

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591600

研究課題名(和文) スフィンゴ脂質代謝異常による流産のメカニズムの解明と治療薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism and development of therapeutic strategies for the sphingolipid-mediated pregnancy loss

研究代表者

水岸 貴代美 (Mizugishi, Kiyomi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70518448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシンキナーゼ遺伝子改変マウスでは、妊娠中、好中球遊走因子であるCXCL1やCXCL2の発現が、胎児-母親組織境界領域で著明に増加していた。その結果、好中球が同領域に異常に浸潤して組織障害が起こり、胎児が妊娠早期に死亡した。好中球浸潤を阻害する薬をマウスに投与すると、流産の発症率は減少した。ヒトの脱落膜細胞にスフィンゴシンキナーゼの阻害剤を投与すると、CXCL1やIL-8などの好中球遊走因子の分泌が増加した。以上より、スフィンゴ脂質代謝は自然免疫系を制御することにより、母胎免疫寛容に重要な役割を果たしており、我々の成果は、ヒトの原因不明の不育症の治療法開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Perturbation of the sphingolipid pathway by disruption of the sphingosine kinase gene (Sphk) during pregnancy caused unusually high expression of neutrophil chemoattractants, CXCL1 and CXCL2, in the decidua, leading to a massive infiltration of neutrophils into the fetomaternal interface with enhanced oxidative damage, resulting in early fetal death. The blockage of neutrophil influx protected Sphk-deficient mice against pregnancy loss. Notably, a similar result was obtained in human decidua cells, in which Sphk deficiency dramatically increased the secretion of CXCL1 and IL-8. In conclusion, our findings suggest that the sphingolipid metabolic pathway plays a critical role in fetomaternal tolerance by regulating innate immunity at the fetomaternal interface both in mice and humans, and it could provide novel insight into the development of therapeutic strategies to treat idiopathic pregnancy loss in humans.

研究分野：スフィンゴ脂質

キーワード：スフィンゴ脂質 妊娠 不育症 自然免疫 ケモカイン

## 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治療薬として承認されている。

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、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>* の雌マウスは不育症様の症状を呈する。*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。以上の結果より、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が明らかになった。

## 2. 研究の目的

スフィンゴ脂質代謝は、正常妊娠の維持に重要な役割を果たしており、その代謝異常によ

り流産が起こる。しかし、その詳細なメカニズムについては、明らかではない。本研究では、1) スフィンゴ脂質代謝異常によって引き起こされる流産のメカニズムの解明、2) 流産の治療薬の開発、3) 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を目指して研究を行う。

## 3. 研究の方法

1) スフィンゴ脂質代謝異常によって引き起こされる流産のメカニズムの解明

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組織を用いてマイクロアレイ解析を行う。*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* 脱落膜において、有意に増加あるいは減少している分子に焦点を当て、ELISA 法、免疫組織染色法などにより、その役割について解析する。

2) 流産の治療薬の開発

*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* 雌マウスの流産発症に關与する分子が同定できれば、その分子の阻害剤あるいは中和抗体をマウスに投与し、治療効果・副作用の有無について検討する。

3) ヒトの生殖器系におけるスフィンゴ脂質代謝の意義

自然流産あるいは人工妊娠中絶症例より得られたヒトの脱落膜組織から、脱落膜細胞を分離精製し、細胞培養を行う。得られた培養細胞に Sphk の阻害剤を投与し、ELISA 法などを用いて、動物実験で得られた研究結果について検討する。

## 4. 研究成果

1) スフィンゴ脂質代謝異常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より、*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* の脱落膜組織では、ケモカインのリガンドや受容体の発現が上昇していた。この中で著明に発現が増加していた、好中球遊走因子である CXCL1、CXCL2 に着目した。妊娠子宮の脱落膜組織および着床間組織を用いて、ELISA 法により CXCL1 値を定量したところ、*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* の脱落膜組織においてのみ、CXCL1 は著増していた (野生型に比して、約 1000 倍)。次に免疫組織染色を行ったところ、CXCL1 は、野生型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取り囲む脱落膜領域で、その発現が著明に増加していた。CXCL2 についても同様の結果が得られた。その結果、*Sphk1<sup>-/-</sup>Sphk2<sup>-/-</sup>* では、CXCL1、CXCL2 の発現領域に一致して、好中球が著明に浸潤していた。さらに、tissue factor などの発現も上昇しており、多量の好中球の組織浸潤により重度の組織障害が起こり、胎児が死に至ることが明らかになった。

## 2) 流産の治療薬の開発

野生型に比べて、*Sphk1*<sup>-/-</sup>*Sphk2*<sup>-/-</sup>の雌マウスの末梢血では、白血球数、好中球数が有意に増加していた。さらに、*Sphk1*<sup>-/-</sup>*Sphk2*<sup>-/-</sup>の骨髄では、顆粒球系の細胞が増加していた。脱落膜組織、末梢血、骨髄を用いた解析結果を考慮し、組織への好中球の浸潤を阻害する実験を行った。CXCL1とCXCL2の受容体であるCXCR2の選択的阻害剤、および好中球の中和抗体を*Sphk1*<sup>-/-</sup>*Sphk2*<sup>-/-</sup>の雌マウスに投与したところ、約40%で流産の発症を抑制することができた。以上より、CXCR2阻害剤、好中球の中和抗体は、スフィンゴ脂質代謝異常を介した流産の治療ターゲットとなることが示された。

## 3) ヒトの生殖系におけるスフィンゴ脂質代謝の意義

自然流産あるいは人工妊娠中絶症例から得られた脱落膜組織から、脱落膜細胞を分離・精製し、細胞培養を行った。得られた細胞にSphkの阻害剤を投与し、回収した細胞上清中のケモカインやサイトカインをELISA法により測定した。その結果、Sphk阻害剤を投与すると、脱落膜細胞からCXCL1やIL-8の分泌が著明に増加した。その他のサイトカインには大きな変化はみられなかった。以上より、ヒトの脱落膜細胞においても、マウスと同様の現象がみられることが明らかになった。

## 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10件)

Arai Yasuyuki, Yamashita Kouhei, Kuriyama Katsutoshi, Shiokawa Masahiro, Kodama Yuzo, Sakurai Toshiharu, Mizugishi Kiyomi, Uchida Kazushige, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi, Kudo Masatoshi, Okazaki Kazuichi, Strober Warren, Chiba Tsutomu, Watanabe Tomohiro. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- $\gamma$  Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *The Journal of Immunology*. 査読有 195, 2015, 3033-3044. DOI: 10.4049/jimmunol.1500971.

Arai Yasuyuki, Mizugishi Kiyomi, Nonomura Kazuhiko, Naitoh Katsuki, Takaori-Kondo Akifumi, Yamashita Kouhei. Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 査読有 21, 2015, 564-569. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.04.011.

Mizugishi Kiyomi, Inoue Takuya, Hatayama Hiroshi, Bielawski Jacek, Pierce S. Jason, Sato Yukiyasu, Takaori-Kondo Akifumi, Konishi Ikuo, Yamashita Kouhei. Sphingolipid pathway regulates innate immune responses at the fetomaternal interface during pregnancy. *The Journal of Biological Chemistry*. 査読有 290, 2015, 2053-2068. DOI: 10.1074/jbc.M114.628867.

Arai Yasuyuki, Yamashita Kouhei, Mizugishi Kiyomi, Nishikori Momoko, Hishizawa Masakatsu, Kondo Tadakazu, Kitano Toshiyuki, Kawabata Hiroshi, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi. Risk factors for late-onset neutropenia after rituximab treatment of B-cell lymphoma. *Hematology*. 20, 2015, 196-202. DOI: 10.1179/1607845414Y.0000000188.

Arai Yasuyuki, Yamashita Kouhei, Mizugishi Kiyomi, Kondo Tadakazu, Kitano Toshiyuki, Hishizawa Masakatsu, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi. Risk factors for hypogammaglobulinemia after allo-SCT. *Bone Marrow Transplantation*. 49, 2014, 859-861. DOI: 10.1038/bmt.2014.28.

Arai Yasuyuki, Nishinaka Yoko, Arai Toshiyuki, Morita Makiko, Mizugishi Kiyomi, Adachi Souichi, Takaori-Kondo Akifumi, Watanabe Tomohiro, Yamashita Kouhei. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 443, 2014, 556-561. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.007.

Arai Yasuyuki, Yamashita Kouhei, Mizugishi Kiyomi, Watanabe Tomohiro, Sakamoto Soichiro, Kitano Toshiyuki, Kondo Tadakazu, Kawabata Hiroshi, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi. Serum neutrophil extracellular trap levels predict thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 19, 2013, 1683-1689. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.09.005.

Yamashita Kouhei, Miyoshi Takashi, Arai Yasuyuki, Mizugishi Kiyomi, Takaori-Kondo Akifumi, Ueyama Takehiko. Enhanced generation of reactive oxygen species by interferon- $\gamma$  may have contributed to successful treatment of invasive pulmonary aspergillosis in a patient with chronic granulomatous disease. *International Journal of Hematology*. 97, 2013, 505-510. DOI: 10.1007/s12185-013-1315-y.

Arai Yasuyuki, Yamashita Kouhei, Mizugishi Kiyomi, Watanabe Tomohiro, Kondo Tadakazu, Kitano Toshiyuki, Kawabata Hiroshi, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi. Familial Mediterranean fever mutations in a patient with recurrent episodes of acute respiratory distress syndrome. *Clinical Immunology*. 147, 2013, 58-60. DOI: 10.1016/j.clim.2013.02.016.

Arai Yasuyuki, Yamashita Kouhei, Mizugishi Kiyomi, Takaori-Kondo Akifumi, Chiba Tsutomu, Watanabe Tomohiro. The implications of myelodysplastic syndrome - associated chromosomal abnormalities in the development of graft-versus-host disease. *European Journal of Haematology*. 90, 2013, 525-530. DOI: 10.1111/ejh.12100.

〔学会発表〕(計 3 件)

水岸 貴代美、スフィンゴ脂質代謝異常による胎児発育障害のメカニズムの解明、第 115 回 日本小児科学会、福岡、2012 年 4 月 20 日

水岸 貴代美、正常妊娠および不育症におけるスフィンゴ脂質代謝の意義、第 48 回 日本周産期・新生児医学会学術集会、大宮、2012 年 7 月 9 日

Mizugishi Kiyomi, Yamashita Kouhei. Sphingolipid Pathway Regulates Innate Immune Responses at the Fetomaternal Interface during Pregnancy. *Experimental Biology* 2015, Boston, March 31, 2015.

## 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：7 0 5 1 8 4 4 8