学会賞受賞論文

胎盤での CD73 依存的なアデノシンの過剰蓄積と A_{2B} アデノシン受容体の活性化が妊娠高血圧腎症の発症に関与する

CD73-mediated increased placental adenosine signaling via A_{2B} adenosine receptor contributes to the pathogenesis of preeclampsia

入山 高行^{a), b)}、大須賀 譲^{a)}、藤井 知行^{a)}
Takayuki Iriyama, Yutaka Osugaa, Tomoyuki Fujiia

- a) 東京大学医学部附属病院 女性診療科産科・女性外科
Department of Obstetrics and Gynecology, The University of Tokyo Hospital
〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1
- b) テキサス大学医学校ヒューストン校
University of Texas Medical School at Houston
6431 Fannin Street, Houston, Texas 77030, USA

キーワード:

アデノシン、CD73、アデノシン受容体、自己抗体、妊娠高血圧腎症

*Corresponding author:

入山 高行
Tel: 03-5800-8657
E-mail: iriyama-ky@umin.ac.jp

要 旨

〈目的〉アデノシン (Ado) は低酸素状態で誘導され、様々な疾患の発症において重要な役割を担うシグナル伝達分子である。我々は最近、妊娠高血圧腎症 (PE) 患者の胎盤において Ado が過剰に蓄積しており、AMP を Ado に変換する酵素である CD73 の活性が PE 患者の胎盤において亢進していることを報告した。しかしながら胎盤での CD73 の病態生理学的な役割については何も知られていない。そこで本研究では、アンジオテンシン II 1 型受容体に対する活性化型自己抗体 (AT₁-AA) により誘導される PE マウスモデルを用いて、*in vivo* での CD73 の役割および Ado 受容体を介したシグナル伝達経路の PE 発症における関与を検討した。

〈方法〉患者血清より精製した AT₁-AA を妊娠マウスに投与する PE マウスモデルを施行し、野生型 (WT) 妊娠マウス、CD73 欠損 (*Cd73*^{-/-}) 妊娠マウス、および A_{2B} Ado 受容体 (ADORA2B) 欠損 (*Adora2b*^{-/-}) 妊娠マウスを用いて表現型の比較検討を行った。尚、本研究は所属研究機関の倫理委員会の手承認と患者からの文書での同意を得て行われた。

〈成績〉AT₁-AA の投与により PE 表現型を呈した WT マウスの胎盤において Ado は過剰蓄積しており、Ado 変換酵素である CD73 の発現および活性の上昇が認められた。*Cd73*^{-/-} 妊娠マウスに AT₁-AA を投

与した群では Ado の胎盤への蓄積が抑制されており、PE の表現型も改善していた。このことは、活性の上昇した CD73 を介する胎盤への Ado の過剰蓄積が PE 表現型の誘導に関与することを示唆している。また、4 種類存在する Ado 受容体のうち A_{2B} Ado 受容体 (ADORA2B) のみが PE 表現型を呈した WT マウスの胎盤で有意に発現上昇していた。そこで *Adora2b*^{-/-} 妊娠マウスに AT₁-AA を投与したところ、WT マウスで見られた PE の表現型がほぼ消失していた。

〈結論〉胎盤での CD73 依存的な Ado の過剰蓄積および ADORA2B の活性化が、AT₁-AA により誘導される PE の発症機序に関与する可能性を明らかにした。

1) 緒言

胎盤形成の異常とそれに伴う胎盤機能不全 (Placental dysfunction) は、妊娠高血圧腎症 (Preeclampsia: PE) の発症において重要な因子であることが知られている^[1]。胎盤の障害へと至るメカニズムとして、遺伝的素因、母児間免疫寛容の異常、酸化ストレス、自己抗体、母体の炎症反応の亢進等、これまでに様々な因子の関与が報告されてきたものの、その分子機序については未解明の点が多い^[2]。PE に対する病態に即した治療法はいまだに存在せず、PE の発症における分子メカニズムの解明と治療法の開発、有効な発症予知マーカーの発見は喫緊の課題である。

アデノシン (Ado) は主に低酸素などのストレス条件下で誘導され、生体の生理応答において重

要な働きをするシグナル伝達分子である (図 1)^[3]。細胞は低酸素などによる障害を受けると細胞外に ATP を放出する。この細胞外 ATP が膜結合型酵素 CD39 により AMP に加水分解され、さらに膜結合型酵素 CD73 により AMP が分解を受け Ado が産生される。産生された細胞外 Ado は、アデノシン分解酵素である Adenosine deaminase (ADA) による分解を受けたり、トランスポーターにより細胞内に取り込まれたりすることで、その濃度が厳密に制御されている。そして細胞外 Ado は、ヒトおよびマウスにおいて 4 種類存在する G タンパク共役受容体であるアデノシン受容体 (A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R, A₃R) の活性化を介して様々な生理機能を発揮する^[3]。Ado は、PE 患者の循環血液中および臍帯血中で発現が上昇していることが報告されてはいるものの^[4, 5]、その病態における意義は不明であった。我々は最近、妊娠高血圧腎症 (PE) 患者の胎盤において Ado が過剰に蓄積しており、AMP を Ado に変換する酵素である CD73 の活性が PE 患者の胎盤において亢進していることを報告した^[6]。しかしながら胎盤での CD73 の病態生理学的な役割については何も知られていない。そこで本研究では、アンジオテンシン II 1 型受容体に対する活性化型自己抗体 (AT₁-AA) により誘導される PE マウスモデル^[7]を用いて、in vivo での CD73 の役割および Ado 受容体を介したシグナル伝達経路の PE 発症における関与を検討した。

図 1. アデノシンシグナル伝達経路

細胞は低酸素などの強いストレス条件下におかれると細胞外に ATP を放出する。アデノシンは、ATP から CD39 や CD73 を介して産生される。細胞外のアデノシン濃度は、その産生経路の調節のみならず、アデノシン分解酵素である Adenosine deaminase (ADA) による分解やトランスポーター (ENT) による細胞内への取り込みにより、その濃度が厳密に制御されている。細胞外のアデノシンは、哺乳類には 4 種類存在するアデノシン受容体を介してその生理機能を発揮する。

2) 材料および方法

アンジオテンシン II 1 型受容体に対する活性化型自己抗体 (AT₁-AA) により誘導される PE マウスモデル (図 2)^[7]

正常血圧妊婦 (normotensive pregnant women: NT) および妊娠高血圧腎症妊婦 (PE) の血清より、過去の報告のように IgG を精製した^[7]。8-10 週

Autoantibody-induced PE mouse model

★ Angiotensin II type-1 receptor agonistic autoantibody (AT₁-AA)

- Found in **high levels in the blood of PE patients**
- Rarely found in uncomplicated, normotensive (NT) pregnant women
- Activates the AT₁ receptor
- Known to **induce clinical features of preeclampsia when injected to pregnant mice**

Nat Med. 2008 14:855-62

図2. アンジオテンシンII型受容体に対する活性化型自己抗体 (AT₁-AA) により誘導されるPEマウスモデル

妊娠高血圧腎症妊婦より精製したIgGを、妊娠マウスの妊娠13日および14日に投与することで高血圧や蛋白尿などのPE表現型を誘導するモデルである。

齢の妊娠マウス (C57BL/6) の妊娠 13 日および 14 日目に、正常血圧妊婦もしくは妊娠高血圧腎症妊婦より精製した IgG (NT-IgG もしくは PE-IgG) 0.8 mg を眼窩静脈叢に投与した。妊娠 13 日目より連日、妊娠 18 日目までテールカフ法により血圧測定を行った。妊娠 17 日目より 18 日目にかけて代謝ケージを用いて尿の採取を行い、尿蛋白量の測定を ELISA 法にて行った。妊娠 18 日目に血液や胎盤などのサンプルの採取を行った。また、アンジオテンシンII受容体拮抗薬であ

る Losartan および 7 つのアミノ酸 (AFHYESQ) で構成される AT₁-AA のエピトープペプチド (7aa) を PE-IgG と同時投与することで、AT₁-AA の表現型への関与を確認した。AT₁-AA により誘導される PE 表現型における CD73 およびアデノシン受容体の関与を検討する目的で、CD73 欠損 (*Cd73*^{-/-}) 妊娠マウス、および A2B Ado 受容体 (ADORA2B) 欠損 (*Adora2b*^{-/-}) 妊娠マウスを用い、野生型 (WT) 妊娠マウスとの表現型の比較検討を行った。尚、本研究は所属研究機関の倫理委員会の了承と患者からの文書での同意を得て行われた。

3) 結果

① AT₁-AA による胎盤でのアデノシンの過剰蓄積 (図3)

まず、HPLC 法を用いて、マウス胎盤におけるアデノシンの発現量を測定した。PE 患者由来の IgG (PE-IgG) を投与した妊娠マウスの胎盤では、正常妊婦の IgG (NT-IgG) を投与した妊娠マウスの胎盤に比較して、アデノシンが過剰蓄積していた。このアデノシン発現量の上昇は、アンジオテンシンII受容体拮抗薬である Losartan もしくは AT₁-AA のエピトープペプチド (7aa) によりほぼ完全にブロックされた。このことは、PE-IgG による胎盤でのアデノシンの過剰蓄積は、AT₁-AA によるアンジオテンシンII受容体の活性化によること、すなわち、AT₁-AA より胎盤でアデノシン

図3. AT₁-AAによる胎盤でのアデノシンの過剰蓄積

HPLC法を用いて、マウス胎盤におけるアデノシンの発現量を測定した。PE患者由来のIgG (PE-IgG) を投与した妊娠マウスの胎盤では、正常妊婦のIgG (NT-IgG) を投与した妊娠マウスの胎盤に比較して、アデノシンが過剰蓄積していた。このアデノシン発現量の上昇は、アンジオテンシンII受容体拮抗薬である Losartan もしくは AT₁-AA のエピトープペプチド (7aa) により阻害された。このことは、PE-IgGによる胎盤でのアデノシンの過剰蓄積は、AT₁-AAによるアンジオテンシンII受容体の活性化によること、すなわち、AT₁-AAより胎盤でアデノシンが過剰蓄積したことを示している。

Real Time RT-PCR mouse placenta

図4. AT₁-AAによる胎盤でのCD73の発現の亢進

妊娠マウス胎盤において、アデノシンの発現濃度の調節に関与する分子群の発現解析を、定量的RT-PCR法を用いて行った。CD73の発現のみが、AT₁-AAにより亢進していた。

が過剰蓄積したことを示している。

②AT₁-AAによる胎盤でのCD73の発現の亢進(図4、図5)

妊娠マウス胎盤において、アデノシンの発現濃度の調節に関与する分子群の発現解析を、定量的RT-PCR法を用いて行った(図4)。結果として、AMPをAdoに変換する酵素であるCD73の発現のみが、AT₁-AAにより亢進することが分かった。さらには、マウスの胎盤の免疫染色を行い、CD73の発現をタンパクレベルで解析した(図

5)。AT₁-AAにより、spongiosotrophoblast zoneに顕著にCD73の発現が亢進していることが分かった。これらの結果は、AT₁-AAの投与によるアデノシンの過剰蓄積にCD73の発現の亢進が関与している可能性を示唆していた。

③胎盤でのアデノシンの過剰蓄積はCD73依存的に引き起こされる(図6)

CD73のAT₁-AAにより引き起こされる表現型への関与および病態生理学的な意義を調べる目的で、CD73欠損(*Cd73*^{-/-})妊娠マウスを用いての

Immunohistochemistry CD73 Mouse placenta

PE-IgG: PE患者血清由来IgG Los: Losartan (AT₁ 受容体阻害剤)
NT-IgG: 正常妊婦由来IgG 7aa: AT₁-AA中和抗体

図5. AT₁-AAによる胎盤でのCD73の発現の亢進

マウスの胎盤の免疫染色を行い、CD73の発現をタンパクレベルで解析した。AT₁-AAによりspongiosotrophoblast zoneに顕著にCD73の発現が亢進していた。

図6. CD73依存的な胎盤でのアデノシンの過剰蓄積

Cd73^{-/-}雌マウスと*Cd73*^{-/-}雄マウスを交配し、AT₁-AAによるPEモデルを同様に施行した。HPLA法にてアデノシンの発現量を測定したところ、*Cd73*^{-/-}マウスにおいては、WTマウスで観察されたAT₁-AAにより誘導されるアデノシンの発現の亢進がほぼ消失していた。

解析を行った。*Cd73*^{-/-}雌マウスと*Cd73*^{-/-}雄マウスを交配し、AT₁-AAによるPEモデルを同様に施行した。HPLA法にてアデノシンの発現量を測定したところ、*Cd73*^{-/-}マウスにおいては、WTマウスで観察されたAT₁-AAにより誘導されるアデ

ノシンの発現の亢進がほぼ消失していた。このことは、発現亢進したCD73依存的に胎盤でアデノシンの蓄積が生じることを示している。

④AT₁-AAにより誘導されるPE表現型へのCD73の関与 (図7)

血圧及び尿蛋白量を測定し、AT₁-AAにより誘導されるPE表現型について解析を行った。WTマウスで観察された高血圧および過剰な蛋白尿の表現型が、*Cd73*^{-/-}妊娠マウスにおいては有意に抑制されていた。このことは、AT₁-AAにより誘導される高血圧および蛋白尿の表現型の表出において、CD73が重要な役割を果たしていることを示している。

⑤AT₁-AAによる胎盤でのアデノシン A2B 受容体 (ADORA2B) の発現の亢進 (図8)

哺乳類には4種類のアデノシン受容体が存在する。そこで、定量的RT-PCR法を用いてマウス胎盤における4種類のアデノシン受容体の発現解析を行った。結果として、アデノシン A2B 受容体 (ADORA2B) のみがAT₁-AAにより有意に発現が誘導されていた。

尿蛋白

図7. AT₁-AAにより誘導されるPE表現型へのCD73の関与

WTマウスで観察されたAT₁-AAによる高血圧および過剰な蛋白尿の表現型が、*Cd73*^{-/-}妊娠マウスにおいては有意に抑制されていた。

尿蛋白

図9. アデノシンA2B受容体 (ADORA2B) の活性化によりAT₁-AAによるPE表現型が誘導される

ADORA2B欠損 (*Adora2b*^{-/-}) 妊娠マウスを用い、WT妊娠マウスとの表現型の比較検討を行った。血圧及び尿蛋白の測定の結果、*Adora2b*^{-/-}妊娠マウスでは、AT₁-AAによるPEの表現型が抑制されていた。

⑥アデノシン A2B 受容体 (ADORA2B) の活性化により AT₁-AA による PE 表現型が誘導される (図 9)

そこで、AT₁-AA により胎盤で過剰蓄積したアデノシンが ADORA2B の活性化を介した経路で PE 表現型に関与しているのではないかと、という仮説に基づき、ADORA2B 欠損 (*Adora2b*^{-/-}) 妊娠マウスを用い、WT 妊娠マウスとの表現型の比較検討を行った。血圧及び尿蛋白の測定の結果、*Adora2b*^{-/-} 妊娠マウスでは、AT₁-AA による PE の表現型が抑制されていた。このことは、ADORA2B の活性化により AT₁-AA による PE 表現型が誘導されることを示している。

4) 考察

本研究では、以下のことを明らかとした (図 10)。

- ① AT₁-AA により誘導される PE マウスモデルを用いて、胎盤で発現の亢進した CD73 が胎盤でのアデノシンの過剰蓄積に関与し、さらには PE 表現型の誘導に寄与する。
- ② CD73 依存的に胎盤で過剰蓄積したアデノシンは、ADORA2B の活性化を介して PE 表現型の誘導を引き起こす。

本研究の成果は、ヒト PE 患者の胎盤で観察される CD73 活性の亢進という現象 6 が、実際に PE 患者胎盤でのアデノシンの過剰蓄積に関与している可能性があることを示すものである。また、胎盤局所でのアデノシンの過剰蓄積が PE 表現型を誘導しうることを、すなわち胎盤由来の因子が PE の発症のトリガーとして必要十分であることを示す興味深い結果である。

正常妊娠の過程では、胎盤形成の初期において胎盤絨毛細胞の子宮らせん動脈への浸潤と血管壁の置換 (リモデリング) が生じることで絨毛間腔への十分な血流が維持されることになる。PE の発症においては、このリモデリング過程が障害され胎盤が低酸素状態となり、sFlt-1 などの PE 発症に関与する因子の産生や炎症反応の亢進が惹起される、という病態形成モデルが提唱されている^[1, 2]。アデノシンは、主に低酸素刺激などの強いストレス化において細胞から放出された ATP から CD39 や CD73 などの細胞外酵素を介して

Real Time RT-PCR mouse placenta

図 8. AT₁-AA による胎盤でのアデノシン A2B 受容体 (ADORA2B) の発現の亢進

定量的 RT-PCR 法を用いてマウス胎盤における 4 種類のアデノシン受容体の発現解析を行った。アデノシン A2B 受容体 (ADORA2B) のみが AT₁-AA により有意に発現が誘導されていた。

産生されることが知られている^[3]。また、CD73 や ADORA2B は、生体の低酸素応答で重要な働きを担う転写因子である HIF1- α の直接の転写ターゲットとして知られ、腸管の虚血性障害や慢性腎疾患の発症に関与し重要な役割を果たすことが報告されている^[8, 9]。これらのことは、妊娠初期における子宮らせん動脈のリモデリング不全により引き起こされる低酸素状態の応答においてアデノシンが重要な役割を果たしている可能性、および

図 10. 胎盤での CD73 依存的なアデノシンの過剰蓄積と A_{2B} アデノシン受容体の活性化が妊娠高血圧腎症の発症に関与する

- ① 胎盤で発現・活性の亢進した CD73 が、アデノシンの過剰蓄積および PE 表現型の誘導に寄与すること
- ② PE 表現型の誘導には A_{2B} アデノシン受容体の活性化が関与することを *in vivo* で、AT₁-AA により誘導される PE マウスモデルを用いて示すことができた

その機構の破綻が PE 発症につながる可能性を示唆している。しかしながら、アデノシンの過剰状態が子宮らせん動脈のリモデリング不全そのものに関与している可能性も十分に考えられ、今後の検討課題である。

アデノシンシグナル経路の PE の発症および病態への関与の全貌の解明には、分子的な機序においては、CD73 の発現及び活性の亢進の契機となる刺激やシグナル伝達、PE の発症・進展に関与する ADORA2B 下流のシグナル伝達、過剰な ADORA2B の活性化が胎盤の形成および胎盤機能に与える影響、など検討すべき課題は多い。また、臨床への応用に向けては、薬理学的な検討によるアデノシンシグナル経路の阻害による治療的可能性、胎盤のアデノシンの蓄積量と PE の病型および重症度との関係、PE 患者における胎盤でのアデノシンの上昇と血中アデノシン値の相関の有無、PE 患者での血中アデノシン値の上昇時期の同定、など、未だ多くの検討の余地がある。しかしながら、本研究において得られた知見は、CD73 や ADORA2B を標的とした PE の新規の治療法の開発につながりうるものであり、臨床への応用に向けた大きな可能性を秘めていると考えられる。

5) 謝辞

本研究の大部分はテキサス大学医学校ヒューストン校にて遂行した成果であり、ご指導を賜りましたテキサス大学医学校ヒューストン校の Dr. Yang Xia, Dr. Rodney E. Kellems, Dr. Baha M. Sibai に深く感謝の意を表します。

6) 引用文献

- 1) Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010;376: 631-644
- 2) Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*. 2001;357: 53-56
- 3) Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nature reviews. Drug discovery*. 2013;12: 265-286
- 4) Espinoza J, Espinoza AF, Power GG. High fetal plasma adenosine concentration: A role for the fetus in preeclampsia? *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011;205: 485 e424-487
- 5) Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, Yoneyama K, Power GG, Araki T. Increased plasma adenosine concentrations and the severity of preeclampsia. *Obstetrics and gynecology*. 2002;100: 1266-1270
- 6) Iriyama T, Sun K, Parchim NF, Li J, Zhao C, Song A, Hart LA, Blackwell SC, Sibai BM, Chan LN, Chan TS, Hicks MJ, Blackburn MR, Kellems RE, Xia Y. Elevated placental adenosine signaling contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Circulation*. 2015;131: 730-741
- 7) Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nature medicine*. 2008;14: 855-862
- 8) Zhang W, Zhang Y, Wang W, Dai Y, Ning C, Luo R, Sun K, Glover L, Grenz A, Sun H, Tao L, Zhang W, Colgan SP, Blackburn MR, Eltzschig HK, Kellems RE, Xia Y. Elevated ecto-5'-nucleotidase-mediated increased renal adenosine signaling via a2b adenosine receptor contributes to chronic hypertension. *Circulation research*. 2013;112: 1466-1478
- 9) Hart ML, Grenz A, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Dalton JH, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent protection from intestinal ischemia/reperfusion injury involves ecto-5'-nucleotidase (cd73) and the a2b adenosine receptor. *Journal of immunology*. 2011;186: 4367-4374

CD73-mediated increased placental adenosine signaling via A_{2B} adenosine receptor contributes to the pathogenesis of preeclampsia

Takayuki Iriyama, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii

*Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, the University of Tokyo Hospital
(Bunkyo, Tokyo, Japan, 113-8655)*

*Corresponding: Takayuki Iriyama
Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, the University of Tokyo Hospital
Bunkyo, Tokyo, Japan, 113-8655
Phone: +3-5800-8657, Fax: +3-3816-2017
E-mail: iriyama-tky@umin.ac.jp*

Key words:

preeclampsia, adenosine, autoantibody

Abstract:

<Objectives>

Adenosine (Ado) is a signaling molecule known to be induced by hypoxia and to be involved in the pathophysiology of various disease. We recently reported that Ado levels and the enzymatic activity of CD73, an enzyme that converts AMP to Ado, are elevated in preeclampsia (PE) patient placentas. However, pathophysiological role of placental CD73 in PE remains unknown. Here, we assessed the function of CD73 and the significance of Ado signaling in vivo by using angiotensin II type 1 receptor agonistic autoantibody (AT₁-AA)-induced PE mouse model.

<Methods>

PE mouse model induced by AT₁-AA isolated from PE patient sera was conducted. AT₁-AA-induced phenotypes of wild type (WT), CD73-deficient (*Cd73*^{-/-}), and A_{2B} Ado receptor (ADORA2B) -deficient (*Adora2b*^{-/-}) dams were examined. The research protocol was approved by our institution and informed consent was obtained from all patients.

<Results>

Placental Ado levels and CD73 expression were significantly induced in AT₁-AA-treated WT dams. We found that placental Ado levels were significantly reduced in AT₁-AA-treated *Cd73*^{-/-} dams compared with WT dams. Additionally, AT₁-AA-induced PE features, hypertension and proteinuria, were attenuated in *Cd73*^{-/-} dams compared with WT dams. Expression analysis of Ado receptors revealed that only ADORA2B expression was significantly elevated in the placenta of AT₁-AA-treated WT dams. We discovered that PE features were significantly suppressed in AT₁-AA-treated *Adora2b*^{-/-} dams compared with WT dams.

<Conclusions>

Our results revealed that AT₁-AA-induced placental CD73 promotes the production of Ado leading to the development of PE through the activation of ADORA2B.