

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659509

研究課題名(和文)胎児子宮内発育遅延の新しい病因としての自然免疫受容体NOD1リガンドの解析

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

研究代表者

原 寿郎 (HARA, TOSHIRO)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40150445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000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。母獣に投与したNod1リガンドは胎仔へ経胎盤移行した。Nod1は主に胎仔血管などで発現し、その刺激により主に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、主に胎仔血管で炎症応答を誘導し、IUGRやIUFDを惹起することが示唆された。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 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 1) 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 regarding the effects of direct activation of Nod1 on fetus or newborn. In this study, we demonstrated that administration of Nod1 ligand to pregnant mice induced intrauterine fetal death and growth restriction. We also found that fetuses were affected by transplacental passage of maternal Nod1 ligand. We examined the role of Nod1 signaling in a fetal mouse with a focus on the development of vasculopathy. Our observation suggests a possible link between Nod1 ligands-mediated activation of the innate immune system in fetus and IUGR and might offer a new strategy to improve the long-term cardiovascular health of IUGR cases.

研究分野：免疫学、小児科学

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：自然免疫 子宮内胎児発育遅延 子宮内胎児死亡

1. 研究開始当初の背景

NOD-like receptor (NLR)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应答し、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、川崎病に関する一連の研究のなかで、NOD1 リガンドがマウスに川崎病類似の血管炎を惹起することを明らかにした (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011)。また、NOD1 リガンドによりマウスで動脈硬化が促進されることも見出した (J Immunol. 2014, under revision)。

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 などと流早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などのリスクとなるが、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、さらに一部のヒト IUGR 患者血清から NOD1 刺激活性を見出した。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し、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 (流早死産の有無) を確認し、分娩がなければ妊娠 16 日目に安楽死させた。仔の生死、仔の重量測定、母獣と仔の病理評価を行った。

次に、Nod1 リガンド投与後の母獣胎児への影響を評価するため、妊娠 14 日目の C57BL/6 マウスに Nod1 リガンドを皮下投与し、6 時間および 48 時間後に安楽死させた。母獣血清、および胎盤と胎児のホモジネート遠心後上清を回収した。Cytometric bead array 法に基づいた Mouse Inflammation Kit (Becton Dickinson) および Griess 法に基づいた NO₂/NO₃ Assay Kit - C II (同人化学研究所) を用いて、血清またはホモジネート上清中の炎症性サイトカインおよび一酸

化窒素を測定した。

(2) Nod1 リガンドの経胎盤移行の評価

方法 (1) で得られた胎仔ホモジネート上清を質量分析計 (LC-MS) に供し、Nod1 リガンドの有無を評価した。

(3) 胎仔各組織における Nod1 リガンドに対する反応性の評価

まず、胎仔における Nod1 リガンド作用組織を同定するため、受胎後 18 日目の胎仔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、胎仔各組織における 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 時間後の胎仔各組織を採取し、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。

また、受胎後 18 日目の胎仔から各組織を採取し、Nod1 リガンドを添加した D-MEM 培地で 24 時間培養した。培養上清を回収し、Cytometric bead array 法に基づいた Mouse Inflammation Kit (Becton Dickinson) を用いて、上清中炎症性サイトカインを測定した。

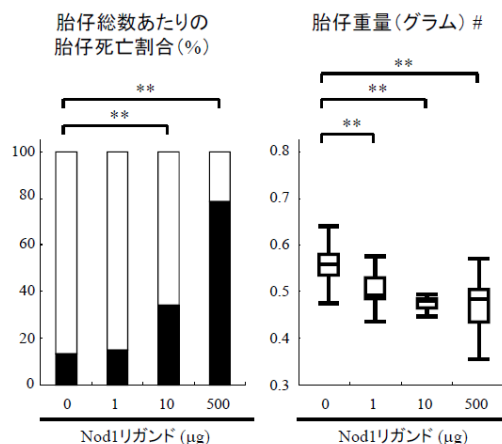
(4) ヒト IUGR 患者における Nod1 の関与の検討

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

妊娠 14 日目妊娠マウスへ Nod1 リガンド投与しても、早産は認めなかった。妊娠 16 日目に胎仔を観察したところ、溶媒投与群と比べ、少量の NOD1 リガンド投与群では胎仔重量の減少を認め、IUGR となった。リガンドの量を増やすと、IUFD を認めた (図 1)。以上から、妊娠マウスへの Nod1 リガンド投与により、IUGR または IUFD が惹起されることが分かった。

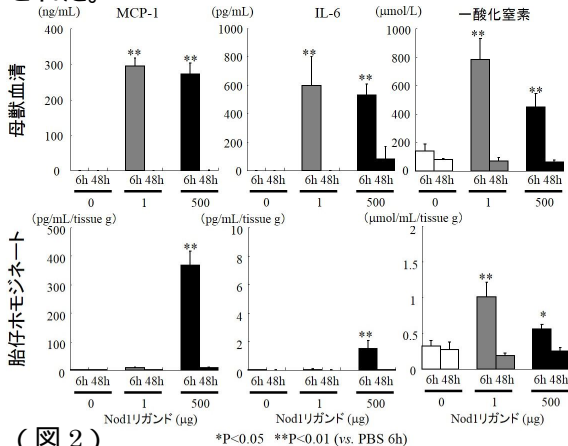


(図 1)

*P<0.05 **P<0.01

#母獣あたりの平均胎仔重量

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、胎仔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、母獣および胎仔で血管炎の所見を認めなかった。Nod1 リガンド投与後 6 時間での母獣血清および胎仔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仔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。



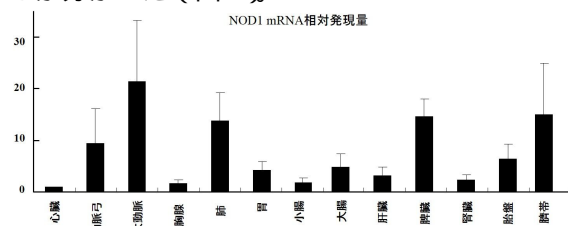
(図 2)

(2) Nod1 リガンドの経胎盤移行

母獣に投与した Nod1 リガンドが胎仔へ移行しているのかどうかを質量分析計で調べた。投与 6 時間後の胎仔ホモジネート上清から、Nod1 リガンドと同一質量かつ同一保持時間のピークが検出された。以上から、母獣へ投与した Nod1 リガンドは経胎盤的に胎仔へ移行することが分かり、胎仔で炎症性応答が惹起されることが推定された。

(3) 胎仔各組織における Nod1 発現および Nod1 リガンドへの反応臓器の同定

受胎後 18 日目の胎仔各組織では、主に血管、肺、脾臓で NOD1 mRNA 発現が高いことが分かった (図 3)。

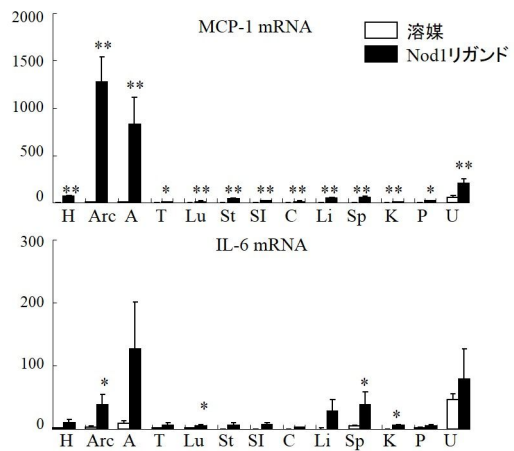


(図 3)

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 4)。

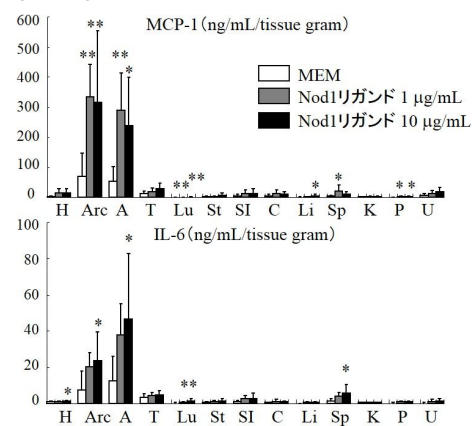
さらに、受胎後 18 日目の胎仔各組織培養では、主に血管の培養上清で炎症性サイトカインタンパクが増加していた (図 5)。

以上から、胎仔が Nod1 リガンドに暴露されると主に血管で炎症性応答が惹起されることが分かった。



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 4)



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. 基礎培地のみ)

(図 5)

マウスによる研究結果をまとめると、母獣由来の Nod1 リガンドは胎仔へ経胎盤移行し、胎仔血管に作用して炎症性応答を誘導し、その結果 IUGR や IUFD が惹起されると推定された。

(4) ヒト IUGR 患者における NOD1 の関与
約 50 名のヒト IUGR 患者において、母体血清、羊水、臍帯血血清中の 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)

Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Kenji I, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Tagichi T, Hara T:
Clinical outcome of extremely low birth weight infants born at GW22-26: a report from a single institution in Japan.
Neonatology. 2013 (in press)

〔学会発表〕(計 3 件)

Hara T:
Innate immunity and infection in the newborn
The 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 9-12, 2013, Kuching, Sarawak, Malaysia

Kanno S, Nishio H, Sueishi K, Hara T:
Activation of Nod1-mediated innate immunity accelerates atherogenesis,
Frontiers in Immunology Research 2013
International Conference, Jul 1-4, 2013, Monte Carlo, Monaco

Hara T, Kanno S, Nishio H:
Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates atherogenesis in Apoe^{-/-}mice.
2nd International Conference on Clinical & Cellular Immunology, Oct 15-17, 2013, Las Vegas, NV, USA

〔図書〕(計 1 件)

原 寿郎: 免疫疾患, 標準小児科学 第8版
監修: 内山 聖 編集: 原 寿郎/高橋孝雄/
細井 創 医学書院 東京 2014 印刷中

〔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

原 寿郎 (HARA, Toshiro)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号: 40150445

(2) 研究分担者

西尾 壽乘 (NISHIO, Hisanori)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 00507783

永田 弾 (NAGATA, Hazumu)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号: 20570790

(3) 連携研究者

なし