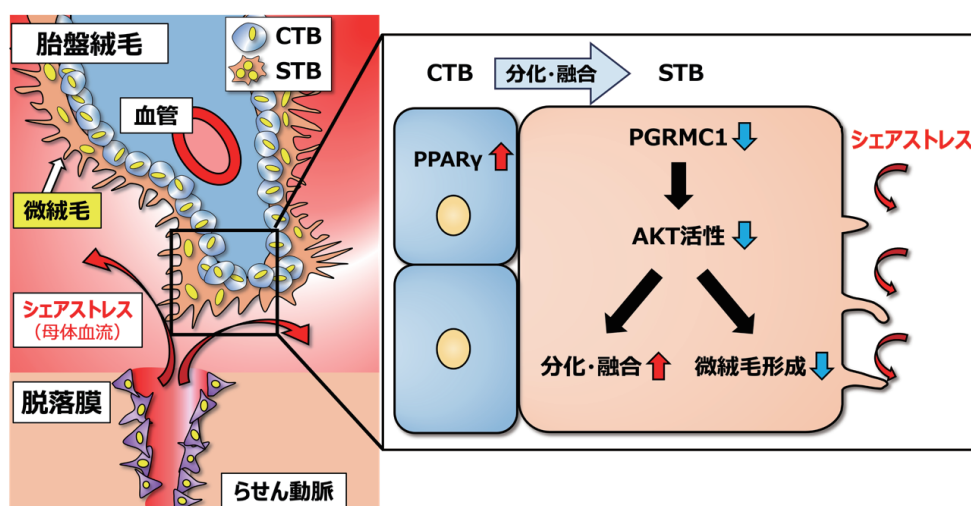


図3 PGRMC1発現低下による栄養膜細胞の分化・融合と微絨毛形成の変化

ブユニットをコードする *CGA* および *CGB* 発現を上昇させた。PGRMC1 ノックダウン細胞では、FSS 下での *CGA* および *CGB* 発現をさらに上昇させた。また、FSS は細胞融合マーカー *syncytin2* をコードする *ERVFRD-1* の発現も上昇させ、PGRMC1 ノックダウン細胞では、その発現がさらに増加する傾向にあった。

次に、シェアストレスとともに栄養膜細胞の分化・融合刺激薬である、FSK を処置した。Static と比較して FSS では、FSK による *CGA*、*CGB* および *ERVFRD-1* 発現の増加が顕著であった。この FSS および FSK 処置下において、分化・融合マーカーの発現に対する PGRMC1 ノックダウンの効果について調べた。PGRMC1 ノックダウンは、FSS および FSK により誘導される *CGA*、*CGB* および *ERVFRD-1* 発現をさらに上昇させた。

シェアストレスによる AKT の活性化に及ぼす PGRMC1 ノックダウンの効果

FSS による微絨毛形成には、AKT シグナルの活性化が必要である¹⁾。そこで、FSS 下での AKT 活性化（リン酸化）に及ぼす PGRMC1 ノックダウンの効果について調べた。FSS は、AKT のリン酸化レベルを上昇させた。PGRMC1 ノックダウン細胞では、この FSS により誘導される AKT リン酸化レベルが減弱した。なお、AKT 阻害薬 (LY294002) は、FSS 下での微絨毛形成を抑制することを確認した。一方、LY294002 は、FSS 下での FSK 刺激による *CGA*、*CGB*、*ERVFRD-1* 発現および hCGβ 分泌を促進させた。

終わりに

栄養膜細胞における PGRMC1 ノックダウンはシェアストレスによる微絨毛形成を抑制した。PGRMC1 は胎盤内の母体血流シェアストレス環境下において AKT を介した微絨毛形成を調節し、栄養吸収に寄与することが推察された。一方、PGRMC1 ノックダウンは、シェアストレスによる栄養膜細胞の分化・融合を促進した（図3）。これらの知見は、栄養膜細胞の分化に伴う PGRMC1 発現の低下が、妊娠過程における胎盤の形成と維持に重要であることを示唆する。今後、PGRMC1 が、胎盤栄養膜細胞の分化・融合・微絨毛形成を調節する詳細な機序について解析を進めていきたい。

近年、マイクロ流体技術を用いた organ-on-a-chip によるさまざまな臓器モデルにて高次な解析が行われている。胎盤環境を模倣することができるマイクロ流体デバイスの開発・利用は、胎盤形成メカニズムや胎盤が主原因となる妊娠高血圧症候群などの妊娠関連疾患を理解する上で重要である。

謝 辞

本稿は、令和6年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した内容を主にまとめたものである。本稿を執筆する機会を与えてくださりました日本生殖内分泌学会理事長、第29回学術集会会長 寺田幸弘教授、また、本誌編集委員の先生方に感謝申し上げます。

引用文献

1. Miura S, Sato K, Kato-Negishi M, Teshima T, Takeuchi S (2015) Fluid shear triggers microvilli formation via mechanosensitive activation of TRPV6. *Nat Commun* 6, 8871.
2. Kimura I, Nakayama Y, Konishi M, Terasawa K, Ohta M, Itoh N, Fujimoto M (2012) Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins. *Curr Protein Pept Sci* 13, 687–696.
3. Ahmed IS, Rohe HJ, Twist KE, Craven RJ (2010) Pgrmc1 (progesterone receptor membrane component 1) associates with epidermal growth factor receptor and regulates erlotinib sensitivity. *J Biol Chem* 285, 24775–24782.
4. Cahill MA, Jazayeri JA, Kovacevic Z, Richardson DR (2016) PGRMC1 regulation by phosphorylation: potential new insights in controlling biological activity. *Oncotarget* 7, 50822–50827.
5. Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, Yamamoto A, Uchida T, Iwata S, Yamaguchi Y, Krayukhina E, Noda M, Handa H, Ishimori K, Uchiyama S, Kobayashi T, Suematsu M (2016) Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nat Commun* 7, 11030.
6. Thieffry C, Van Wynendaele M, Aynaci A, Maja M, Dupuis C, Lorient A, Marbaix E, Henriot P (2021) AG-205 Upregulates Enzymes Involved in Cholesterol Biosynthesis and Steroidogenesis in Human Endometrial Cells Independently of PGRMC1 and Related MAPR Proteins. *Biomolecules* 11, 1472.
7. McCallum ML, Pru CA, Niikura Y, Yee SP, Lydon JP, Peluso JJ, Pru JK (2016) Conditional Ablation of Progesterone Receptor Membrane Component 1 Results in Subfertility in the Female and Development of Endometrial Cysts. *Endocrinology* 157, 3309–3319.
8. Tsuru A, Yoshie M, Suzuki M, Mochizuki H, Kametaka S, Ohmaru-Nakanishi T, Azumi M, Kusama K, Kato K, Tamura K (2024) Downregulation of PGRMC1 accelerates differentiation and fusion of a human trophoblast cell line. *J Endocrinol* 260, e230163.
9. Inohaya A, Chigusa Y, Takakura M, Io S, Kim MA, Matsuzaka Y, Yasuda E, Ueda Y, Kawamura Y, Takamatsu S, Mogami H, Takashima Y, Mandai M, Kondoh E (2024) Shear stress in the intervillous space promotes syncytial formation of iPS cells-derived trophoblasts. *Biol Reprod* 110, 300–309.