

原 著

胎盤形成過程における線溶系因子の検討

東京女子医科大学 産婦人科学教室（主任：武田佳彦教授）

ヒラノ イクコ ナカバヤシ マサオ ヤジマ マサズミ タケダ ヨシヒコ
平野 郁子・中林 正雄・矢島 正純・武田 佳彦

（受付 平成9年8月15日）

The Study of Fibrinolytic Factors in the Process of Placentation

Ikuko HIRANO, Masao NAKABAYASHI, Masazumi YAJIMA and Yoshihiko TAKEDA

Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. Yoshihiko TAKEDA)

Tokyo Women's Medical College

It is suggested that the processes of implantation and placentation are both dependent on the invasion to the decidual tissue by trophoblasts, and fibrinolytic factors are involved with the regulation mechanisms of the invasion and placentation. We studied the localization of fibrinolytic factors (urokinase type plasminogen activator: uPA and tissue type plasminogen activator: tPA), uPA receptor (uPAR) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). The levels of uPA in decidual and villous extracts were almost same and showed no change throughout the pregnancy period. While the levels of tPA, PAI-1 and uPAR in decidual extracts of first and second-trimester placentae are higher than that of third trimester placentae. The levels of tPA, PAI-1 and uPAR in villous extracts were low and showed no change throughout the pregnancy period.

Immunohistochemical method was applied to elucidate the localization of uPA and uPAR. uPA was recognized in the cytotrophoblast cells of the 1st and 2nd trimester placenta and not recognized in the syncytiotrophoblast cells. uPAR were also recognized in the cytotrophoblast cells and extravillous trophoblast cells of the 1st and 2nd trimester placentae.

These results suggest that expression of uPA and uPAR on trophoblast may play an important role in the regulation mechanisms of the invasion and implantation of placenta.

緒 言

胎盤形成は絨毛細胞の脱落膜への侵入から始まり、この侵入機序には線溶系因子および metallo-protease などの酵素による局所の蛋白融解が関与することが示唆されているが、これらに関する報告は少ない。この機序に関わる線溶系因子として urokinase type plasminogen activator (uPA), tissue type plasminogen activator (tPA), uPA receptor (uPAR), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) および metallo-protease の関与が知られ、注目されている。

uPA は細胞表面にある uPAR に結合すると、

その酵素活性を維持すると言われ¹⁾、液相中の plasminogen を細胞表面で活性化し、plasmin を生成する。plasminogen は、細胞表面にある結合部位に結合したまま plasmin に活性化されると、細胞表面での plasmin 活性として安定化する²⁾ので、plasmin inhibitor (PI) による阻害を受けずに extracellular matrix (ECM) の構成蛋白を分解する。さらに安定化された plasmin は metallo-protease を活性化し、ECM の基質蛋白を分解していく²⁾。一方、線溶系酵素阻害因子である PAI-1 は ECM 存在下で ECM と結合し、PA の阻害反応が増強される³⁾。このように細胞近傍の周辺組

織に対し、局所的蛋白分解が活性化され、線溶系の活性化と、抑制反応がともに亢進し、これが絨毛細胞の脱落膜への浸潤につながると考えられている。

胎盤の形成には絨毛の脱落膜への侵入が必須であるが、脱落膜を越えて子宮筋層にまで浸潤することはなく正常胎盤が形成される。一方、脱落膜組織が十分に形成されない部位への着床では絨毛組織は母体側組織へ高度に侵入していき、癒着胎盤などの異常が起こることを考えると、正常な胎盤形成には脱落膜組織での線溶系因子の調節機序が働いていることが十分に考えられる。

すなわち、妊娠初期絨毛の脱落膜への侵入過程には、線溶系因子が活性化され、それにより脱落膜組織に局所的蛋白融解が起こり、絨毛の侵入が可能になっていると考える。また、脱落膜組織では絨毛の侵入が制限なく侵入しないように線溶系酵素阻害因子も活性化される。このような線溶系因子、線溶系酵素阻害因子の調節により、絨毛の脱落膜への浸潤を調節しているものと考えられる。

正常な胎盤形成過程において線溶系酵素はどのように調節されているのかを検討するため、妊娠初期、中期、後期の胎盤の絨毛、脱落膜における線溶系酵素とその受容体の測定、さらに線溶系酵素阻害因子の関与について、胎盤組織抽出液、および免疫組織化学的染色法によりそれらの変動と局在について検討した。

対象および方法

1. 対象

妊娠初期（6～11週 $n=12$ ）、中期（14～20週 $n=10$ ）、後期（39～41週 $n=10$ ）の絨毛、脱落膜を対象とした。初期、中期の胎盤組織は人工妊娠中絶術を施行した正常妊娠例より、インフォームドコンセントを得た上で対象とした。また後期の胎盤についても正常妊娠例、正常分娩例より、インフォームドコンセントを得た上で対象とした。また上記の対象から妊娠13, 17, 38週の胎盤組織を免疫染色用とした。

2. 方法

1) 組織抽出液作製法

絨毛は胎盤組織よりブロックとして採取し、肉

眼的に脈管組織を除去し、細切した。脱落膜は胎盤の母体面より肉眼的に明らかに認識可能な部分の脱落膜組織を採取し、細切した。それぞれを pH 8.5 の 0.05M phosphate buffered saline (PBS) に終濃度 1% の Triton X-100 を加え、4℃ 12 時間攪拌し、可溶化した後、4℃ 30,000G で 60 分間遠心し、得られた上清を測定検体とした。

2) 測定方法

脱落膜、絨毛の組織抽出液中の uPA, tPA は Biopool 社 (Umea, Sweden) の測定キットにより ELISA 法で、PAI-1 は Monoenzyme 社 (Horsholm, Denmark) の測定キットにより ELISA 法で、uPAR は American Diagnostica 社 (Greenwich, CT USA) の uPAR ELISA キットを用いて測定した。

3) 統計処理

結果は平均±標準誤差で示し、各群間の有意差の検定は Student's t-test を用いて行った。

4) 免疫組織化学的染色方法

妊娠13, 17, 38週の胎盤組織より採取した絨毛組織、脱落膜組織をそれぞれ10%ホルマリン固定の後、パラフィン包埋ブロックを4μmで薄切した切片を脱パラフィンし、LSAB法(Labelled Streptavidin Biotin法)によりuPA, uPAR, tPA, PAI-1を免疫染色してその局在を検討した。一次抗体はAmerican Diagnostica社(Greenwich CT USA)の抗uPAR monoclonal抗体、抗uPA monoclonal抗体、抗PAI-1抗体、抗tPA抗体を用いた。また、絨毛などの上皮組織と間質細胞である脱落膜細胞を鑑別するため、抗cytokeratin抗体を用いて免疫染色した。

結 果

1. 絨毛、脱落膜組織抽出液中の uPA 値

妊娠初期、中期、後期の各組織抽出液中の uPA 濃度を測定した (図1)。

絨毛組織抽出液中の uPA 値 (mean±SE) は、妊娠初期で 0.48 ± 0.08 、中期で 0.32 ± 0.09 、後期で 0.38 ± 0.09 ng/mg protein であり、妊娠初期に高値を示し、中期、後期にはやや減少したが有意差はなかった。

脱落膜組織抽出液中の uPA 値 (mean±SE) は、

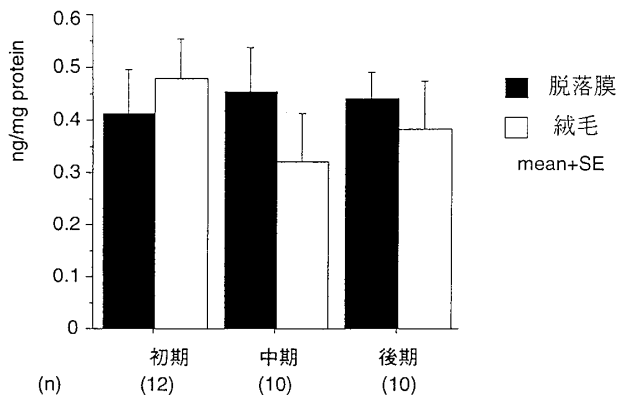


図1 絨毛, 脱落膜組織抽出液中の uPA 値

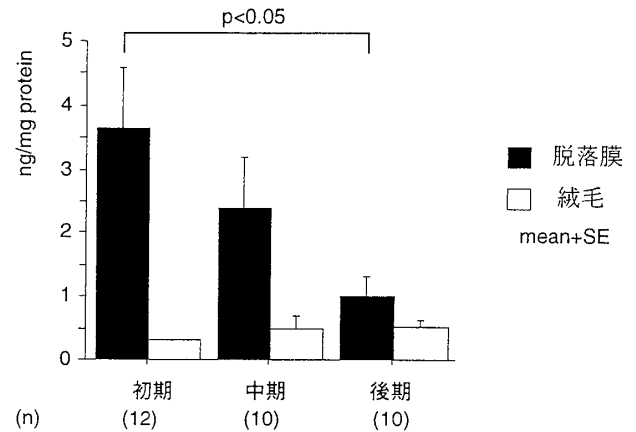


図3 絨毛, 脱落膜組織抽出液中の tPA 値

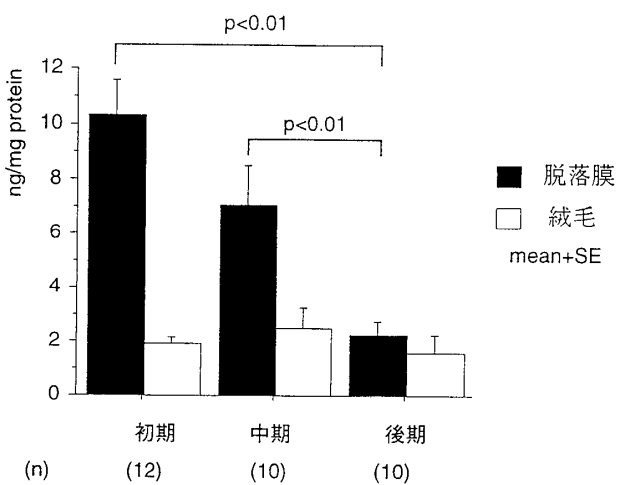


図2 絨毛, 脱落膜組織抽出液中の uPAR 値

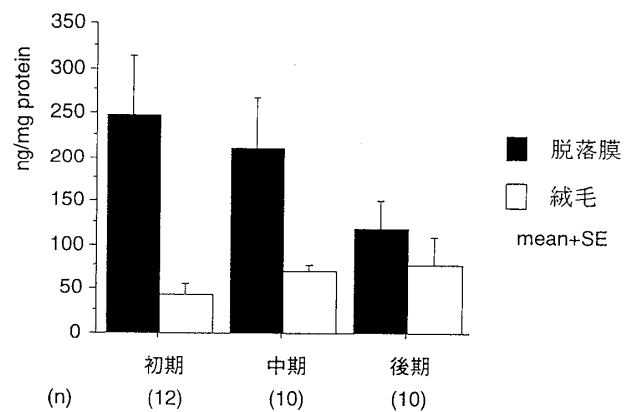


図4 絨毛, 脱落膜組織抽出液中の PAI-1値

妊娠初期で 0.41 ± 0.09 , 中期で 0.46 ± 0.08 , 後期で 0.44 ± 0.05 ng/mg protein であり, 中期にやや増加傾向を示したが有意差はなかった。

2. 絨毛, 脱落膜組織抽出液の uPAR 値

妊娠初期, 中期, 後期の各組織抽出液中の uPAR 濃度を測定した (図 2)。

絨毛組織抽出液中の uPAR 値 (mean ± SE) は, 妊娠初期で 1.89 ± 0.26 , 中期で 2.50 ± 0.74 , 後期で 1.38 ± 0.59 ng/mg protein であり, 妊娠時期による差を認めなかった。

脱落膜組織抽出液中の uPAR 値 (mean ± SE) は, 妊娠初期で 10.34 ± 1.28 , 中期で 7.10 ± 1.36 , 後期で 2.28 ± 0.43 ng/mg protein であり, uPAR は絨毛組織抽出液に比べて脱落膜組織抽出液に多く含まれ, 初期に高く後期には著減した ($p < 0.01$)。

3. 絨毛, 脱落膜組織抽出液の tPA 値

妊娠初期, 中期, 後期の各組織抽出液中の tPA 濃度を測定した (図 3)。

絨毛組織抽出液中の tPA 値 (mean ± SE) は, 妊娠初期で 0.30 ± 0.02 , 中期で 0.48 ± 0.21 , 後期で 0.54 ± 0.20 ng/mg protein であり, 妊娠時期による差はなかった。

脱落膜組織抽出液中の tPA 値 (mean ± SE) は, 妊娠初期で 3.66 ± 0.94 , 中期で 2.41 ± 0.79 , 後期で 1.01 ± 0.32 ng/mg protein であり, tPA は絨毛組織抽出液に比べて脱落膜抽出液に多く含まれ, 初期に高く, 後期に有意 ($p < 0.05$) に低下した。

4. 絨毛, 脱落膜組織抽出液の PAI-1値

妊娠初期, 中期, 後期の各組織抽出液中の PAI-1濃度を測定した (図 4)。

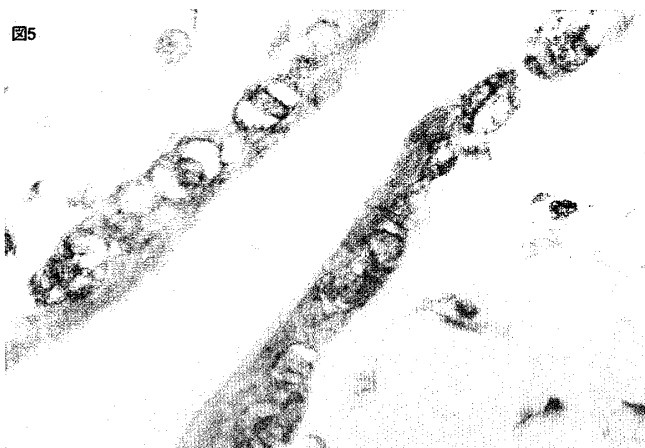


図5

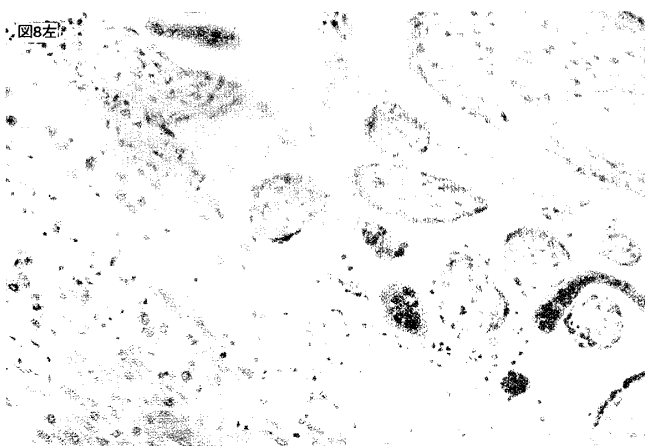


図6

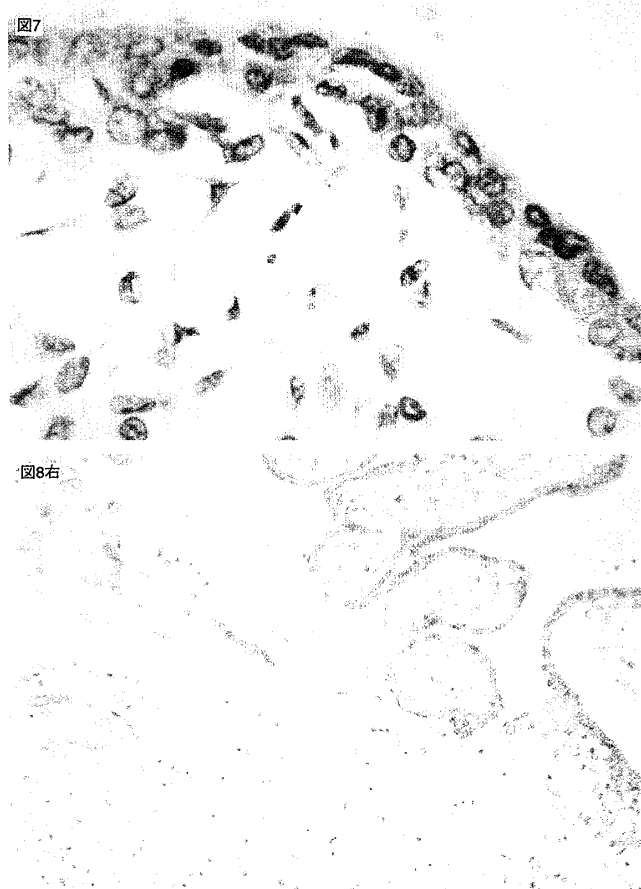


図7

図8右

図5 cytotrophoblast に局在する uPA (強拡大)

図6 extravillous trophoblast に局在する uPA (強拡大)

図7 cytotrophoblast に局在する uPAR

図8 extravillous trophoblast に染まる uPAR (左), 脱落膜組織に入り込む cytokeratin 染色陽性細胞 (右)

絨毛組織抽出液中の PAI-1 値 (mean±SE) は、妊娠初期で 43.80 ± 12.18 , 中期で 70.72 ± 8.04 , 後期で 76.82 ± 31.44 ng/mg protein であり、妊娠時期による差はなかった。

脱落膜組織抽出液中の PAI-1 値 (mean±SE) は、妊娠初期で 248.30 ± 65.78 , 中期で 212.60 ± 54.53 , 後期で 118.56 ± 32.18 ng/mg protein であり、PAI-1 は絨毛組織抽出液に比べて脱落膜抽出液中に多く含まれ、初期に高く、後期には次第に減少する傾向 ($p < 0.1$) を認めた。

5. 免疫染色の結果

1) uPA の局在

uPA は初期, 中期の胎盤組織では、主に絨毛の cytotrophoblast と、脱落膜組織に島状に存在する extravillous trophoblast (EVT) に局在が確認された (図5, 6)。

uPA は後期の絨毛, 脱落膜には染色性は弱かった。

2) uPAR の局在

初期, 中期の絨毛の uPAR 染色では、cytotro-

phoblast に限局して染色性を示した(図7)。また初期, 中期の脱落膜組織では, 脱落膜組織に島状に入り込んでいる EVT に明らかに陽性を示した(図8)。一方, 後期の絨毛, 脱落膜組織には染色性を示さなかった。

以上より uPAR は初期, 中期の cytotrophoblast と EVT に局在していることが明らかとなった。

3) tPA の局在

妊娠初期の脱落膜間質中に軽度の染色性を示したが, 絨毛には染色性を示さなかった。中期, 後期の胎盤における染色性は明らかでなかった。

4) PAI-1 の局在

妊娠初期, 中期, 後期の絨毛と脱落膜細胞に染色性を示した。妊娠後期では絨毛の染色性に比べて脱落膜細胞で強く染色された。

考 察

絨毛は, 脱落膜への侵入と胎盤形成に重要な役割を果たしているが, その機序についてはまだ明らかにされていない。最近ではこれらの過程において線溶系酵素や, いくつかの蛋白分解酵素の存在が明らかになりつつある^{4)~6)}。今回の研究では, 胎盤形成期にあたる妊娠初期, 中期と, 胎盤完成後の後期の胎盤組織の線溶系因子の局在につき比較検討した。

1. 組織抽出液での検討

絨毛の脱落膜への侵入機序には線溶系酵素である uPA と, その receptor である uPAR, そして tPA とそれら線溶酵素の阻害因子である PAI-1 が関与している可能性がある。今回の成績では uPAR, tPA と PAI-1 が妊娠初期の脱落膜組織抽出液に多く含まれており, 後期の脱落膜組織抽出液中では減少していることが判明した。uPA, uPAR 系は癌細胞の組織への浸潤や, 血管外での線溶現象に働くことが報告されている⁹⁾。一方, 胎盤形成時には, uPA は絨毛から産生され, uPAR と結合することによりさらに安定化し, 線溶系酵素として活性化され, 脱落膜組織の蛋白融解を起こし, 絨毛の侵入を促していると言われている。また, 胎盤の絨毛間腔には母体血が流れ, その血流は緩徐なうえに過凝固傾向にあるため, 血栓を

形成しやすいが実際には生じることは少ない。これは抗凝固, 線溶系因子として tPA, uPA が重要であると言われている⁹⁾。

一方, 線溶系酵素阻害因子である PAI-1 は, uPA と複合体を形成し, 線溶系をあるレベルで保つため, 血栓を形成せず, 絨毛の侵入を調節していると考えられる。今回の成績では uPA は絨毛, 脱落膜抽出液間および妊娠時期で有意な変動を示さなかった。一方 uPAR, tPA, PAI-1 は妊娠初期脱落膜組織抽出液中に高く, 妊娠後期に著明に減少していることより, これらの因子が胎盤形成機序, すなわち絨毛の脱落膜側への侵入の調節に関与していると推測された。

2. 免疫組織化学的染色による検討

一般に uPA, uPAR は絨毛細胞に存在すると言われており⁷⁾¹⁰⁾, 一方 PAI-1 は妊娠初期絨毛¹¹⁾および初期から後期の脱落膜細胞がその主な局在であると言われている。

今回の成績では妊娠初期, 中期の胎盤組織では, uPA と uPAR は主に cytotrophoblast と EVT に染色性を示した。妊娠後期には uPA, uPAR ともに染色性は弱い, または認められなかった。cytotrophoblast より分化した syncytiotrophoblast には uPA, uPAR ともに妊娠全期を通じて染色性を示さなかった。

cytokeratin は EVT のマーカーとして報告されており⁸⁾, 今回の成績では EVT に一致して uPA, uPAR が局在することが判明した。EVT は脱落膜細胞との分離が極めて困難なため, 脱落膜組織抽出液中には EVT が多量に含まれていることになる。今回の検討では, uPAR は妊娠初期, 中期の脱落膜組織抽出液中に多く含まれていたが, これは主に分離不可能な EVT に局在する uPAR を測定したものと推測される。

このような胎盤形成期である妊娠初期, 中期において, 絨毛が脱落膜へ侵入していく過程の最先端である EVT, および cytotrophoblast で, uPA, uPAR の存在が認められたことより, 絨毛の脱落膜への侵入には絨毛における uPA, uPAR の密接な関与が示唆された。また, cytotrophoblast が成熟して, syncytiotrophoblast に分化するとともに

uPAR 量が減少している。これらの減少により絨毛の後期での侵入機序を低下させていると考えられる。このような uPA, uPAR を介しての細胞浸潤過程は、悪性腫瘍の周囲組織へ浸潤する場合の線溶系酵素、阻害酵素の発現様式に類似する⁹⁾ものであるが、腫瘍と胎盤形成の相異点は、胎盤組織の場合、子宮筋層に浸潤しない調節機構が働いていることである。

tPA については、組織抽出液中には認められていたが、免疫染色は局在に明らかな傾向は認められず、その意義は不明であった。

PAI-1は初期、中期、後期の絨毛と脱落膜細胞に染色性を示し、とくに妊娠後期では脱落膜細胞で強く染色された。絨毛の脱落膜への侵入過程には、uPA, uPAR による局所的蛋白融解に対応して脱落膜側でも PAI-1により線溶系を抑制し、絨毛の脱落膜への侵入を調節する機序、すなわち絨毛、脱落膜間 paracrine regulation が存在し、胎盤形成が調節されている可能性が示唆された。

今回の検討では、胎盤形成過程においては線溶系因子、線溶系酵素阻害因子について、まず組織抽出液で妊娠時期による変化を示し、ついで、免疫組織化学的染色によりそれらの局在、特に分離不能な EVT に存在する uPA, uPAR を証明し得た。

結 論

本研究では胎盤形成過程における線溶系因子の関与とその局在につき検討した。組織抽出液での比較検討では、uPAR, tPA, PAI-1は妊娠初期、中期の脱落膜側に多く含まれていた。uPA は妊娠時期による変化、組織間での分布差は認めなかった。一方、免疫組織染色では、uPA は、妊娠初期、中期の cytotrophoblast, EVT に存在し、その受容体である uPAR は、妊娠初期、中期の cytotrophoblast, EVT に局在していた。妊娠後期の胎盤組織では uPAR は染色性が弱かった。PAI-1は妊娠後期で絨毛より脱落膜細胞に強く染色性を示した。以上より、脱落膜組織への絨毛の侵入は、胎盤形成期である妊娠初期、中期の uPA, uPAR が、

妊娠後期においては脱落膜の PAI-1が絨毛の脱落膜への侵入を調節している可能性が示唆された。

文 献

- 1) **Cubellis MV, Nolli ML, Cassani G et al:** Binding of single-chain prourokinase to the urokinase receptor of human U937 cells. *J Biol Chem* 261: 15819-15822, 1986
- 2) **Ellis V, Behrendt N, Danø K:** Plasminogen activation by receptor-bound urokinase: A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem* 266: 12752-12758, 1991
- 3) **Edelberg JM, Reilly CF, Pizzo SV:** The inhibition of tissue type plasminogen activator by plasminogen inhibitor 1: The effects of fibrinogen, heparin, vitronectin, and lipoprotein (a). *J Biol Chem* 266: 7488-7493, 1991
- 4) **Zini JM, Murray SC, Graham CH et al:** Characterization of urokinase receptor expression by human placental trophoblasts. *Blood* 79: 2917-2929, 1992
- 5) 弓立 環, 井坂恵一, 小杉好紀ほか: トロフォブラストの浸潤に関するメカニズムの解析. *日産婦会誌* 48: 191-198, 1996
- 6) 深尾偉晴: 癌細胞と線溶系因子. 「線溶系の新展開」(松尾 理 編) pp168-184, 学際企画, 東京 (1992)
- 7) **Queenan JT, Kao LC, Arboleda CE et al:** Regulation of urokinase-type plasminogen activator production by cultured human cytotrophoblasts. *J Biol Chem* 262: 10903, 1987
- 8) **Multhaupt HA, Mazar A, Douglas B et al:** Expression of urokinase receptors by human trophoblast: A histochemical and ultrastructural analysis. *Lab Invest* 71: 392-400, 1994
- 9) **Danø K, Behrendt N, Brunner N et al:** The urokinase receptor. Protein structure and role in plasminogen activation in cancer invasion. *Fibrinolysis* 8(Suppl 1): 189-203, 1994
- 10) **Roldan AL, Cubellis MV:** Cloning and expression of the receptor for human uPA, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J* 9: 467-474, 1990
- 11) **Hofmann GE, Glatstein I, Schatz F et al:** Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites. *Am J Obstet Gynecol* 170: 671-676, 1994