

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19656

研究課題名(和文)胎児子宮内発育遅延の新しい病因・病態としての自然免疫受容体Nod1の解析

研究課題名(英文)Analysis of the innate immune receptor NOD1 as a novel cause for the development of the intrauterine fetal growth restriction

研究代表者

井上 普介(Inoue, Hirosuke)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90467902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔における自然免疫受容体Nod1の役割を検討した。Nod1リガンドを妊娠マウスに投与すると、胎児子宮内発育遅延(IUGR)または子宮内胎児死亡(IUFD)が惹起された。Nod1リガンド投与により主に胎児血管で炎症性サイトカインが産生された。母獣由来のNod1リガンドは、胎児に直接作用し、主に胎児血管で炎症応答を誘導した。胎児血管組織のマイクロアレイ解析にて、炎症反応やアポトーシス応答が誘導された。子宮内発育遅延の病因の1つとして、Nod1シグナルを介した胎児血管病変が関係している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Nod1 is one of the pattern recognition receptors that play an important role in the induction of innate immune and inflammatory responses. However, little is known about the deleterious effects of activated Nod1 signaling on embryonic growth and development. In this study, we demonstrated that administration of Nod1 ligand to pregnant mice induced IUGR and IUFD. Maternal injection of Nod1 ligand induced robust increases in the amounts of CCL2, IL-6, and TNF proteins as well as NO in maternal, placental and fetal tissues. CCL2 and IL-6 mRNAs were significantly induced in the fetal vascular tissues with maternal injection of Nod1 ligand than those in other tissues. Using Nod1-knockout mice, we verified that maternal Nod1 ligand directly induced upregulation of genes associated with immune response, inflammation, and apoptosis in fetal vascular tissues. Our data thus provided new evidence for the pathogenic role of Nod1 in the development of IUGR and IUFD at the maternal-fetal interface.

研究分野：小児科学 新生児医学

キーワード：子宮内発育遅延 Nod1 自然免疫 血管病変

1. 研究開始当初の背景

NOD-like receptor のひとつである NOD1 は、細菌ペプチドグリカン関連小分子群に反応し、最終的に NF- κ B を活性化し、炎症系サイトカイン遺伝子などの多くの遺伝子の転写を活性化する自然免疫受容体である。我々は、Nod1 リガンドがマウスに血管炎 (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011) および動脈硬化を惹起することを見出した (J Immunol. 2015)。そこで、妊娠マウスに Nod1 リガンドを投与したところ、Nod1 リガンドは胎児へ経胎盤移行し IUGR が惹起された。胎児の免疫応答は主に自然免疫であり、TLR (Toll-like receptor) -2、3、4、9 などと流産や胎児奇形との関連が報告されている (Am J Reprod Immunol. 2010)。細菌から放出され環境中に広く存在していると考えられる Nod1 リガンドも、妊婦・胎児に作用し、妊娠転帰に影響を及ぼしている可能性は十分考えられるが、そのような報告はほとんどない。

2. 研究の目的

胎児子宮内発育遅延 (IUGR) は全妊娠の 5~8% に発症し、周産期死亡や早産、将来的な生活習慣病や発達障害などのリスクとなる。しかし約半数の IUGR は原因不明である (Avery's Diseases of the Newborn, 9th ed. 2011)。我々は予備実験により、妊娠マウスへの Nod1 リガンド投与にて、子宮内胎児死亡 (IUFD) と IUGR が惹起されうることを見出した。本研究では、妊娠マウスへの Nod1 リガンド投与にて IUFD と IUGR が惹起されるメカニズムを解析すること、IUGR 児における将来的な動脈硬化や発達障害の発症が本モデルで説明可能かどうかを明らかにすること、同時にヒトでの IUGR の病因・病態に NOD1 リガンドがどのように関与しているかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 妊娠マウスへの Nod1 リガンド投与の影響に関する検討

8~12 週齢の C57BL/6 マウスを妊娠させ、妊娠 14 日目に Nod1 リガンドを皮下投与した。投与後の妊娠転帰 (流産死産の有無) を確認し、分娩がなければ妊娠 16 日目に安楽死させた。母獣の血清、心臓、大血管を回収した。胎児は外観で生死を判別し、生児は重量を測定後、ホルマリン保存、またはタンパク分解酵素阻害剤入り溶液でホモジネートした。HE 染色による病理学的評価と、サイトカイン測定 (BD Cytometric Bead array の Mouse Inflammation Kit を使用) を行った。

(2) 胎児各組織における Nod1 リガンドに対する反応性の評価

まず、胎児における Nod1 リガンド作用組織を同定するため、受胎後 18 日目の胎児から各組織を採取し、mRNA から cDNA 合成した後、TaqMan 法にて Nod1 の定量 PCR を行った。

次に、胎児各組織における Nod1 リガンドに対する反応性を評価するため、妊娠 18 日目の C57BL/6 マウスに Nod1 リガンドを投与し、6 時間後の胎児各組織を採取し、炎症性サイトカインの mRNA 発現を TaqMan 法による定量 PCR で比較した。

(3) Nod1 ノックアウトマウスを用いた IUGR モデルの病態に関する検討

母獣 Nod1^{-/-} (ホモ)、父獣 Nod1^{+/-} (ヘテロ) で交配し母獣へ Nod1 リガンドを投与すると、母獣は Nod1 リガンドによる影響はなくなり、同腹児は Nod1^{-/-} (ホモ) または Nod1^{+/-} (ヘテロ) と Nod1 遺伝子型を区別でき、胎児への Nod1 リガンドの直接的な影響を評価できる。E18 時に母獣へ Nod1 リガンド投与し、6 時間後に胎児から各種臓器を摘出した。血管組織でマイクロアレイによる解析を行い、変化したシグナル経路について検討した。

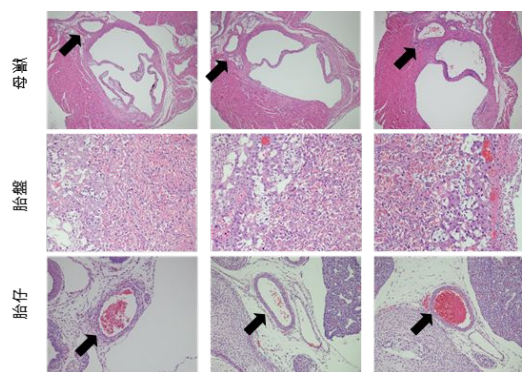
(4) ヒト IUGR 患者における Nod1 の関与の検討

IUGR 患者の母体血清、羊水、臍帯血清を回収し、-20 で保存した。HEK293 細胞に NOD1 遺伝子をトランスフェクションした HEK-Blue™ mNOD1 細胞 (InvivoGen) を用いて、患者検体中の NOD1 リガンド活性を評価した。

4. 研究成果

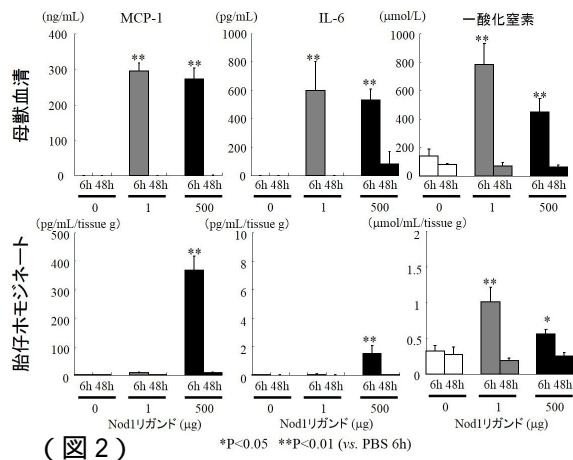
(1) 妊娠マウスへの Nod1 リガンド投与による影響

我々は Nod1 リガンドがマウスで血管病変を惹起することを見出していたため、妊娠マウスへの Nod1 リガンド投与により、胎児で血管炎が惹起されると仮説を立てた。しかし妊娠 16 日目 (Nod1 リガンド投与後 2 日) の病理組織学的評価では、母獣および胎児で血管炎の所見を認めなかった (図 1)。



(図 1) PBS Nod1リガンド 1 µg Nod1リガンド 500 µg

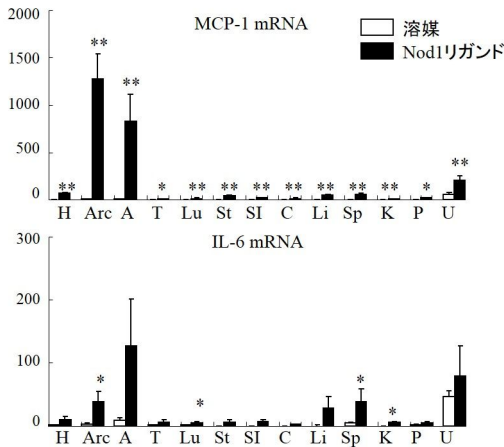
Nod1 リガンド投与後 6 時間での母獣血清および胎児ホモジネート上清で、炎症性サイトカインと一酸化窒素の上昇を認めた (図 2)。以上から、妊娠マウスへの Nod1 リガンド投与により母獣と胎児で炎症性変化を来すことが分かり、このため IUGR や IUFD が惹起されることが推定された。



(図2)

(2) 胎仔各組織における Nod1 リガンドへの反応性の評価

次に、妊娠 18 日目マウスに Nod1 リガンドを投与し、6 時間後の胎仔各組織の炎症性サイトカイン mRNA 発現を調べたところ、主に血管で発現が亢進していた (図3)。

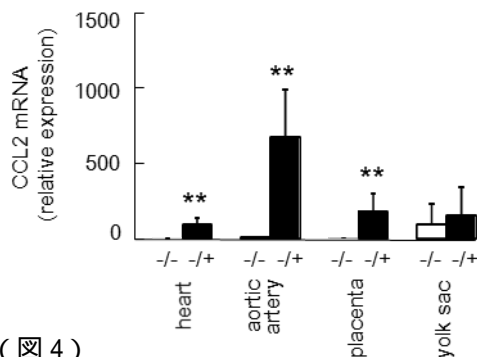


H, 心臓; Arc, 大動脈弓; A, 動脈; T, 胸腺; Lu, 肺; St, 胃; SI, 小腸; C, 大腸; Li, 肝臓; Sp, 脾臓; K, 腎臓; P, 胎盤; U, 臍帯
*P<0.05 **P<0.01 (vs. 溶媒)

(図3)

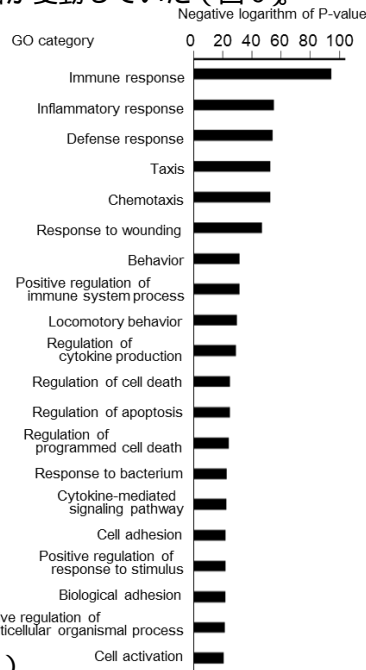
(3) Nod1 ノックアウトマウスを用いた IUGR モデルの病態に関する検討

母獣 Nod1^{-/-} (ホモ) 父獣 Nod1^{+/-} (ヘテロ) で交配し母獣へ Nod1 リガンドを投与すると、同腹児血管組織での Nod1^{-/-} (ホモ) と Nod1^{+/-} (ヘテロ) での比較では、主に血管で炎症反応が強かった (図4)。



(図4)

血管マイクロアレイ解析では、Nod1 リガンドにより、主に炎症反応やアポトーシスのシグナル経路が変動していた (図5)。



(図5)

以上から、母獣に投与された Nod1 リガンドは、胎児血管に直接作用し、炎症性応答やアポトーシス反応が惹起されることが分かった。

(4) ヒト IUGR 患者における NOD1 の関与

約 80 名のヒト IUGR 患者において、母体血清、羊水、臍帯血清中の NOD1 リガンド活性を調べた。本実験では、NOD1 リガンド活性を有する検体は見出せなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Inoue H, Nishio H, Takada H, Sakai Y, Nanishi E, Ochiai M, Onimaru M, Chen SJ, Matsui T, Hara T.

Activation of Nod1 Signaling Induces Fetal Growth Restriction and Death through Fetal and Maternal Vasculopathy.

J Immunol. 2016 Mar 15;196(6):2779-87.

[学会発表](計 2 件)

Inoue H, Kusuda T, Fujiyoshi J, Matsushita Y, Ochiai M, Nishio H, Takada H, Hara T

Nod1 signaling induces intrauterine fetal growth restriction and fetal death in mice
The 11th Asian Society for Pediatric Research, April 15 - 18, 2015, 大阪府立国際会議場 (大阪府、大阪市)

井上普介, 安岡和昭, 菅秀太郎, 田中幸一, 藤吉順子, 松下悠紀, 楠田剛, 落合正

行
当センターにて周産期管理を行った出生体重 500g 未満児の生存退院と 3 歳時予後
第 60 回日本新生児成育医学会・学術集会、
2015 年 10 月 23 日～25 日、いわて県民情報
交流センター「アイーナ」(岩手県、盛岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 普介 (INOUE, Hirosuke)

九州大学・大学院医学研究院成長発達医学

分野・助教

研究者番号：90467902

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし