

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10658

研究課題名(和文) 羊膜細胞のアクチビン産生 - FIRSの治療法開発への応用を目指した研究 -

研究課題名(英文) Activin Production in Amniotic Cells - Research to Provide New Information for the Development of a FIRS Therapy -

研究代表者

安部 由美子 (ABE, Yumiko)

群馬大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：70261857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胎児炎症反応症候群(FIRS)は、炎症が羊膜や臍帯に及んだ段階の絨毛膜羊膜炎で発症する。一方、動物実験では、アクチビンの作用を打ち消すアクチビン結合蛋白質の投与により敗血症における生存率が改善することが報告されているため、炎症性サイトカイン刺激時のヒト羊膜細胞におけるアクチビンとアクチビンの負の制御因子の合成を検討し、炎症性サイトカイン類により、アクチビンの負の制御因子に比べ、アクチビンの合成が優位となることと、この現象に関与するシグナル伝達系の一部を明らかにした。これらの結果より、羊膜細胞におけるアクチビン合成の抑制や、負の制御因子の補充がFIRSの治療法開発に有用である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Fetal Inflammatory Response Syndrome (FIRS) develops when inflammation extends to the amnion and the umbilical cord in chorioamnionitis. The survival rate is reported to increase in experimental animals with sepsis as a result of the administration of an activin binding protein which negates the activity of activin. Therefore, we studied the effects of inflammatory cytokines on the synthesis of activin and negative regulators of activin in human amniotic cells. Inflammatory cytokines predominantly stimulated the synthesis of activin compared to that of negative regulators of activin. Some of the signal transduction pathways involved in increased activin synthesis by the inflammatory cytokine TNF-alpha were also elucidated in this study. From these results, the inhibition of the synthesis of activin in human amniotic cells and the administration of negative regulators of activin appear to be exploitable for the development of a new FIRS therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：羊膜細胞 アクチビン インヒビン フォリスタチン FSTL-3 FIRS 絨毛膜羊膜炎 炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

胎児炎症反応症候群 (Fetal Inflammatory Response Syndrome; FIRS) は高サイトカイン環境により胎児が多臓器障害を来した状態あり、新生児期の適応障害、慢性肺疾患や脳室周囲白質軟化症などの発症頻度が高い疾患であるが、主に炎症が羊膜や臍帯まで及んだ段階の絨毛膜羊膜炎で発症することが知られている。一方、activin は、種々の組織や細胞で、炎症や組織の傷害/修復過程に関与していることが注目されている増殖因子である。敗血症で血清中の activinA と activin 結合蛋白質 follistatin (FST) が CRP とパラレルな増加を示すことや (Europ J Endocrinol 148:559-564, 2003)、グラム陰性菌体成分である LPS の実験動物への投与により血中 activinA は炎症性サイトカイン TNF- と同様に早期に上昇し (Endocrinology 141:1905-1908, 2000、PNAS 104:16239-16244, 2007)、敗血症モデルマウスでは、activinA 高値群で死亡率が高く、activin の作用を負に制御する activin 結合蛋白質 FST の投与により、生存率が上昇することが報告されている (PNAS 104:16239-16244, 2007)。周産期に於いては、子宮内感染を伴う妊婦の羊水中の activinA が高濃度で (Am J Reprod Immunol 67: 122-131, 2012)、早産児の羊水中 activinA は高値であること (J Endocrinol 15:95-101, 1997) が報告されおり、私達は、ヒト羊膜培養細胞で、LPS と TNF- が羊膜細胞の activinA 分泌を促進することを明らかにしていた (Abe Y, et al. J Endocrinol Invest 36(7):515-520, 2013. Abe Y, et al. Int J Endocrinol 2013: Article ID 789012, 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト羊膜細胞における炎症性サイトカインによる activin 遺伝子発現/activin 蛋白質合成調節機序を明らかにすること、及び、絨毛膜羊膜炎の羊水中の

activin濃度とFIRSの病態との関係を明らかにすることにより、これらの知見をFIRSの新規治療法の開発に応用することを目指すことを目的として行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 羊膜培養細胞を用いた研究

院内臨床試験審査委員会の承認の下、インフォームドコンセントを得て、妊娠高血圧症候群、高血圧、糖尿病/耐糖能異常、甲状腺機能障害、膠原病、感染症(梅毒、HB, HC, HIV, ATL, 風疹)、前期破水、羊水過多、羊水過少、胎児異常(染色体異常、子宮内発育遅延、巨大児、胎児奇形、胎児水腫)の合併症の無い妊婦より予定帝王切開時に羊膜を得て、Okita JRらの報告(In Vitro 19:117-126, 1983)及びCasey MLらの報告(Biol Reprod 55:1253-1260, 1996)をもとに羊膜上皮細胞と羊膜間葉系細胞を分離培養した。

Activin A は inhibin/activin A-subunit (INHBA)より成る dimer であり、inhibin A は inhibin -subunit (INHA)と INHBA から成る dimer であり、inhibin と activin 結合蛋白質 FST、FSTL-3 は activin の作用を負に制御するため、これらの mRNA 発現を RT-qPCR で定量し、IN Cell Analyzer 2200 を用いた immunocytochemistry、Western blotting によりシグナル伝達系の解析を、Dual-Luciferase Reporter Assay System により転写活性を解析した。

FST と FSTL-3 の両者と結合する領域を epitope とする抗体を用いて結合蛋白質と結合していない activin に特異的で、感度のよい ELISA (free activin A

ELISA)を構築し、炎症性サイトカイン刺激により羊膜細胞から分泌される activin A 蛋白質を解析した。

#### (2) 羊水を用いた研究

倫理委員会の承認を得て、絨毛膜羊膜炎合併妊婦および非合併妊婦より羊水を得た。

#### 4. 研究成果

##### (1) 羊膜培養細胞を用いた研究では以下の結果を得た。

炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  は羊膜上皮細胞の *INHBA* mRNA 発現を有為に増加させるのに対して、activin の負の制御因子である INHA、FST、FSTL-3 の mRNA 発現に対する影響はわずかで、TNF- $\alpha$  による *INHBA* mRNA 発現促進作用の少なくとも一部は MAPK シグナル伝達系と NF- $\kappa$ B シグナル伝達系を介した作用である可能性を明らかにした。また、TNF- $\alpha$  は *INHBA* mRNA の安定性には影響しなかったが、*INHBA* の近位プロモーター領域を組み込んだ vector を用いた転写活性解析では、転写活性亢進はみられず、発現亢進には別の領域が関与している可能性が考えられた。Activin の内、作用を発揮するのは、結合蛋白質と結合していない activin (free activin) であるが、開発した free activin A ELISA による測定で TNF- $\alpha$  刺激時の羊膜上皮細胞からは free activin A が分泌されることを明らかにした(投稿準備中)。

IL-1 については、TNF- $\alpha$  より低濃度の絨毛膜羊膜炎の羊水中に検出される濃度の IL-1 が羊膜上皮細胞の *INHBA* mRNA の発現を促進し、結合蛋白質の発現に対しては抑制的に作用し、TNF- $\alpha$  以上に activin A 産生が優位な状況をもたらすことが明らかとなった。

(2) 羊水を用いた研究では、絨毛膜羊膜炎合併妊婦の羊水が、研究期間内に当初の目標検体数に達しなかったため現在、継続して収

集を行っている。また、開発したフリー・activin の測定系は、羊水中の activin 測定には感度が不十分と考えられたため、今後、感度の改善を図る予定である。

(3) 上記(1)の結果と、これまでのヒトと実験動物における敗血症における activin, FST の報告より、羊膜細胞における activin 合成の抑制や、負の制御因子の補充が FIRS の治療開発に有用である可能性が考えられた。

#### 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4件)

Higeta D, Yamaguchi R, Takagi T, Nishimura G, Sameshima K, Saito K, Minegishi T. Familial campomelic dysplasia due to maternal germinal mosaicism. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2018 Mar 14; 1-4. doi: 10.1111/cga.12279. 査読有

Ogawa S, Shinozaki H, Hayashi K, Itoh M, Soda M, Kameda T, Ozawa K, Yokota H, Kamioka K, Minegishi T. Prevalence of rear seat belt use among pregnant women in a suburban area of Japan. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018

Jan;44(1):117-123. doi:

10.1111/jog.13468. 査読有

安部由美子、峯岸敬. activin・インヒビンによる生殖制御機構. *内分泌・糖尿病・代謝内科*, 2017; 44(1): 7-14. 査読無

安部由美子、峯岸敬. ゴナドトロピン・エストロジェン. *ホルモンと臨床* 62(4): 291-296, 2016年3月発行. 査読無

[学会発表](計12件)

Sadakata S, Machida T, Miyashita K, Nakajima K, Murakami M, Kameda T,

Kishi H, Minegishi T, Beigneux AP, Young SG, Abe Y. GPIHBP1 Levels are Elevated in Hypertensive Disorders of Pregnancy. The 29<sup>th</sup> World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPALM2017), Nov 15-18, 2017, Kyoto

Nakagawa N, Nagasawa T, Abe Y, Higeta D, Kameda T, Kishi H, Minegishi T. Effect of Interleukin-1 on Expression of Activin A-subunit mRNA in Human Amniotic Epithelial Cells. The 4th World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017), Sep 27-29, 2017, Ginowan

Okabayashi T, Arai N, Hasuko S, Higeta D, Kameda T, Minegishi T, Sadakata H, Hasegawa Y, Abe Y. Secretion of free activin A from human amniotic epithelial cells. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016 (ISPGRS 2016), Sep 2-4, 2016, Honolulu

堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 寺脇直美, 木村博信, 末武勲, 田嶋正二, 安部由美子, 畑田出穂. Tet タンパクは転写因子 Nr2f2 のプロモーターを脱メチル化することにより ES 細胞の多能性を維持する. 第 109 回日本繁殖生物学会大会, 2016 年 9 月 11 日-15 日、相模原市

五十嵐敏雄、五十嵐茂雄、安部由美子、梁善光、五十嵐正雄. 卵巣チョコレート嚢胞内 3EP (CD44 と Tenascin のインヒビター) 注入療法. 第 37 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会、2016 年 1 月 23 日-24 日、熊本市

五十嵐正雄、五十嵐敏雄、五十嵐茂雄、安部由美子、梁善光、峯岸敬、石本一也. 新しく究明した子宮内膜症の原因物質 CD44 と Tenascin を抑制する新しい子宮

内膜症治療薬 3-Ethylpyridine (3EP) の発見. 第 37 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会、2016 年 1 月 23 日-24 日、熊本市

岡林武志、新井菜津子、蓮子小百合、森田晶人、日下田大輔、星野正道、井上真紀、亀田高志、峯岸敬、長谷川喜久、安部由美子. 羊膜上皮細胞と羊膜間葉系細胞における Activin A 産生の相違. 第 41 回日本比較内分泌学会, 2016 年 12 月 9 日-11 日、相模原市

Okabayashi T, Watanabe K, Sadakata H, Kameda T, Minegishi T, Abe Y. Comparison of Activin A Synthesis between Amniotic Epithelial Cells and Amniotic Mesenchymal Cells Obtained from Human Amniotic Membranes. CompBiol 2015 広島大会 第 40 回日本比較内分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会合同大会、2015 年 12 月 11 日-13 日、広島市

安部由美子. エンブリオロジストとして最低限必要な DNA・遺伝子の基礎的知識. 第 1 回エンブリオロジストのための PGS/PGD を学ぶ会、2015 年 9 月 5 日、高崎市

渡邊和子、山中行義、岡林武志、定方久延、亀田高志、峯岸敬、安部由美子. ヒト羊膜細胞における activin A と activin B の遺伝子発現. 第 30 回日本下垂体研究会学術集会、2015 (H27) 年 8 月 5 日、黒部市

堀居拓郎、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、木村博信、末武勲、田嶋正二、安部由美子、畑田出穂. ES 細胞の初期分化には Tet による Nr2f2 プロモーター領域の脱メチル化が必要である. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会、2015 年 5 月 25 日、東京

山中行義、大庭僚将、渡邊和子、定方久

延、亀田高志、峯岸敬、水谷哲也、宮本  
薫、安部由美子。ヒト羊膜細胞における  
TNF- の activin A 遺伝子発現促進作用。  
第 88 回日本内分泌学会学術総会、2015  
年 4 月 23 日-25 日、東京

〔図書〕(計 1 件)

安部由美子、峯岸敬。1. 視床下部の構  
造、2. 視床下部の機能、3. 下垂体の  
構造、4. 下垂体の機能調節。百枝幹雄  
編集、基礎からわかる女性内分泌、診断  
と治療社(東京) 2016 年 4 月 22 日初版  
第 1 刷(総ページ数:246 ページ) pp.2-9。  
ISBN978-4-7878-2191-1

〔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

<http://www.health.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安部 由美子 (ABE, Yumiko)

群馬大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：70261857

(2)研究分担者

峯岸 敬 (MINEGISHI, Takashi)

群馬大学・その他部局等・理事

研究者番号：00209842