

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592394

研究課題名(和文) 妊娠における免疫介在脂質メディエーターの生理的・病理的意義に関する研究

研究課題名(英文) Physiological and pathological roles of lipid immune mediators in pregnancy

研究代表者

藤井 知行 (FUJII, TOMOYUKI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40209010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：オートタキシン(ATX)/リゾリン酸(LPA)系とオメガ3/オメガ6脂肪酸(3/6)系とに注目し、また妊娠高血圧症候群(PIH)と早産とに焦点を当てて研究した。ATX/LPA系では母体血中ATX濃度とLPA濃度が妊娠週数とともに増加すること、LPA受容体が胎盤で発現されていること、PIHにおいてATXの発現が低下していること、LPAがtrophoblastのCyclooxygenase-2発現に影響していることが分かった。3/6系については、3優位になると早産が予防され、子宮の炎症が抑制され、3系代謝産物の濃度が上昇し、レゾルビン静脈注射により早産が予防されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of autotaxin (ATX)/lysophosphatidic acid (LPA) system and omega3/omega6 fatty acids system during pregnancy. As for ATX/LPA system, both ATX and LPA concentrations in maternal blood increased along with the weeks of gestation. Placental trophoblasts expressed LPA3, a receptor for LPA. Expression of ATX in placenta decreased in pregnancy-induced hypertension compared to normal pregnancy. A specific agonist for LPA3 enhanced the expression of cyclooxygenase2 in trophoblasts. As for omega3/omega6 fatty acids system, abundance of omega3 fatty acids reduced the incidence of preterm birth in mice model. In those mice, inflammation in the uterus was suppressed and high level of metabolites in omega3 fatty acids system was observed. The intravenous injection of resolvin to LPS exposed pregnant wild type mice lowered the incidence of preterm birth.

研究分野：生殖免疫学、生殖内分泌学、周産期医学

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：脂質メディエーター リゾフォスファチジン酸 オートタキシン 妊娠 胎盤 オメガ3脂肪酸 妊娠高血圧症候群 早産

1. 研究開始当初の背景

妊娠の成立と維持には、特殊な移植免疫反応、いわゆる妊娠免疫反応が係わっていると考えられる。それにはトロホプラストが発現するHLA抗原系や、妊娠局所の多くのサイトカイン、ケモカインなどが関与していることが分かっており、それらがうまく働かないと、妊娠高血圧症候群や流産、早産などの種々の妊娠合併症が発症すると考えられている。

近年、リゾリン脂質の1つであるリゾリン酸 lysophosphatidic acid (LPA) と、必須脂肪酸のうちオメガ3脂肪酸とオメガ6脂肪酸が、多くの生物活性を有し、シグナルメディエーターとして、生体の免疫機能調節に関与していることが明らかになってきた。

LPAは、多くの生物活性を有し、生体の機能調節に関与している。LPAは、血小板、線維芽細胞など多くの種類の細胞により産生されているが、同時に、オートタキシン(ATX)によって、細胞外に存在するリゾフォスファチジルコリン(LPC)から産生されている。ATX活性は細胞外液中のLPA活性と強く相関するとされている。産科領域においては、血中ATXは抗原濃度、活性ともに妊娠中上昇し、分娩後ただちに非妊娠レベルまで低下することが知られている。また切迫早産症例において血中ATX活性が高値を示し、またLPAが子宮筋収縮作用を有することも指摘されている。LPAの受容体であるLPA-3についてもノックアウトマウスの実験からマウス初期胚の着床に不可欠であることがわかってきた。

また、必須脂肪酸は、ヒトの体内では合成されないため、経口摂取によってのみ得ることができる。必須脂肪酸の中には、エイコサペンタエン酸(EPA)・ドコサヘキサエン酸(DHA)□リノレイン酸といったオメガ3脂肪酸と、アラキドン酸系(プロスタグランディン・ロイコトリエン)やリノール酸などのオメガ6脂肪酸がある。近年、オメガ3/オメガ6脂肪酸の免疫メディエーターとしての働きが注目されている。オメガ3脂肪酸は、炎症反応に対して抑制的に働き、炎症を収束させる作用を持つ。一方、オメガ6脂肪酸は、炎症惹起に関わる脂肪酸である。オメガ3/オメガ6脂肪酸に関する研究は、高脂血症、循環器系、発癌など多くの分野で古くから行われてきたが、産婦人科領域における研究は少なかった。そんな中、オメガ3脂肪酸を大量に摂取している集団において、早産が防止されるということも報告された。このようにLPA/ATX系やオメガ3/オメガ6脂肪酸系が、妊娠の成立・維持の生理と病理に、局所の免疫介入シグナル伝達系として重要な関与をしている可能性が高いが、ヒトにおいては、そうした研究はほとんどなかった。

2. 研究の目的

LPA/ATX系については、LPA合成の主要酵素であるATXと、LPA-3をはじめとするLPAの受容体に注目し、またオメガ3/オメガ6脂肪

酸系については、妊娠局所の免疫系との炎症を介した相互作用に注目して、これら免疫介入脂質メディエーターの、妊娠生理と、妊娠高血圧症候群や早産などの妊娠病理における意義を明らかにすることを目的とする。

A. 妊娠の生理と病理におけるLPA/ATX系の解析

妊娠の生理における意義については、妊娠各期の胎盤におけるLPA受容体の発現を検討する。また、LPAのLPA受容体を介した細胞刺激が胎盤トロホプラストの細胞機能にどのような影響を与えるか明らかにする。妊娠病理における意義については、妊娠高血圧症候群に注目し、これらの患者の胎盤におけるATXの変化を解明する。

B. 妊娠の生理と病理におけるオメガ3/オメガ6脂肪酸による免疫調節の解析

動物実験として、オメガ6脂肪酸からオメガ3脂肪酸を大量に体内で合成するトランスジェニックマウスを使用し、特に妊娠病理、中でも早産におけるオメガ3/オメガ6脂肪酸の意義を解析し、新たな早産予防薬の開発を目指した。

3. 研究の方法

ヒト臨床検体や臨床情報を使用する実験、検討は、すべて施設倫理委員会承認のもと、検体、情報提供者から書面によるインフォームドコンセントを得て、実施した。LPA/ATX系の解析については、分娩あるいは帝王切開時、流産時に採取した血液と妊娠各期の胎盤を用いて行った。オメガ3/オメガ6脂肪酸系の解析については、オメガ3脂肪酸体内合成トランスジェニックマウスを使用し、併せて早産マウスモデルを作成して、動物実験を行った。

A. オートタキシン(ATX)/リゾリン酸(LPA)系と妊娠の生理・病理

(1) 正常妊娠における血中ATX濃度と血中LPAの関係

正常妊娠の妊娠初期、中期、後期、産褥期における母体血中ATX濃度と母体血中LPA濃度を測定した。

(2) 正常妊娠の胎盤におけるLPA受容体発現

受容体のうち、特に妊娠との関わりが報告されているLPA-3の胎盤における発現の有無、発現部位を、妊娠初期、中期、後期の胎盤を用いて、免疫組織化学染色で検討した。

(3) 妊娠高血圧症候群(PIH)とATX

正常妊娠と妊娠高血圧症候群(PIH)の胎盤におけるATXの発現量を、選択的帝王切開時の胎盤を用いて、定量的RT-PCR法により検討した。また、PIH発症時期による発現量の違いについても、早発型と盤発型に分け、同様に検討した。

(4) ATX/LPA系と細胞機能

ATX/LPA系がtrophoblastの細胞機能

に及ぼす影響を検討するため、trophoblast 細胞株 HTR-8 に LPA-3 を遺伝子導入した。この細胞株に特異的 LPA-3 agonist T13 を作用させて、細胞機能の変化を観察した。

B. オメガ3 / オメガ6 脂肪酸系と妊娠の生理・病理、特に早産の病態における意義

(1) オメガ3 脂肪酸の早産予防効果

FAT1 マウスとそのワイルドマウスに、オメガ6 脂肪酸を大量に含む餌を食べさせ、FAT1 マウスはオメガ3 脂肪酸リッチでありながらオメガ6 脂肪酸が不足しない状態にし、ワイルドマウスはオメガ6 脂肪酸リッチにした上で、それぞれの妊娠マウスの子宮頸部に lipopolysaccharide (LPS) を 5~50 μ g/body 注射し、早産を誘発した。

(2) マウス妊娠局所の組織学的変化の検討

マウス子宮頸部および子宮体部へのマクロファージ浸潤数を、抗 F4/80 抗体による免疫組織化学染色で検討した。

(3) LPS 注射に伴う子宮筋層内の炎症性サイトカイン産生

LPS 注射 6 時間後のマウス子宮体部筋層における炎症性サイトカイン interleukin-6 と interleukin-1 発現量を定量的 RT-PCR により検討した。

(4) メタボローム解析による脂質代謝物解析

FAT-1 マウスとワイルドマウス、LPS 注射群と生理食塩水注射群の 4 群で、子宮における脂質代謝物をメタボローム解析により比較検討した。

(5) レゾルピンによる早産予防作用

上記研究で、18-HEPE の子宮内濃度上昇が確認された。18-HEPE はさらに代謝されてレゾルピンとなる。レゾルピンは積極的な抗炎症作用を示す物質であることを考え、レゾルピンのうち、レゾルピン E3(RevE3) を LPS 注射した妊娠ワイルドマウスに静脈注射し、その後の早産率を検討した。

4. 研究成果

A. オートタキシン(ATX)/リゾリン酸(LPA)系と妊娠の生理・病理

(1) 正常妊娠における血中ATX濃度と血中LPAの関係

正常妊娠における母体血中ATX濃度の中央値は非妊娠時に比べ、妊娠週数の増加とともに増加し、分娩後速やかに非妊娠時レベルまで低下した。同一個人を継続的に追跡測定しても同様の推移を示した。また、母体血中LPA濃度も妊娠週数の増加とともに上昇した。母体血中ATX濃度と母体血中LPA濃度は強い相関を示した。

(2) 正常妊娠の胎盤におけるLPA-3発現

正常妊娠の胎盤を抗LPA-3抗体で免疫染色したところ、LPA-3は妊娠初期、中期、後期いずれの次期においても発現されて

いた。しかし、発現部位はATXと異なり、STとEVTには発現しているが、CTには発現していないことがわかった。

(3) 妊娠高血圧症候群(PIH)とATX

PIHでは正常妊娠に比べ、有意に胎盤のATXの発現量が低いことがわかった。PIH患者における血中ATX濃度の低下は、胎盤における発現低下によることがわかった。次にPIHの発症時期による違いを検討したところ、ATXの発現低下は、早発型PIHでより顕著であることがわかった。ATXの低下がLPA産生の低下を招き、胎盤形成期におけるトロホプラストの増殖、浸潤を障害して、胎盤形成不全を起こし、PIHを発症させていると示唆された。

(4) ATX/LPA系と細胞機能

T13を添加後24時間時間の時点でのCyclooxygenase-2のmRNA量がT13の濃度依存性に増加していることがわかった。ATX/LP系がCOX-2を介して炎症をはじめとする細胞機能を調節している可能性が示唆された。

B. オメガ3 / オメガ6 脂肪酸系と妊娠の生理・病理、特に早産の病態における意義

(1) オメガ3 脂肪酸の早産予防効果

LPSを15 μ g/body 子宮頸部に注射したところ、FAT1 マウスでは、ワイルドマウスに比べ、有意に早産率が低かった。また、ワイルドマウスにオメガ6 脂肪酸を大量には含まない通常の餌を食べさせると、早産しないことがわかった。以上より、オメガ3 / オメガ6 バランスがオメガ6 に傾くと早産が誘発され、オメガ3 に傾くと早産が抑制されることがわかった。

(2) マウス妊娠局所の組織学的変化の検討

FAT-1マウスとワイルドマウスを比較すると、LPS注射後の子宮頸部へのクロファージ浸潤数はFAT-1マウスで有意に低下していた。

(3) LPS 注射に伴う子宮筋層内の炎症性サイトカイン産生

FAT-1マウスとワイルドマウスを比較すると、LPS注射後の子宮体部筋層内 interleukin-6 と interleukin-1 産生は、FAT-1マウスで有意に抑制されていた。

(4) メタボローム解析による脂質代謝物解析

オメガ6系については、fat-1において、COX代謝産物であるPGD2, PGE2, PGF2a濃度が減少していた。一方、オメガ3系については、12/15-LOX代謝産物の18-HEPE、およびp-450代謝産物の17(18)-EpETE濃度が上昇していた。

(5) レゾルピンによる早産予防作用

LPS注射により、RevE3を投与しなかった群では100%早産したが、RevE3投与群では、42%が早産したのみで、RevE3投与群において有意に早産率が低下していた。また、RevE3投与群で早産が回避できた胎児の97%が生存していることも確認され

た。

以上より、免疫介入脂質メディエーター系のうち、ATX/LPA系は妊娠の生理と病理、特にPIHの病理と関連性を有することが示唆された。また、オメガ3/オメガ6脂肪酸系は、早産の病理に関連性を有し、特にオメガ3系代謝産物であるレゾルビンが早産予防効果を有し、新たな早産予防薬の候補になることが示唆された。

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)

- (1) Yamashita A, Kawana K, Tomio K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Masuda K, Furuya H, Nagamatsu T, Nagasaka K, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yamashita T, Taketani Y, Kang JX, Kozuma S, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T: Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth. Sci Rep. 2013; 3: 3113 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 山下亜紀、川名敬、有田誠、田口歩、古屋仁美、富尾賢介、長阪一憲、永松健、織田克利、矢野哲、藤井知行、上妻志郎：EPA(エイコペンタエン酸)の活性代謝物は新規の早産予防薬になりうる。第65回日本産科婦人科学会学術講演会。札幌。2013。5
- (2) 市川麻佑子、山下隆博、永松健、板岡奈央、佐山晴亮、川名敬、藤井知行、上妻志郎：正常妊娠における母体血中LPA濃度の推移と妊娠高血圧症候群における胎盤のATX発現量の評価。第65回日本産科婦人科学会学術講演会。札幌。2013。5
- (3) 山下亜紀、川名敬、富尾賢介、田口歩、小島聡子、佐山晴亮、永松健、織田克利、山下隆博、藤井知行、上妻志郎、武谷雄二：オメガ3脂肪酸(EPA, DHA等)による早産予防効果とその機序に関する研究。第64回日本産科婦人科学会学術講演会。神戸。2012。4。

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 知行 (FUJII TOMOYUKI)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：40209010

(2) 研究分担者

川名 敬 (KAWANA KEI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60311627