

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6月8日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791557

研究課題名（和文）胎児-母体間免疫におけるトリプトファン誘導体の作用機序の解明

研究課題名（英文）Role of tryptophan analogue and clarification of its action mechanism in the immunity between embryo-mother's bodies

研究代表者

岡本 威明 (OKAMOTO TAKEAKI)

愛媛大学・教育学部・講師

研究者番号：20398431

研究成果の概要（和文）：

本研究では、妊婦の胎盤および羊膜・絨毛膜・脱落膜中におけるトリプトファン分解酵素の一種である Indoleamine 2,3-dioxygenase: IDO のタンパク発現を検討し、絨毛膜羊膜炎（CAM）および早産との関連性について検討した。検体は、川崎医科大学附属病院で分娩した妊婦 191 名を対象とした。その結果、妊娠初期の胎盤サンプルにおいて、IDO 発現は control 群より約 0.77 倍で低値を示した。また、IDO 発現は CAM の病歴を有する患者の胎盤サンプルにおいて、control 群と比較したところ約 2.29 倍高値を示した。CAM は早産の主な原因であることから、IDO 発現が早産に関しても相関性を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined protein expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the placenta of the pregnant woman and an amnion, chorion, the decidua, and examined association with chorioamnionitis (CAM) and the premature birth. The specimen intended for 191 pregnant women delivered of in a hospital attached to Kawasaki Medical School. As a result, in a placenta sample of the early pregnancy, the IDO manifestation showed low level at approximately 0.77 times from control group. Also, after comparing it with the control group, the IDO expression showed approximately 2.29 times high level in the placenta sample of the patients with a history of CAM. Because CAM was an abortive main cause, it was suggested that IDO expression showed correlation about the premature birth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学、胎児-母体間免疫、トリプトファン、IDO、絨毛膜羊膜炎

1. 研究開始当初の背景

日本では毎年約 100 万件の分娩が行われ、

約 120 万人が出生している。しかし、全妊娠の約 5%が早産、約 15%が流産しているのが

現状である。早産や流産の原因は様々である。1998年、Munnらによって妊娠維持にはIDO活性保持が必須であるということが報告された。IDOの競合的阻害剤である1-メチルトリプトファンによって異系交配の妊娠マウスは全て流産し、同系交配のマウスでは妊娠が維持された。また、IDOの活性により、局所のトリプトファンが枯渇され、母体のT細胞増殖を抑制することで胎児を拒絶から守っていることも解明された。さらに、マウスの実験系において、妊娠初期から中期にかけて胎盤における樹上細胞でIDO発現が強く誘導されることも報告されている。

インドールアミン酸素添加酵素 (Indoleamine 2,3-dioxygenase : IDO) は、トリプトファン-キヌレン代謝経路の律速酵素である。ヒトの肺、小腸、胎盤など多くの組織に分布し、種々の感染症や炎症で強く誘導される。酵素活性は健常時ではほとんど検出されないが、IFN- γ などのTh1タイプのサイトカイン刺激により、主に単球、マクロファージ、樹上細胞など抗原提示細胞において誘導される。特に、抗原提示細胞の樹状細胞のあるサブクラスに発現するIDOは抑制性T細胞を誘導し免疫寛容(免疫抑制)の成立に関与する。つまり、IDOの発現は胎児-母体間免疫における免疫寛容の誘導や免疫抑制に関与し、免疫調節機構において重要な役割を果たしている。

絨毛膜羊膜炎(CAM)は主に、細菌性膣症や頸管炎が上行し、卵膜に波及した結果惹起される炎症性疾患である。近年、早産や前期破水の主な原因の一つとして注目されており、早産の原因の2/3以上にCAMが関与しているとされている。母体に発熱などの臨床徴候を認めるCAMは臨床的CAM(CCAM: clinical CAM)、胎盤病理検査にて炎症所見が認められるものは組織学的CAM(HCAM: histological CAM)と呼ばれる。CAMが早産の主な原因であるのは、細菌によってマクロファージや好中球が集積し、それに伴いIL-8、TNF- α などの炎症性サイトカインが発現し、プロスタグランジンなどの子宮収縮物質を産生するためである。同様にマクロファージや子宮頸管細胞からIL-8が産生され、それによって集積した好中球がタンパク質分解酵素であるエラスターゼを放出することで頸管熟化を促す。このような機序によってCAMは早産の原因となるのである。また、IL-8はリポ多糖(lipopolysaccharide:LPS)のような細菌による刺激でも産生され、さらに、LPSの刺激によってIDO発現が誘発される。このように、CAMが発症して子宮頸管の軟化や陣痛が発来するまでの過程では子宮頸管や羊水中の種々の炎症性サイトカインが重要な働きをしている。

2. 研究の目的

本研究では、妊婦の胎盤(Placenta)および羊膜・絨毛膜・脱落膜(Membranes)中のIDOの発現レベルを検討し、絨毛膜羊膜炎および早産との関連について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク抽出に関しては、胎盤組織をシリコナイズドチューブ(15mL)に入れ、氷上で融かした。各チューブにCell Lysis Bufferを入れホモジナイザーで胎盤を1分間ホモジナイズした。その後、400 \times gで5分間円遠心分離を行い、上清を回収したのち、14000 \times gで30分遠心分離を行い、上清を回収・分注した。

タンパク定量にはBCAキットを用いた。BCA試薬(A)とBCA試薬(B)を50:1となるように混合し、ボルテックスミキサーで攪拌後、サンプル5 μ Lをタンパク定量用96wellに注入した。試薬を100 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベート後、590nmでの吸光度を測定した。

タンパク質の分離にはポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。ゲルはミニプロティアンTXGゲル(バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社)のグラデュエントゲル(%)およびREADY GELS J(BIO RAD社)のグラデュエントゲル(5-10%)を使用した。泳動バッファーは、10 \times Running buffer(Tris base 250mM、Glycine 1.92M、SDS 1%)を用いた。サンプルをサンプルバッファーと混合した後、5分間加熱処理を行いコームにアプライし、100Vで泳動を行った。検出にはウェスタンブロッティング(Western blotting)法によりIDOの発現を検討した。メンブレンはPVDF膜を使用し、100%メタノールにて親水化処理を施した後に転写を行った。転写バッファーは、blotting buffer 100mL、メタノール 200mLにミリQ水 700mLを加え調整し、ブロッキングにはブロックエース(雪印乳業株式会社)を用いた。一次抗体には、和光純薬工業株式会社のINDO purified mouse polyclonal antibody(Bo1P)を用い常温で2時間、4 $^{\circ}$ Cで12時間反応させた。0.1% Tween-PBSで膜を洗い、二次抗体であるECL Peroxidase labeled anti-mouse anti-bodyを常温で1時間振盪させた。ECL Plus溶液を用いて化学発光させた後、IDOのバンドを検出した。免疫染色後、データの画像化にLAS-1000およびLAS-4000(GEヘルスケア・ジャパン株式会社)を用いた。Stripping bufferで膜を洗い流した後、ポジティブコントロールとして β -actinで抗体反応を行い、再び解析を行った。画像解析ソフトImage Jにより各バンドの濃さを定量化し、

β -actin で補正を行い、control (No.43) を基準とし相対的に評価した。

4. 研究成果

胎盤および羊膜・絨毛膜・脱落膜における IDO 発現を図 1 に示す。胎盤では全体的に IDO 発現が認められたが、羊膜・絨毛膜・脱落膜ではステロイド治療患者、SLE 患者、サルコイドーシス患者由来のサンプル等、特異的なサンプルのみ発現が認められた。健常な妊婦由来のサンプル (No.4) を Normal に設定し、全サンプル (n=191) の胎盤における IDO 発現を検討した。



図 1 胎盤および羊膜・絨毛膜・脱落膜における IDO 発現

(1) 分娩様式における検討

分娩様式により、帝王切開群と通常分娩群の 2 群に大別し、胎盤における IDO 発現の比較検討を行った。その結果、Normal と比較した帝王切開群の IDO 発現の平均値は 1.62 倍、通常分娩群は 1.58 倍であった。わずかに帝王切開群が高値を示したが、有意差は認められなかった。

(2) ステロイド治療の有無および特異的疾患の既往における検討

ステロイド治療患者由来の胎盤サンプル (n=15) の IDO 発現を検討したところ、Normal と比較して 1.74 倍であった。また、特異的疾患として全身性エリテマトーデス (SLE) 患者由来の胎盤サンプル (n=3) を用い検討を行った。その結果、SLE 患者由来のサンプルの平均値は Normal と比較して 1.51 倍高値であった。いずれも Normal と比較すると高値を示しているが、全胎盤サンプルの平均値 (1.68) と比較するとステロイド治療を行っている胎盤サンプルはわずかに高値、SLE 患者由来の胎盤サンプルは低値を示す傾向があった。

(3) 妊娠経過における検討

(1)(2) の検討を行う過程で妊娠初期での IDO 発現は低値を示す傾向が認められたため、妊娠初期の胎盤サンプルにおける IDO 発現について検討を行った。その結果、妊娠初期の胎盤サンプルにおける IDO 発現は Normal と比較し 0.77 倍と低値を示した。よって、妊娠初期には IDO 発現は誘導されないといえる。マウスの実験系では、IDO の酵素活性については妊娠初期に、IDO のタン

パク発現および転写活性については妊娠中期のみ強く誘導されることが見出されている (図 2)。今回の我々の実験では、ヒトにおける IDO のタンパク発現は妊娠中期から後期にかけて強く誘導されることが見出された。これより、IDO のタンパク発現の時期はヒトとマウスは同様であるが、発現の継続期間が異なることが分かった。

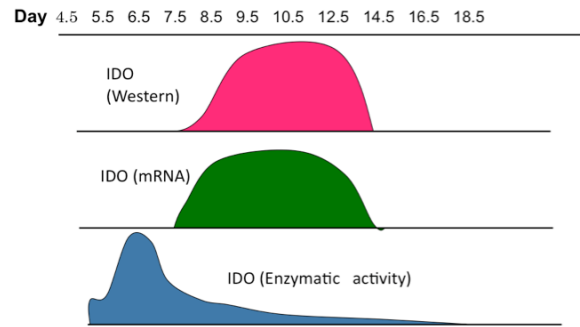


図 2 マウス胎盤における IDO 発現

(4) 絨毛膜羊膜炎の有無における検討

IDO の発現は、リポ多糖 (lipo polysaccharide : LPS) のような細菌の刺激によって誘導されるという点に着目し、CAM の有無による検討を行った。CAM とは、絨毛膜や羊膜に感染が認められる状態である。CAM の進行度は、好中球の浸潤レベルによって I ~ III 期に分類され、その病理診断画像を図 8 に示す。また、CAM は早産の主な原因疾患といわれており、その機序を図 9 に示す。CAM の有無による検討を行った結果、絨毛膜羊膜炎患者由来の胎盤サンプルにおける IDO 発現を Normal と比較すると、2.29 倍高値であった (図 3)。

さらに CAM を I - III の重症度別に比較したところ、CAM I の平均値は 2.36、CAM II の平均値は 2.54、CAM III の平均値は 1.91 であった。CAM の重症度と IDO 発現に相関は認められなかったが、CAM II は比較的強い傾向があった。

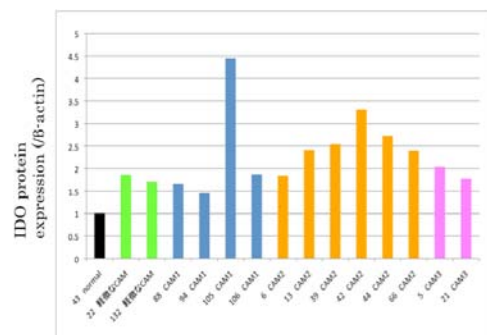


図 3 絨毛膜羊膜炎(CAM)患者由来の妊婦胎盤における IDO 発現

分娩様式における検討で、帝王切開群がわずかに高値を示したのは、侵襲行為によるものであると考えられる。生体は侵襲に対して組織の機能を保ち、病原体の侵入を防ぐために神経系・内分泌系・免疫系のさまざまな反応を引き起こす。組織の損傷と病原体による汚染は、直接、免疫細胞を活性化してサイトカインなどの放出を高める。LPSをはじめとする PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) が免疫細胞表面の受容体により認識され、細胞の活性化を高めサイトカイン産生を高める。IDO は LPS 刺激によって IDO 発現が誘発されるため、帝王切開を行う際の侵襲行為によって IDO が発現したと考えられる。そのため帝王切開群では通常分娩群と比較して IDO 発現は高値であったと推測された。

ステロイド治療患者由来におけるサンプルで高値を示したのは、ステロイドホルモンが免疫応答に関与しているためだと考えられる。妊娠中ではステロイドホルモンであるエストロゲン・プロゲステロンの血清中の濃度は急激に上昇する。サルの実験系においてエストロゲンを阻害すると流産・早産が増加するという報告がある。また、プロゲステロンは子宮内膜を着床に適した分泌内膜に促進する働きがあり、妊娠維持のために重要な役割を果たしていると考えられる。そのため、ステロイド治療患者由来のサンプルでの IDO 発現は高値を示したと考えられる。

SLE 患者由来のサンプルで低値を示したのは、SLE など膠原病患者は健常人と比べて抑制性 T 細胞の割合が少ない。IDO の酵素活性は、IFN- γ や TNF- α などの Th 1 タイプのサイトカイン刺激により、主に単球、マクロファージ、樹上細胞など抗原提示細胞に誘導される。IDO は抑制性 T 細胞を誘導し免疫寛容 (免疫抑制) の成立に関与することで胎児-母体間免疫における免疫寛容の誘導や免疫抑制に関与し、免疫調節機構において重要な役割を果たしている。しかし、抑制性 T 細胞の割合が少ないということは、それを誘導している IDO も少ないと推測される。そのため SLE 患者由来のサンプルでの IDO 発現は低値を示したと考えられる。

図 2 より、マウスの実験系では、IDO のタンパク発現および転写活性については妊娠中期のみ強く誘導され、妊娠初期および後期に発現は認められないことが分かる。しかし、ヒトでは妊娠中期から後期にかけて強く誘導され、妊娠初期のみ発現が認められなかった。これより、ヒトはマウスと異なり、妊娠後期での IDO 発現も妊娠維持に関与していると考えられる。

今回の我々の実験では、ヒトにおける IDO のタンパク発現のみの検討であったため、酵素活性についてもマウスと同様の結果にな

るか、さらに検討を行いたいと考える。

絨毛膜羊膜炎患者由来のサンプルで IDO 発現が高値を示したのは、絨毛膜羊膜炎 (CAM) の発症機序より、以下のように推測する。CAM は細菌の上行感染によって発症する。細菌によってマクロファージや好中球が集積し、それに伴い IL-8、TNF などの炎症性サイトカインが発現し、プロスタグランジンなどの子宮収縮物質を産生する。また、IL-8 はリポ多糖 (lipopolysaccharide:LPS) のような細菌による刺激でも産生され、LPS 刺激によって IDO の発現は誘発される。そのため、絨毛膜羊膜炎患者由来のサンプルでの IDO 発現は高値を示したと推測された。CAM の重症度と IDO 発現に相関は認められなかったが、CAM II が比較的高値を示した。今回の実験では胎盤および絨毛膜・羊膜・脱落膜を潰してタンパクの抽出を行ったため局所の発現についての検討を行うことが出来なかったが、局所的な免疫染色を行えば CAM の重症度と IDO 発現について結果が得られるのではないかと考える。また、図 4 に示されるように CAM は早産の主な原因であるということから、IDO の発現に関しても相関性を示す可能性も考えられる。他にも早産は、メタロプロテアーゼによるコラーゲンの再配列によっておこる軟化作用やプロスタグランジンの子宮収縮作用によっても誘発されるので、これらの物質についてもさらに検討を行う必要がある。

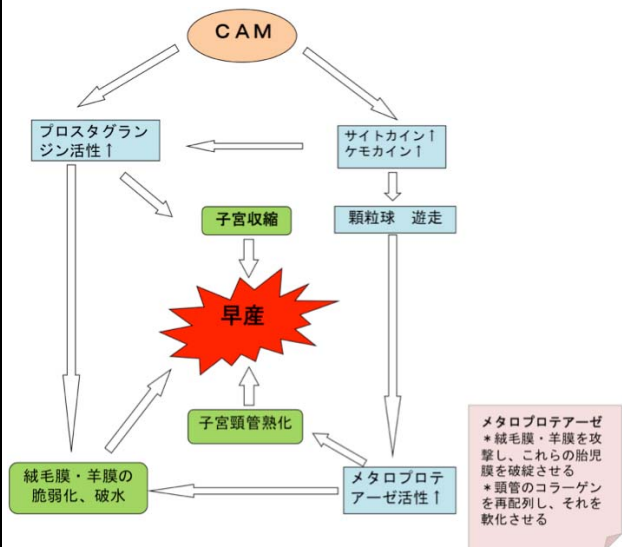


図 4. 絨毛膜羊膜炎(CAM)と早産の関係

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)

- ① 岡本 威明、宮脇 智恵 他 8 名 (10 人中 1 番目) トリプトファンサプリメント摂取による好酸球増多筋痛症発症機序の

解明、生物機能研究、査読無、15 巻、2011 年、p16-23

[学会発表] (計 3 件)

- ① Takeaki Okamoto, 他 3 名 (4 名中 1 番目), Effect of peptides derived from casein on degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells, International Congerence on Food Factors (ICoFF), 2011 年 11 月 20 日、台北国際会議センター (台湾)
- ② 張 良実、岡本 威明、他 6 名 (8 名中 2 番目) 母体ならびに胎児における Fractalkine/CXCL1 (FRK) の動態の解析、第 6 3 回日本産科婦人科学会、2011 年 8 月 30 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ③ 岡本 威明、トリプトファンサプリメント摂取による好酸球増多筋痛症発症機序の解明、第 15 回生物機能研究会、招待講演、2011 年 7 月 2 日、九州大学 (福岡)

[図書] (計 1 件)

- ① 岡本 威明、食と健康を支援する (第 2 集)、2012 年、290 ページ。

[その他]

ホームページ等

<http://kenqweb.office.ehime-u.ac.jp/Profiles/0003/0003183/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 威明 (OKAMOTO TAKEAKI)
愛媛大学・教育学部・講師
研究者番号：20398431

(2) 研究者協力者

刀裨 重信 (TONE SHIGENOBU)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70211399