

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591414

研究課題名（和文） 妊娠および胎児発育におけるスフィンゴ脂質代謝の役割の解明

研究課題名（英文） Sphingolipid Metabolism in Pregnancy and Fetal Development

研究代表者

水岸 貴代美（MIZUGISHI KIYOMI）

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70518448

研究成果の概要（和文）：

スフィンゴ脂質代謝は正常妊娠の維持に重要であり、代謝バランスの異常により流産が引き起こされる。今回の研究では、ノックアウトマウスを用いてスフィンゴ脂質代謝異常によって起こる流産のメカニズムの解明を試みた。ELISA 法および免疫染色法により、*Sphk1*<sup>-/-</sup>/*Sphk2*<sup>+/-</sup>の脱落膜組織においてのみ、CXCL1 値が著明に増加していた。その結果、*Sphk1*<sup>-/-</sup>/*Sphk2*<sup>+/-</sup>では、CXCL1 の発現領域に一致して、好中球が著明に浸潤していた。したがって、正常妊娠においては、*Sphk1* や *Sphk2* が発現することにより、過剰な炎症を抑制し、移植片である胎児が、母体の中で平和的に共存することを可能にしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Sphingolipid metabolism is critical for the maintenance of normal pregnancy. Disturbance in sphingolipid metabolism causes early pregnancy loss. In this study, I elucidated the mechanism of pregnancy loss using *sphingosine kinase*-deficient female mice. The CXCL1 levels were markedly increased in the *Sphk1*<sup>-/-</sup>/*Sphk2*<sup>+/-</sup> decidua, where considerable amounts of neutrophils infiltrated, leading to embryonic death. These results suggest that sphingosine kinases might play a central role in conferring immune tolerance on the semiallogeneic embryo-fetal transplant by suppressing excessive inflammation in normal pregnancy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：胎児医学、スフィンゴ脂質

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質と呼ばれる一群の脂質の一つであるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、多様な生物学的活性を有する脂質メディエーターである。S1Pは細胞内で細胞の生存、増殖の制御やカルシウムの動員を引き起こすセカンドメッセンジャーとして作用する一方、細胞表面の S1P 受容体 (S1PR1-5) と呼ばれる Gタンパク質共役受容体に結合し、血管形成、リンパ球の遊走などに非常に重要な役割を果たしている。S1P が近年、特に注目を集めているのは新規免疫抑制剤 FTY720 の登場にある。FTY720 は体内でスフィンゴシンキナーゼ (Sphk) と呼ばれる酵素によってリン酸化されて FTY720 リン酸となり、これが S1P の作用を模倣して S1P 受容体に結合し、胸腺やリンパ節からのリンパ球の遊走を阻害する。さらに FTY720 は再発性多発性硬化症の有力な治療薬として臨床治験段階にある。

S1P は、生体内でスフィンゴシンキナーゼ (Sphk) によってスフィンゴシンがリン酸化されることにより生成される。現在、Sphk には Sphk1 と Sphk2 の 2 種類が知られている。

私はこれまで主に *Sphk* ノックアウトマウスを用いてスフィンゴ脂質代謝の解析を行ってきた。*Sphk1* および *Sphk2* シングルノックアウトマウスの表現型はほとんど正常である一方、*Sphk1/Sphk2* ダブルノックアウトマウスは胎生致死であった。*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* マウスは胎生 11.5~12.5 日目に全身とくに頭部の出血で死亡し、血管内皮細胞の重篤な異常や神経管の閉鎖を含む神経系の発生異常が見られた。

さらに、最近の研究で、私はスフィンゴ脂質代謝経路が妊娠の継続維持に不可欠であることを発見した (Mizugishi *et al.* (2007) *J Clin Invest.* 117: 2993-3006)。スフィンゴ脂質の代謝は正常妊娠中に非常に活性化しており、*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* の雌マウスは不妊を呈する。*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* の雌マウスでは、亢進した代謝経路の一部が遮断されることにより、細胞毒性の強いスフィンゴシンおよびジヒドロスフィンゴシンが子宮内の脱落膜細胞 (decidual cell) および血管内皮細胞に異常に蓄積していた。これらの結果、血管内皮細胞が完全に破壊され、胎児を取り囲む脱落膜 (decidua) 領域における出血および脱落膜細胞の細胞死の著明な増加がおり、母親側の原因により、ほぼ全ての胎児は胎生 7.5~8.5 日目に死亡した。以上の結果はスフィンゴ脂質の代謝経路が子宮内膜脱落膜化 (decidualization) や血管形成において極めて重要な役割を果たしていることを示している。私は妊娠におけるスフィンゴ脂質代謝の役割に焦点を当て、さらに研究

を進めている。

## 2. 研究の目的

(1) スフィンゴ脂質代謝経路の遮断によって引き起こされる流産のメカニズムの解明

ノックアウトマウスを用いた研究から、スフィンゴ脂質代謝バランスの異常によって流産が引き起こされることが明らかになったが、詳細な分子メカニズムについては明らかにされていない。*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* マウスはいわゆる不育症モデルと考えられる。不妊症は人工受精などで治療が可能であるが、不育症については有効な治療法がないのが現状である。このモデルマウスを用いて、流産の分子メカニズムを明らかにし、治療法の開発を試みる。

(2) ヒトの生殖器系におけるスフィンゴ脂質代謝の意義の解明

スフィンゴ脂質代謝経路が妊娠に重要であり、その異常によって流産が引き起こされることは、ノックアウトマウスを用いた研究で明らかになった。しかし、ヒトにおけるスフィンゴ脂質代謝の生物学的意義についてはほとんどわかっていない。*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* マウスで観察される表現型はヒトの習慣性流産の症状と非常によく似ている。したがって、私の研究成果は原因不明の習慣性流産の分子生物学的メカニズムを明らかにし、有効な治療法の開発に道を開く可能性が高い。また、この研究成果は日本が抱えている深刻な少子化問題にも大きく貢献することができる。習慣性流産や不育症の 50% は原因不明であり、私の研究成果はこれらの疾患の原因解明、治療、予防に大きく道を開き、少子化問題の解決の一助となることが期待できる。これらの長期的展望をもち、ヒトの妊娠におけるスフィンゴ脂質代謝の役割についての検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) スフィンゴ脂質代謝経路の遮断によって引き起こされる流産のメカニズムの解明

まず初めに、胎生 7.5 日目の野生型および *Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* の雌マウスの脱落膜 (decidua) を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、いくつかのケモカインのリガンドや受容体の発現が *Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* 脱落膜において著明に増加していた。炎症は正常妊娠の維持に不可欠なイベントである。しかし、過度の炎症は流産のような妊娠の合併

症を引き起こす。*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>+/+</sup>*の雌マウスにおける流産の分子メカニズムを明らかにするために、real-time PCR、ウェスタンブロッティング、免疫染色などを用いて、これらの分子の発現や機能を解析する。

#### (2) ヒトの生殖器系におけるスフィンゴ脂質代謝の意義の解明

ヒトのサンプルを用いた研究を行うにあたり、まず、京都大学および協力病院の倫理委員会に研究計画書を提出する。妊娠初期の人工妊娠中絶あるいは自然流産症例について、患者本人および配偶者の同意が得られた場合においてのみ、脱落膜組織を無菌的に採取し、脱落膜細胞を分離・精製する。得られた細胞を培養し、Sphkの阻害剤やsiRNAを投与し、ケモカインやサイトカインの発現をreal-time PCR法、ELISA法、ウェスタンブロッティング法などを用いて検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) スフィンゴ脂質代謝経路の遮断によって引き起こされる流産のメカニズムの解明

マイクロアレイの結果から、まず、好中球遊走因子の一つである、CXCL1に注目した。妊娠子宮の脱落膜組織(Decidua)および着床間組織(Interimplantation tissues)を用いて、CXCL1値をELISA法により定量したところ、*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>+/+</sup>*の脱落膜組織においてのみ、CXCL1は著明に増加していた。さらに、免疫染色を行ったところ、CXCL1は、Wild-typeでは胎児を囲む脱落膜領域で弱く発現しているのに対して、*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>+/+</sup>*では、吸収されつつある胎児を囲む脱落膜領域で、その発現が顕著に増加していた。その結果、*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>+/+</sup>*では、CXCL1の発現領域に一致して、好中球が著明に浸潤していた。*Sphk1*および*Sphk2*は、正常では、胎児を取り囲む脱落膜組織に発現している。したがって、正常妊娠においては、*Sphk1*や*Sphk2*が発現することにより、過剰な炎症を抑制し、移植片である胎児が、母体の中で平和的に共存することを可能にしていることが明らかになった。他のいろいろな分子についても現在、検討中である。流産を引き起こす鍵となる分子を同定し、その分子の阻害剤などをノックアウトマウスに投与することにより流産の治療法の開発に取り組んでいる。

##### (2) ヒトの生殖器系におけるスフィンゴ脂質代謝の意義の解明

ヒトの脱落膜組織を用いて行う研究計画を京都大学および協力病院の倫理委員会

に提出し、承認を得た。妊娠初期の人工妊娠中絶あるいは自然流産症例について、患者本人および配偶者双方の同意が得られた場合にのみ、脱落膜組織を採取した。サンプルは医療的処置に伴って得られるものであり、研究のための追加の処置は行わず、さらに患者が不利益を被らないよう、プライバシーの保護に十分配慮した。確立された方法に従い、脱落膜組織から脱落膜細胞を単離・精製した。脱落膜細胞を適切な培養液中で培養し、3~4回継代した。この段階でvimentin(脱落膜細胞に対するマーカー)やCD45(白血球に対するマーカー)に対する抗体などを用いて免疫染色を行い、90%以上の細胞が脱落膜細胞であることを確認した。また、8-Bromo-cAMP、progesterone、estrogenで細胞を処理し、再脱落膜化を起こさせる系を確立した。これらの処理により、細胞の形態変化および脱落膜化マーカーの発現を確認した。現在、無処理の脱落膜細胞および再脱落膜化を起こした細胞を用いて、実験を継続中である。

##### 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2件)

- ① Takuwa Noriko, Ohkura Sei-ichiro, Takashima Shin-ichiro, Ohtani Keisuke, Okamoto Yasuo, Tanaka Tamotsu, Hirano Kaoru, Usui Soichiro, Wang Fei, Du Wa, Yoshioka Kazuaki, Banno Yoshiko, Sasaki Motoko, Ichi Ikuyo, Okamura Miwa, Sugimoto Naotoshi, Mizugishi Kiyomi, Nakanuma Yasuni, Ishii Isao, Takamura Masayuki, Kaneko Shuichi, Kojo Shosuke, Satouchi Kiyoshi, Mitumori Kunitoshi, Chun Jerold, Takuwa Yoh. S1P3-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. Cardiovascular Research. 査読有 85 (2010) 484-493. DOI:10.1093/cvr/cvp312
- ② Miyoshi Takashi, Yamashita Kouhei, Arai Toshiyuki, Yamamoto Kokichi, Mizugishi Kiyomi, Uchiyama Takashi. The role of endothelial interleukin-8/NADPH oxidase 1 axis in sepsis. Immunology. 査読有 131 (2010) 331-339. DOI:10.1111/j.1365-2567.2010.03303.x.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水岸 貴代美 (MIZUGISHI KIYOMI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70518448