

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462498

研究課題名(和文) STOX1 遺伝子導入マウスの妊娠高血圧腎症病態におけるインフラマソーム機構の検証

研究課題名(英文) The research of inflammasome system in preeclampsia using STOX1 transgenic mice.

研究代表者

鈴木 寛正 (SUZUKI, HIROTADA)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90406116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：STOX1遺伝子導入マウスが作製できたが、交配しても流産し、妊娠高血圧腎症モデルマウスとして解析が進まなかった。一方、妊娠高血圧腎症妊婦の血清を胎盤細胞に添加すると、炎症性サイトカインが増加し、細胞死が誘導された。この血清中から抽出したcell free DNAを胎盤細胞に添加すると炎症応答が惹起された。妊娠高血圧腎症妊婦の胎盤組織からは正常妊婦のものより多くのcell free DNAが培養上清中に放出されていた。病態発症血清を添加すると、細胞外DNAを認識する機構としてしられるToll like receptor 9の遺伝子およびタンパク質発現が増加し、これに関与している事が判明した。

研究成果の概要(英文)：We produced the STOX1 transgenic mice. The pregnant mice had miscarriages all the times. They didn't work out as the model mice of preeclampsia. In human placental cell culture, inflammatory cytokines were increased in the culture with the sera of preeclampsia women and induced apoptosis in the culture. Cell free DNA extracted from the sera of preeclampsia women induced inflammation in the human placental cell culture. Cell free DNA was secreted in the placental tissues of preeclampsia more than of normal pregnancy. Toll like receptor 9 recognizes extracellular DNA. The genes and proteins of toll like receptor 9 increased in the culture with the sera of preeclampsia women. It may be related to the system.

研究分野：妊娠高血圧症候群

キーワード：妊娠高血圧症候群 インフラマソーム 炎症

1. 研究開始当初の背景
(妊娠高血圧症候群の現状)

妊娠高血圧腎症は、全妊娠の3~7%に発症する。本病態を発症した妊婦は高血圧・蛋白尿を呈し、HELLP症候群・子癇や胎児発育遅延などを引き起こす。妊娠高血圧腎症については多くの研究がなされているが、今なお、その分子機序が特定されていない。

(妊娠高血圧腎症と炎症反応の関与)

ヒト妊娠高血圧腎症は出産後にその症状が軽快するため、胎盤由来の細胞に病態を引き起こす原因物質の存在が推定されている。現在、本病態はTwo-step theoryと呼ばれる以下の2段階変化が存在しているとの仮説が有力である。

第一段階:何らかの機序により、絨毛細胞の脱落膜・子宮筋層への浸潤が抑制され、螺旋動脈のリモデリング障害が起きる。それに伴う胎盤への血流量が減少する結果、胎盤は慢性的な低酸素状態に陥り、虚血性変化が起きる。

第二段階:虚血状態の胎盤から soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) や soluble endoglin (sEng) が大量に産生され、母体血中の free VEGF と free PlGF 濃度が低下する。このような変化で血管内皮障害が起き、母体高血圧・蛋白尿が発症する。

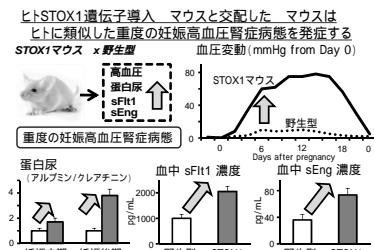
本病態の分子機序の解明が進まない理由の1つとして、ヒト病態に類似した動物実験モデルの作製が困難であったことが挙げられる。従って、妊娠初期の分子機序を解明するためには新規の動物実験モデルが必要である。

(STOX1 遺伝子導入(トランスジェニック)マウスによる新規妊娠高血圧腎症病態モデル)

最近、親子3世代で家族性の本病態を発

症した母親からの遺伝学的解析により、本病態発症に転写因子 STOX1 が関与すると報告された(van Dijk et al., *Nat Genet* 2005)。STOX1 は主に胎盤に発現し、栄養膜細胞の増殖や遊走を調節する。本研究の海外共同研究者 Vaiman 博士はヒト STOX1 遺伝子導入マウスを作製し、既に①STOX1♂マウスと野生型♀マウスを交配させると、妊娠中の母体血圧が急激に増加し、分娩によって改善されること、②高血圧を呈した♀マウスは尿蛋白増加および sFlt1・sEng 濃度が増加し、腎臓血管障害が起きるという結果を得た(Doridot et al., *Hypertension* 2013)。STOX1 病態モデルマウスは妊娠早期から血圧上昇が見られ、母体血圧は 60 mmHg 以上も増加する重度の妊娠高血圧症候群病態を発症し、

ヒトの妊娠初期の本病態に類似した新規の動物モデルである。



2. 研究の目的
(なぜ胎盤炎症が惹起されるのか)

感染が関与しない妊娠高血圧腎症において、なぜ炎症反応が惹起されるのかは不明である。感染や異物排除に働く生体機構が炎症反応である。一方、自己の細胞から放出されるある種の因子が細胞外に出ると、それを危険シグナルと認識して炎症反応を誘導することが明らかになり、感染性の炎症と区別される無菌性の「自然炎症」が注目されている。妊娠高血圧腎症における虚血状態の胎盤では細胞死が誘発され、細胞破片や cell free DNA が大量に放出されることが予想でき、これらが自己由来の危険シグナルと認識される可能性が高い。

妊娠高血圧症候群病態マウスモデルにお

ける炎症機構の重要性を解明することで、本病態における自然炎症の免疫学的分子基盤を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) レンチウイルスを用いてヒト STOX1 を過剰に発現する胎盤細胞株 (Sw71) を作製した。

(2) STOX1 遺伝子をホモで有する個体の作製を行い、妊娠などに及ぼす影響を検証した。

(3) ヒト病態血清による炎症活性化機序を解明するため、正常妊婦や妊娠高血圧症候群患者から採血を行い、その血清を用いて胎盤細胞に及ぼす影響を検討した。

(4) 妊娠高血圧腎症患者で発現や濃度が高いと報告されている、糖化最終産物 (AGE) やパルミチン酸が胎盤細胞に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト STOX1 過剰発現細胞を作製し、炎症応答を検討した。STOX1 を過剰発現させても、胎盤細胞から分泌される妊娠高血圧症候群原因因子 (sFlt1 および sEng) の分泌に変化は見られなかった。また、炎症を惹起させるために LPS を添加すると、通常の胎盤細胞と比較して、STOX1 過剰発現胎盤細胞で炎症関連遺伝子発現の高い増加率が見られたが、それらの分泌には影響は見られなかった。

(2) STOX1 遺伝子過剰発現マウスを交配させて妊娠個体の検討を行ったが、STOX1 遺伝子導入の影響が強い可能性があり、交配してもすぐに流産を繰り返してしまった。流産モデルとして成立する可能性があるが、妊娠高血圧症候群モデルマウスとしての解析が難しい結果となった。

(3) 正常妊婦、妊娠高血圧腎症の病態発症の妊婦の血清を胎盤細胞に添加すると、病態発症血清添加により炎症性サイトカイン

産生が増加し、細胞死が誘導された。正常妊婦血清と比較して、病態血清中には核由来およびミトコンドリア由来の cell free DNA が多く存在していた。血清から抽出した cell free DNA を胎盤細胞に添加すると炎症応答が惹起され、また血清に DNA 除去剤を処理した後に胎盤細胞に添加すると炎症応答が抑制されたことから、血清中の cell free DNA が胎盤細胞における炎症応答を惹起する要因の1つであることが分かった。ヒト胎盤組織を培養すると、培養液中に cell free DNA が多く放出された。また、妊娠高血圧腎症患者の胎盤組織からは正常妊婦胎盤組織よりも多くの cell free DNA が放出された。病態発症血清を添加すると、細胞外 DNA を認識する機構として知られる Toll like receptor 9 (TLR9) の遺伝子およびタンパク質発現が増加し、DNA 除去剤を同時に添加することでその応答は抑制された。

(4) 老化関連因子の代表として糖化最終産物 (AGE) による炎症惹起機序を検討した。ヒト胎盤細胞株に AGE を添加すると、濃度依存的に胎盤細胞の炎症性サイトカイン産生が増加した。AGE は活性酸素産生を刺激することで炎症性サイトカインの分泌を刺激したが、活性酸素阻害剤を用いることでこの作用は消失した。以上から、AGE は胎盤細胞において炎症を惹起させることが分かった。

妊娠高血圧腎症の発症には脂質代謝異常の関与が考えられるため、飽和脂肪酸の代表としてパルミチン酸による炎症惹起機序を検討した。ヒト胎盤細胞株にパルミチン酸を添加すると、濃度依存的に胎盤細胞のアポトーシスが増加した。パルミチン酸はカスパーゼ1を活性化することでインターロイキン1の分泌を刺激したが、カスパーゼ1阻害剤を用いることでこの作用は消失した。以上から、パルミチン酸は胎盤細胞

においてインフラマソームを活性化させることで炎症を惹起させること、また胎盤細胞死を引き起こすことが分かった。

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 4 件)

Shirasuna K*, Seno K, Ohtsu A, Shiratsuki S, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, Nagayama S, Iwata H, Kuwayama T. AGEs and HMGB1 increase inflammatory cytokine production from human placental cells, resulting in an enhancement of monocyte migration. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 557-568 *; corresponding author

Shirasuna K*, Takano H, Seno K, Ohtsu A, Karasawa T, Takahashi M, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, Iwata H, Kuwayama T. Palmitic acid induces interleukin-1 β secretion via NLRP3 inflammasomes and inflammatory responses through ROS production in human placental cells. *J Reprod Immunol* 2016; 116:104-112 *; corresponding author

Seno K, Sase S, Ozeki A, Takahashi H, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K*. Advanced glycation end products regulate interleukin-1 β production in human placenta. *J Reprod Dev* 2017; 63: 401-408 *; corresponding author

Seno K, Tanikawa N, Takahashi H, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K*. Oxygen concentration modulates cellular senescence and autophagy in human trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol* 2018; 79: e12826 *; corresponding author

[学会発表](計 2 件)

白砂孔明, 妹尾琴実, 高橋宏典, 大口昭英,

鈴木寛正, 岩田尚孝, 桑山岳人. Advanced Glycation End Products (AGE)はヒトおよびマウス胎盤で interleukin-1b 産生を調節する 第 25 回日本胎盤学会(長崎) 平成 29 年 11 月 口頭発表

尾関綾衣、妹尾琴実、大口昭英、永山志穂、平嶋周子、鈴木寛正、岩田尚孝、桑山岳人、白砂孔明. 妊娠高血圧症腎症患者の血清中 Cell-free DNA はヒト絨毛細胞株(Sw71)において炎症反応を惹起する. 口頭発表. 第 31 回日本生殖免疫学会. 神戸. 平成 28 年 12 月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
鈴木 寛正 (Hirotada Suzuki)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90406116

(2)研究分担者
大口 昭英 (Akihide Ohkuchi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10306136

白砂 孔明 (Koumei Shirasuna)
東京農業大学・農学部・准教授
研究者番号: 20552780