

原 著

## マウスおよびヒト胎盤におけるEPC-1/PEDF遺伝子の発現

臼井 真由美

**Expression of Early Population Doubling Level cDNA-1(EPC-1)/Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF) in Mice Placentae and Human Placentae**

Mayumi Usui (Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Kawagoe, Saitama 350-8550, Japan)

Whereas there are many hypotheses on the causes of senescence of the body, it has not yet been elucidated whether the placenta, which is to be delivered from the mother after pregnancy for ten months, is also subjected to senescent changes. Namely, is the senescence already started in the placenta of late pregnancy, as it is a matured placenta?

In this paper, a gene, early population doubling level cDNA-1/pigment epithelium-derived factor(EPC-1/PEDF), was used as a marker to examine senescent changes. This gene has already been used as an ageing marker for tissues although its expression level is fluctuated according to cell cycle, ageing, cell differentiation, etc. We noticed that, when the expression of EPC-1/PEDF mRNA was detected by RT-PCR, its level was decreasing in the placenta of pregnant mice as pregnancy progressed. Next we performed real-time quantitative PCR to detect EPC-1/PEDF mRNA in 19 cases of human placentas at 27-40 weeks of gestation, obtained upon elective cesarean deliveries done prior to the onset of labor. Its expression was decreased as pregnancy progressed. The 8 cases of vaginal delivery and the 5 cases of emergency cesarean deliveries after onset of labor gave lower values than the cases subjected to elective cesarean delivery. In cases of 8 dizygotic twins pregnancy at 32-38 weeks of gestation including two cases of discordant twins, the expression of EPC-1/PEDF mRNA was detected by real-time quantitative PCR. The placentae from the smaller neonates gave extremely lower values than the normal placentae from the larger ones.

These findings indicated that the placenta is an organ subjected to senescent changes. The onset of labor may be related with ageing of the placenta. In addition, it was suggested that the placentas with intrauterine growth retardation could show placental dysfunction accompanying senescent changes in the uterus.

**Keywords:** EPC-1, PEDF, Placenta, Pregnancy, senescent, ageing, onset of labor, Twin, IUGR

*J Saitama Med School 2004;31:95-101*

(Received January 19, 2004)

## 緒 言

生体の老化に関する成因については諸説ある。子宮内における胎盤は胎児が成長期であるにもかかわらず、妊娠後期にはすでに成熟胎盤として存在し、妊娠後10ヶ月で体外に排出される。この過程で胎盤が加齢性変化を受けているかどうかは、産科領域において長期にわたり興味をもたれている<sup>1,2)</sup>。“加齢とは成熟後の生命体が、外界からの脅威に対して傷つきや

すくなる、ひいては生物が生存する能力の低下をもたらす、時間にともなう変化である”とMasoroらは定義している<sup>3)</sup>。これを胎盤に当てはめると、まず妊娠が成立し、fetal-maternal communication systemが開始する。続いて胎盤が次第に成熟し、児の成長発育に寄与して、児が母体外の環境で十分生活できる準備が完成した時期には、胎盤は加齢性変化を受け、分娩に関わる諸因子による胎盤機能の変化が生じて、陣痛が発来するのではないかと考えられる。

従来、妊娠42週以後の予定日超過妊娠では胎盤機能が減衰する場合があります、その周産期死亡率が高いこ

とから、妊娠経過中に胎盤が加齢により機能を低下させているものと考えられてきた。しかし一方、組織学的に老化過程が進んだ状態と考えられる変化は、胎盤成熟に伴う変化や子宮胎盤血流量の減少に伴う機能低下の反映ではないかという報告<sup>4)</sup>がある。また、胎盤が完全に成熟したと考えられる妊娠36週から妊娠42週を越えるまで総DNA含有量は直線的に増加し形態学的にも持続的なDNA合成が認められるという報告<sup>5)</sup>、さらには妊娠39週から妊娠43週まで、胎児の体重、身長、頭囲が増加するという報告<sup>6)</sup>があることから、胎盤は必ずしも加齢性変化を受けていないという見解もある。そのため胎盤機能低下が予定日を超過したことによる胎盤老化に基づくものか、また逆に胎盤機能不全例が過期産になりやすいのかという点については論議が分かれているが、文献の年次的傾向からは後者の方が有力とされている<sup>7)</sup>。

近年、胎盤における加齢の評価にアポトーシスやテロメアーゼ活性を指標としている報告が散見されている。正常妊娠の胎盤においては、妊娠後期にアポトーシスが認められるという報告があり<sup>8,9)</sup>、さらに子宮内発育遅延や妊娠中毒症を合併している胎盤では、正常の胎盤よりアポトーシスの明らかな増加が報告<sup>10-15)</sup>されている。これらの病態では、胎盤の加齢性変化が胎盤機能不全を引き起こしている可能性が示されている。これらのことから、胎盤の加齢性変化がその機能低下の基礎にあるかどうか臨床的に重要な意味を持つと考えられる。

そこで我々は胎盤の加齢性変化の有無を検討するにあたり、その指標としてearly population doubling level cDNA-1/pigment epithelium-derived factor (EPC-1/PEDF) 遺伝子に注目した。この遺伝子は細胞周期、加齢、細胞分化などでその発現が変動し、他組織においては加齢マーカーとして用いられている。1993年、Cristofaloらは、線維芽細胞WI-38による老化研究において、EPC-1 mRNAは若い細胞のG<sub>0</sub>期に発現し、その量は老化した細胞の100倍以上であることを報告した<sup>16)</sup>。さらに、EPC-1/PEDFは本質的に、cell cycleと加齢に関与しており<sup>17,18)</sup>、ヒトのdermal fibroblastを用いた実験でも、加齢性変化を示す指標となることが確認された<sup>19,20)</sup>。in vivo においてもEPC-1/PEDF mRNAの発現はテロメアとともに加齢マーカーとなりうるということがクローン子牛を使った実験からも明らかになった<sup>21)</sup>。一方、このEPC-1遺伝子によりコードされているタンパク質であるPEDFは、もともと網膜色素上皮細胞から産生されている神経栄養因子として知られていたが、1999年にこのPEDFが強力な血管新生抑制因子であることが明らかとなった<sup>22)</sup>。最近、Ohno-Matsuiらは、このPEDFの発現低下が加齢黄斑変性の発症に関係するという報告をしている<sup>23)</sup>が、この疾患においては加齢が重要な病因で

あることからEPC-1/PEDF遺伝子の発現と加齢との関係が示唆されている。

本研究では、加齢によるEPC-1遺伝子発現量の変化をマウスの胎盤、臍帯、卵膜、さらにヒトの胎盤にて検討し、さらに二絨毛膜性双胎における児の体重差が25%以上である不均衡双胎 (discordant twins)<sup>24)</sup>の胎盤につき比較検討した。

## 材料と方法

### 1. 材料

マウス：2週齢のA/JCr妊娠マウス(埼玉実験動物供給所)の妊娠13日目、15日目、18日目をそれぞれ2匹使用した。マウスより子宮を摘出し、胎仔、胎盤、卵膜、臍帯、羊水をそれぞれ採取した。動物の管理、その他に関しては東京医科歯科大学動物実験の基本指針に準じて行った。

ヒト：埼玉医科大学総合医療センターにおいて胎盤等の提供についてインフォームドコンセントの得られた母体合併症のない単胎、二絨毛膜二羊膜性双胎の胎盤を研究に供した。なお、胎盤は通常廃棄される組織である。正期産における単胎症例15例、妊娠36週から妊娠38週の双胎症例6例、妊娠27週から妊娠36週の早産となった単胎症例5例、さらに一児に子宮内胎児発育遅延を合併した妊娠32週から妊娠34週の双胎症例2例から胎盤を得た。これらの2症例は、Bobsonらの定義により、両児の出生体重格差が25%以上であったため不均衡双胎 (discordant twins)<sup>24)</sup>とした。

分娩方法は経膈分娩及び帝王切開術であった。A群は陣痛発来以前の予定帝王切開症例19検体、B群は陣痛発来後の経膈分娩例8検体、C群は陣痛発来後における胎児仮死等、胎児の適応による緊急帝王切開例5検体と3群に分類して検討した。なお、A群の帝王切開術の手術適応は、既往帝王切開術、子宮筋腫合併、骨盤位などである。早産は前期破水症例も含まれているが、感染徴候を認めない症例を対象にした。すべての症例は、妊娠初期に超音波断層法にて妊娠週数を確定した症例である。また、2症例のdiscordant twins以外の児体重は、すべて妊娠週数に相当する90%タイムル値の出生体重を持つ正常児である。

経膈分娩及び帝王切開術における胎盤娩出後、胎盤から石灰巣、梗塞巣を除いた血流の豊富な臍帯附着部に近い組織を検体として採取したのち速やかに実験を開始した。

### 2. 方法

#### 半定量的RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction) 法

マウス胎盤組織、卵膜、臍帯を採取後、TRIzol reagent (Gibco BRL社)を加えホモジネートをした後、TRIzolのプロトコールに準じてtotal RNAを抽出した。抽出後のRNA濃度は分光光度計 (Pharmacia

Biotech社)で260 nmの吸光度を測定し、希釈して  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度に調整した。その後、You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) を使用してcDNAを作製した。得られたcDNA  $2 \mu\text{l}$  を template とし、PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) を用いてPCRを行った。EPC-1/PEDF cDNA (Accession number [AF 036164](#)) 増幅用プライマーとして5'-AACGTCCTGCTGTCTCCACT-3' (sense), 5'-CCAAGGAGAAGGATGCTGAG-3' (antisense) を用い、GAPDH増幅用には5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (sense) と5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (antisense) を用いた。PCRはGeneAmp PCR System (Perkin Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT) を用いて94°C 1分, 63°C 1分, 72°C 1分を30サイクル行った。そのPCR反応液を0.5% エチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルにて電気泳動した後、UVトランスイルミネーター (TOYOBO社) にてバンドを確認し、GAPDHをコントロールとしEPC-1/PEDFの発現量を半定量的に調べた。各検体について少なくとも3回PCR反応を繰り返した。

#### Quantitative real-time PCR

EPC-1/PEDFの定量的PCRをLightCycler™ instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) にて、fluorescence resonance energy transfer (FRET) hybridization probeを用いて施行した。プライマーとプローブは、human EPC-1/PEDF (Accession number [AF400442](#)) については5'-TTACGAAGGCGAAGTCACCA-3' (sense), 5'-TAAGGTGATAGTCCAGCGGG-3' (antisense) と5'-TGCCTGTGATCTTGCTAAAGTCTGGTG-3' (LC-probe), 5'-TCAACAGCGACACCCACTCCT-3' (Flu-probe), またhuman GAPDH (Accession number [M33197](#)) については5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' (sense), 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (antisense) と5'-CACCTTTGACGCTGGGGCT-3' (LC-probe), 5'-TCAACAGCGACACCCACTCCT-3' (Flu-probe) を用いた。10  $\mu\text{l}$  の2x QuantiTest™ Probe PCR Master Mix (QIAGEN), それぞれ2  $\mu\text{l}$  のforwardとreverseのプライマーを混ぜたもの(それぞれ5  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$  のFRETハイブリダイゼーションプローブ(それぞれ2  $\mu\text{M}$ ), 4  $\mu\text{l}$  のPCR-grade waterを混ぜたものをそれぞれのキャピラリーに注入し、10倍に希釈したcDNAを2  $\mu\text{l}$  加えた。negative controlとして2  $\mu\text{l}$  のPCR-grade waterを加えた。HotStart Taq DNA Polymeraseを活性化させるため95°C 15分間加熱した後95°C 1分, 58°C 30秒, 72°C 30秒の過程を40サイクル繰り返した。標準曲線を作成するため、p3XFLAG-CMV-14にFull lengthのhuman EPC/PEDF cDNAを組み込んだベクター(塩野義社から寄与)と、pBluescript IIにhuman GAPDH cDNAs

(+15-+1115) を組み込んだベクターを用いた。10<sup>7</sup> から10<sup>3</sup> コピーを含有するhuman EPC-1/PEDF cDNA およびhuman GAPDH cDNAをLightCycler™により増幅させ標準曲線を作製した。検体のcDNAのコピー数は標準曲線により算出し、EPC-1/PEDFの発現量は、GAPDHにより補正した。これらのデータは各検体について少なくとも3回繰り返した。

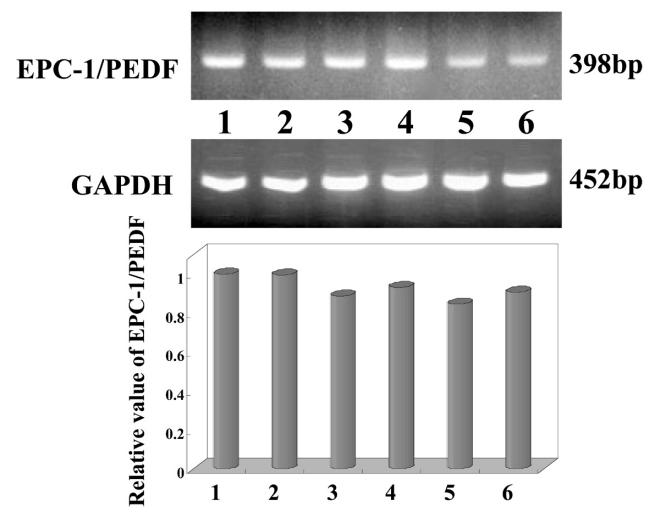
#### 統計解析

データの統計的解析には分散分析を用い  $p < 0.05$  以下を有意な差とした。

#### 結果

##### マウスにおけるEPC-1/PEDF mRNAの発現量の半定量的解析

妊娠13日目におけるマウスの卵膜、胎仔、胎盤のEPC-1/PEDF mRNAの発現をRT-PCR法にて確認した (Fig. 1)。マウスの母体の肝臓由来cDNAをEPC-1/PEDF特異的プライマー使用しPCRを行ったところ、予想された398-bpにPCR産物が認められた。EPC-1/PEDF mRNAは卵膜、胎仔、胎盤において発現しており、その強度に差は認められなかった。次に分娩2日前である妊娠18日目の卵膜、臍帯、胎仔、胎盤におけるEPC-1/PEDF mRNAの発現をRT-PCR



**Fig. 1.** Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of EPC-1/PEDF mRNA in mice on day 13 of pregnancy. Lane 1=Positive marker (Mouse liver sample used as a positive control); Lane 2=Membrane; Lane 3=Fetus 1; Lane 4=Fetus 2; Lane 5=Placenta 1; Lane 6=Placenta 2. The expressions of EPC-1/PEDF mRNA levels is unchanged in the different organs. The mRNA for GAPDH was readily detected in every sample as a single amplification product of predicted size(452bp). Relative values of EPC-1/PEDF were normalized of that by GAPDH.

法で調べた (Fig. 2). 胎仔ではEPC-1/PEDF mRNAが発現していたが、胎盤、羊膜、臍帯ではその発現は認められなかった。さらに胎盤におけるEPC-1/PEDF mRNAの発現量の妊娠経過に伴う変化を明らかにするために、妊娠13日、15日、18日目の検体を用いてRT-PCR法でその発現量を調べた (Fig. 3). 分娩予定日が近づくにつれ、EPC-1/PEDF mRNA発現量は減弱傾向を示した。対照として用いたGAPDHの発現量に差は認められなかった。

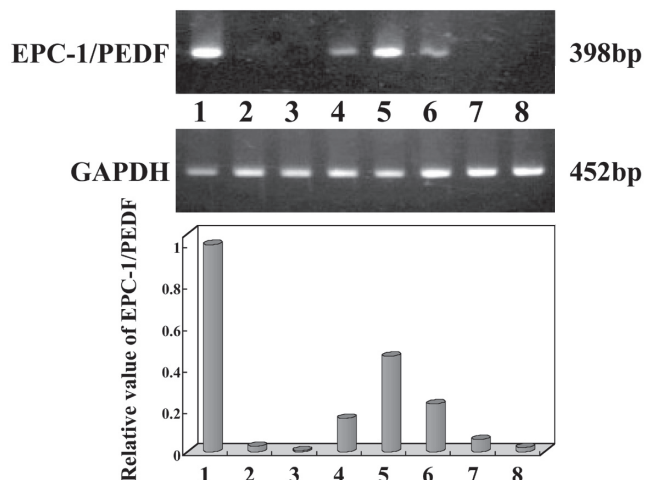
### ヒトにおけるEPC-1/PEDF mRNAの発現量の定量的解析

マウスにおいて妊娠期間と胎盤のEPC-1/PEDF遺伝子発現に負の相関が認められたので、次にヒト胎盤におけるEPC-1/PEDF mRNAの発現をQuantitative real-time PCR法にて定量した (Fig. 4). 陣痛発来以前の合併症のない予定帝王切開術を施行されたA群17症例の胎盤では、分娩予定日が近づくにつれEPC-1/PEDF mRNAの発現量は有意に低下した ( $p < 0.0001$ ,  $R^2 = 0.604$ ). B群8症例の陣痛発来後の経膈分娩症例の胎盤では、分娩時期に関わらず非常に低値を示した。さらに、陣痛発来以降に緊急帝王切開術を施行したC群5症例の胎盤でも明らかに低値を示した。陣痛を伴ったB群C群では陣痛を伴わなかったA群と比較して、EPC-1/PEDF mRNAの発現量は低値を示した。なお、妊娠36週から妊娠37週の単胎予定帝王切開術の胎盤から得られた5検体のEPC-1/GAPDH mRNAの平均値は7.434、同週数から得られた二絨毛膜二羊膜双胎の胎盤から得られた6検体の平均値は7.433でほぼ一致しており、単胎双胎間のEPC-1/GAPDH mRNAの差は認められなかった。

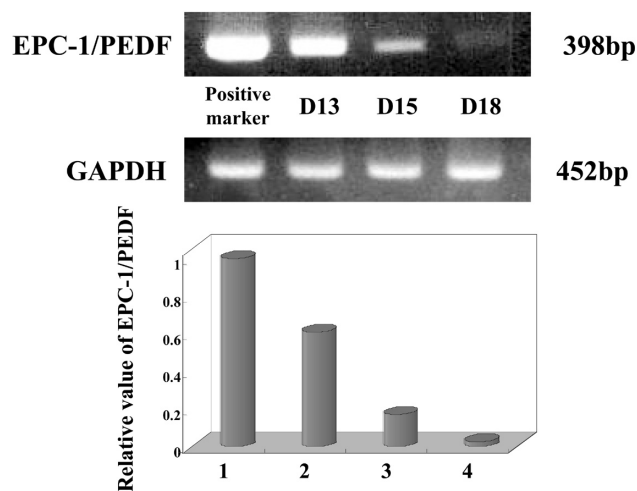
一方、二絨毛膜二羊膜双胎の症例のうち両児間で発育の異なる2症例と正常な発育を示した6症例について、胎盤におけるEPC-1/PEDF mRNAの発現量をQuantitative real-time PCR法にて検討し、その両児間のEPC-1/PEDF mRNA発現量の差を示した (Fig. 5). 妊娠36週から38週の6症例には両児に胎児発育不全はなく、両児間のEPC-1/PEDF mRNA発現量の差は少なかった。妊娠32週および妊娠34週の2症例では、1児は正常な発育を示し1児は発育不全を呈しており、両児の出生体重差はそれぞれ50%と30%であった。正常発育した児の胎盤におけるEPC-1/PEDF mRNAの発現量は高値であり、発育不全を呈した児の胎盤でのEPC-1/PEDF mRNA量は低値を示した。

### 考察

胎盤の加齢性変化を検討するにあたり、妊娠条件及び陣痛の有無や合併症などの因子を除外して加齢変化のみを評価するため、ヒトと同じ血絨毛胎盤 (placenta hemochorialis) であるマウスを用いてEPC-1/PEDF

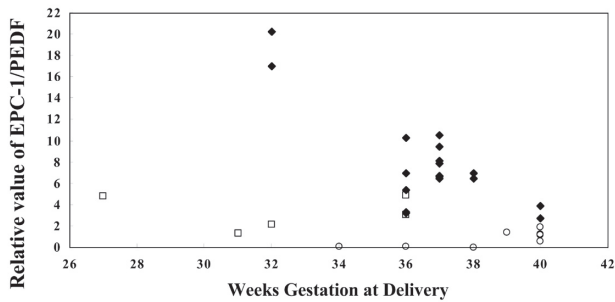


**Fig. 2.** Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of EPC-1/PEDF mRNA in mice on day 18 of pregnancy. Lane 1=Positive marker(Mouse liver sample used as a positive control); Lane 2=Membrane; Lane 3=umbilical cord; Lane 4=Fetus 1; Lane 5=Fetus 2; Lane 6=Fetus 3; Lane 7=Placenta 1; Lane 8=Placenta 2. The EPC-1/PEDF mRNA levels were significantly low in membrane, umbilical cord, placenta. The mRNA for GAPDH was readily detected in every sample as a single amplification product of predicted size (452bp). Relative values of EPC-1/PEDF were normalized of that by GAPDH.

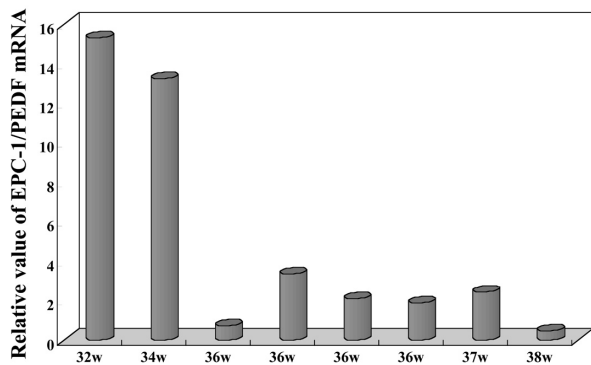


**Fig. 3.** Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of EPC-1/PEDF mRNA in mice placenta. Positive marker=Mouse liver sample used as a positive control; D13=placenta on day 13 of pregnancy; D15=placenta on day 15 of pregnancy; D18=placenta on day 18 of pregnancy. The EPC-1/PEDF mRNA expression significantly decreased closer to expected date of confinement. The mRNA for GAPDH was readily detected in every sample as a single amplification product of predicted size (452bp). Relative values of EPC-1/PEDF were normalized of that by GAPDH.

mRNAの発現を検討した。マウスのEPC-1/PEDF mRNAの発現は、これまでに様々な臓器で確認されているが<sup>25)</sup>、胎児、胎盤、卵膜における発現は確認されていない。そこで胎盤完成期であり加齢の影響を受けていないと考えられる妊娠13日目での検体を用いた。これらの各組織でEPC-1/PEDF mRNAは強く発現し



**Fig. 4.** Real-Time reverse-transcription polymerase chain reactions (Real-Time PCRs) for EPC-1/GAPDH mRNA in human placentae. Comparison of the relative values of EPC-1/GAPDH between at 27-40 weeks of gestation without complications except preterm birth. Elective caesarean section (Elective CS) samples in 19 cases (A group) were prior to the onset of labor. The values of EPC-1/GAPDH (◆) were decreased as pregnancy progress. The values of EPC-1/GAPDH (○) were detected markedly lower level in the 8 cases of vaginal delivery after normal spontaneous labor (B group). The values of EPC-1/GAPDH (□) were detected markedly lower level in the 5 cases of emergency caesarean section (Emergency CS) after onset of labor (C group). Relative values of EPC-1/PEDF were normalized of that by GAPDH.



**Fig. 5.** Real-Time reverse-transcription polymerase chain reactions (Real-Time PCRs) for EPC-1/GAPDH mRNA in human placentae of 8 dizygotic twins pregnancy at 32-38 weeks of gestation including two cases of discordant twins. The expression of EPC-1/PEDF mRNA in discordant twins at 32 and 34 weeks of the two smaller infant was detected extremely low levels compared the expression with the larger infants. The value difference were 15.3 at 32 weeks of gestation, 13.3 at 34 weeks of gestation. Relative values of EPC-1/PEDF were normalized of that by GAPDH.

ており、発現量に差は認められなかった。妊娠18日目では、胎児においてその発現は認められたが、それ以外の胎盤、卵膜、臍帯では、全く発現が認められず、分娩時に娩出される胎盤およびその付属臓器である卵膜及び臍帯は分娩に向けて胎盤と同様に加齢変化を受けていると考えられた。胎盤は妊娠が経過するにつれEPC-1/PEDF mRNA発現は減弱していることから (Fig. 3)、陣痛等のストレスが加わらない状態で、生理的に子宮内で徐々に加齢性変化を受けている臓器であることが明らかになった。

ヒトにおいても子宮内で胎盤が加齢変化を受けているかを確認するため、母体合併症のない陣痛発来以前の予定帝王切開症例から娩出された胎盤のEPC-1/PEDF mRNA発現量を測定した。Fig. 4に示したように、妊娠週数が進むにつれ直線的にEPC-1/PEDF mRNAの発現が低下していた。この結果から胎盤が加齢性変化することが示唆されたが、この結果はアポトーシスやテロメアなどの指標を用いて考察されている胎盤の加齢変化<sup>26)</sup>と一致するものである。

さらに陣痛発来後の胎盤におけるEPC-1/PEDF mRNAの発現は、陣痛を伴わない帝王切開症例に比してどの妊娠週数においても非常に低値を示していることから、胎盤の加齢が陣痛の発来に関係する可能性がある。

陣痛発来の機序に関しては、様々な意見があるが、近年、オキシトシン系<sup>27-30)</sup>とプロゲステロン系<sup>31,32)</sup>による子宮収縮作用だけでなく、androstenedione<sup>33)</sup>やinterleukin-1<sup>34)</sup>による子宮収縮作用やinterleukin-8<sup>35)</sup>による子宮頸管熟化そのものが分娩を発生している可能性を示唆する報告もある。さらに、妊娠子宮筋には妊娠を継続維持するための子宮弛緩作用から分娩を発生されるための子宮収縮作用の切り替えが必要であるが、この機構には母児の視床-下垂体-副腎系の調節 (Autocrine) と胎盤、卵膜を中心とした局所の調節機構 (paracrine) が複雑に絡み合っており、その中心的役割を演じるのが胎児視床-下垂体-副腎系の成熟とその活性化により増加するDHEAS (dehydroepiandrosterone sulfate) を介したEstrogenとCortisolを介した胎盤由来のCRH (corticotropin releasing hormone) であるという考え方もある<sup>36,37)</sup>。陣痛発来後に胎児仮死や分娩停止のため緊急帝王切開術を施行した症例でも、同じ週数の陣痛発来前の症例におけるEPC-1/PEDF mRNAの発現に比較して低値を示していたことも、分娩方法でなく、陣痛発来の有無がEPC-1/PEDF mRNAの発現を左右する要因であると推測される。しかしながら、PGやオキシトシンなどの各種ホルモンおよびサイトカイン等の陣痛に関わる因子がEPC-1/PEDF mRNAの発現に影響を与える可能性も否定できない。EPC-1/PEDFの発現調節機構に関し

ては今後検討する必要がある。

子宮内胎児発育不全の胎盤における加齢性変化を検討するため、両児間の体重差のない concordant twins である6症例と discordant twins である2症例について EPC-1/PEDF mRNA の発現量の検討を行った。これらの双胎の胎盤は、同じ母体に、同時期に、同じ子宮内環境で成育したことから、子宮内胎児発育不全の検討に適していると考えられた。体重差のない双胎6例は、両児の胎盤における EPC-1/PEDF mRNA の発現量は単胎症例同様高値を示し、その両児間での差は 0.47-3.33 であった。discordancy を示している2症例では両児間での差は 15.3, 13.3 と高値を示しており、子宮内胎児発育不全を呈している胎盤の EPC-1/PEDF mRNA の発現量は正常発育している児に対して非常に低値を示していた。このことから、子宮内胎児発育不全を呈している胎盤は早期に加齢が進行し、胎盤機能不全を引き起こしている可能性が示唆された。双胎妊娠における各児の遺伝的相異が胎児発育と胎盤の加齢に影響する可能性を今後検討する必要がある。また、単胎症例の子宮内胎児発育不全胎盤では、アポトーシスの発現が正常胎盤より高頻度であるとの報告<sup>10-15, 38)</sup>があり、子宮内胎児発育不全の病態における変化も注目される。一方、遺伝的背景が同一である一絨毛膜性双胎の一児発育不全に胎盤の加齢性変化が関わるかどうかは、もう一つの研究課題である。

## 結 論

1. 我々は EPC-1/PEDF 遺伝子を用いて、胎盤の加齢に関する検討を行った。胎盤は子宮内で加齢性変化を示し、さらに加齢性変化にともなって陣痛が発来する可能性が示唆された。
2. 双胎における一児子宮内胎児発育不全では、比較的早い時期から発育不全を示す児側胎盤の加齢性変化が発生し、二次的に胎盤機能不全症となっていると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、直接ご指導、ご教示いただきました東京医科歯科大学分子細胞機能学教室森田育男教授に深謝いたします。また、中浜健一助教授をはじめ教室員の皆様から多くのご協力いただきましたことに、深く感謝いたします。

なお、本論文の一部は、第55回日本産婦人科学会総会において発表した。

## 引用文献

- 1) Rosso P. Placenta as an Ageing Organ. *Curr Concepts Nutr* 1976;4:23-41.
- 2) Parmley T. Placental Senescence. *Adv Exp Med Biol* 1984;176:127-32.
- 3) Masoro EJ. Ageing: Current concepts. In: Masoro EJ, editors. *Handbook of Physiology*. New York: Oxford University Press; 1995. p. 3-21.
- 4) Larse LG, Clausen HV, Andersen B, Graem N. A stereologic study of postmature placentas fixed by dual perfusion. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:500-7.
- 5) Sands J, Dobbing J. Continuing growth and development of the third-trimester human placenta. *Placenta* 1985;6:13-21.
- 6) McLean FH, Boyd ME, Usher RH, Kramer MS. Postterm infants: too big or too small? *Am J Obstet Gynecol* 1991;64:619-24.
- 7) Crowley P. Post-term pregnancy: induction of surveillance? In: Chalmers I, Enkin M, Keirse M, editors. *Effective Care in Pregnancy and Childbirth*. Oxford: Oxford University Press; 1991. p. 776.
- 8) Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:57-65.
- 9) Thiet MP, Suwanvanichkij V, Hasselbatt K, Yeh J. Apoptosis in Human Term Placenta. A morphological and gene expression study. *Gynecol Obstet Invest* 2000;50:88-91.
- 10) Izutsu T, Kudo T, Sato T, Nishiya I, Ohyashiki K, Nakagawa K. Telomerase and proliferative activity in placenta from women with and without fetal growth restriction. *Gynecol Obstet* 1999;93:124-9.
- 11) Kudo T, Izutsu T, Sato T. Telomerase activity and apoptosis as indicators of ageing in placenta with and without intrauterine growth retardation. *Placenta* 2000;21:493-500.
- 12) Erel CT, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynecol Obstet* 2001;73:229-35.
- 13) Ishihara N, Matsuo H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:158-66.
- 14) Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PC, Kraus FT, Sadovky Y, et al. Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:1056-61.
- 15) Axt R, Kordina AC, Meyberg R, Reitnauer K, Mink D, Schmidt W. Immunohistochemical evaluation of apoptosis in placentae from normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Clin Exp. Obstet Gynecol* 1999;26:195-8.

- 16) Pignolo RJ, Cristofalo VJ, Rotenberg MO. Senescent WI-38 cells fail to express EPC-1, a gene induced in young cells upon entry into the G<sub>0</sub> state. *J Biol Chem* 1993;268:8949-57.
- 17) Pignolo RJ, Rotenberg MO, Cristofalo VJ. Analysis of EPC-1 growth state-dependent expression, specificity, and conservation of related sequences. *J Cell Physiol* 1995;162:110-8.
- 18) DiPaolo BR, Pignolo RJ, Cristofalo VJ. Identification of proteins differentially expressed in quiescent and proliferatively senescent fibroblast cultures. *Exp Cell Res* 1995;220:178-85.
- 19) Tresini M, Mawal-Dewan M, Cristofalo VJ, Sell C. A phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor induces a senescent-like growth arrest in human diploid fibroblasts. *Cancer Res* 1998;58:1-4.
- 20) Tresini M, Pignolo RJ, Allen RG, Cristofalo VJ. Effect of donor age on the expression of a marker of replicative senescence (EPC-1) in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1999;179:11-7.
- 21) Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 2000;288:665-9.
- 22) Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285:245-8.
- 23) Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 2001;189:323-33.
- 24) Babson SG, Phillips DS. Growth and development of twins dissimilar in size at birth. *N Engl J Med* 1973;289:937-40.
- 25) Singh VK, Chader GJ, Rodriguez IR. Structural and comparative analysis of the mouse gene for pigment epithelium-derived factor (PEDF). *Mol Vis* 1998;4:7-12.
- 26) Fox H. Ageing of the placenta. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77:F171-5.
- 27) Fuchs AR, Romero R, Keefe D, Parra M, Oyarzun E, Behnke E. Oxytocin secretion and human parturition: plus frequency and duration increase during spontaneous labor in women. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1515-23.
- 28) Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom MJ. Oxytocin receptors: triggers for parturition and localization? *Science* 1979;204:1313-5.
- 29) Blanks AM, Thornton S. The role of oxytocin in parturition. *Br J Obstet Gynecol Suppl* 2003;110:46-51.
- 30) Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 1992;356:526-9.
- 31) Skinner KA, Challis JR. Changes in the synthesis and metabolism of prostaglandins by human fetal membranes and deciduas at labor. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:519-23.
- 32) Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Nishimura T, Oida H, et al. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 1997;277:681-3.
- 33) Mecnas CA, Giussani DA, Owiny JR, Jenkins SL, Wu WX, Honnebier BO, et al. Production of premature delivery in pregnant rhesus monkeys by androstenedione infusion. *Nat Med* 1996;2:443-8.
- 34) Ishihara O, Numari H, Saitoh M, Arai Y, Takahashi H, Kitagawa H, et al. Prostaglandin E2 production by endogenous secretion of interleukin-1 in decidual cells obtained before and after the labor. *Prostaglandins* 1996;52:199-208.
- 35) Osmer RG, Blaser J, Kuhn W, Tschesche H. Interleukin-8 synthesis and the onset of labor. *Obstet Gynecol* 1995;86:223-9.
- 36) Reis FM, Fadalti M, Florio P, Petraglia F. Putative role of placental corticotropin-releasing Factor in the mechanisms of Human Parturition. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:109-19.
- 37) Majzoub JA, MaGregor JA, Lockwood CJ, Smith R, Taggart MS, Schulkin J. A central theory of preterm and term labor: putative role for corticotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:s232-41.
- 38) Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1395-401.