

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20154

研究課題名(和文) 子宮内膜の脱落膜化不全病態に関わるプロテアーゼの同定及び非侵襲的臨床診断法の開発

研究課題名(英文) The role of IL-33/ST2 and cathepsin G in patients with recurrent miscarriage

研究代表者

後藤 志信 (Goto, Shinobu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：90591909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：不育症の病態解明と流産を早期に予知する非侵襲的診断法の確立を目的とし、不育症患者の妊娠初期子宮頸管粘液(CM)及び流産後脱落膜中のIL-33とその活性制御に関わるカテプシンG(CTSG)、ST2の発現量を測定し、妊娠予後及び胎児染色体異常の有無との関連を検討した。結果、CM中のCTSGは流産群、特に胎児染色体正常群で有意に高値であった。また生児獲得群で見られるIL-33とCTSG、St2との正、負の相関関係が流産群では認められなかった。IL-33、CTSG、St2バランスの異常が不育症病態に関与し、またそれらのアンバランスが妊娠初期のCMで検出可能であり流産の予測因子になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：IL-33 and sST2 have been reported as key regulators upon decidualization. IL-33 is processed into active forms by cathepsin G (CTSG). In this study, we investigated the existence and contribution of IL-33, sST2 and CTSG in early pregnancy of patients with recurrent miscarriage. With informed consent, cervical mucus and decidua were surgically collected. Immunohistochemistry and ELISA were performed using antibodies against IL-33, sST2 and CTSG. Staining of IL-33 and CTSG was observed in the cytoplasm of stromal and epithelial cells in decidua. The expression of CTSG in cervical mucus of patients with spontaneous miscarriage was significantly higher than that of successful pregnancy. CTSG expression is especially high in miscarriage group when they are early gestational age (4-5week) and when the fetal chromosome is normal. IL-33 and ST2 were not significantly different in both groups. The results provided that CTSG plays an important role in the mechanism of early pregnancy.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：不育症 プロテアーゼ 脱落膜 子宮頸管粘液 IL-33 カテプシンG ST2 流産

1. 研究開始当初の背景

不育症とは妊娠はするものの流産や死産を繰り返し児を得られない状態と定義され、厚生労働省研究班の調査では 4.2%の発生頻度と報告されており、決して稀な疾患ではない。検査により抗リン脂質抗体症候群、夫婦の染色体異常、内分泌学的異常や子宮奇形等が見つかることがあるが、25%は原因不明であることを我々は報告してきた。近年、社会形態の変化による少産少子化傾向や妊娠出産年齢の高年齢化が著しく、妊娠に伴う様々な合併症を回避し安全な妊娠・出産を提供する医学側の社会的責任は重大である。

IL-33 はアレルギー疾患等の発症に関与している一方、子宮内膜間質細胞が脱落膜化する際に放出され、IL-33 受容体である ST2 シグナル伝達経路を介して胚の選択的着床に重要な役割を果たしていると報告されている (M. S.Salker, *et al.*, PLoS ONE 2012, 7: e52252.)。また、好中球等に存在するセリンプロテアーゼであるカテプシン G は、細胞質から放出された pro-IL33 のプロセッシングを介して IL-33 の活性化に作用しているとの報告があり (Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2012 ; 109 (5): 1673-8.) カテプシン G が子宮内膜における IL-33/ST2 シグナルに影響を及ぼしている可能性も考えられるが、不育症におけるカテプシン G と IL-33/ST2 の役割についての検討はまだみられない。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠極初期の子宮内膜の脱落膜化現象や絨毛形成に関わる蛋白分解酵素 (プロテアーゼ) やサイトカインとして IL-33 と、その活性化調節に関わるとされるカテプシン G 及び IL-33 のデコイ受容体として機能しているといわれる sST2 に着目し検討を行う。また、超音波で診断されうる時期よりも早期の段階で流産を予測し治療介入に結び付けるための非侵襲的な検体採取方

法を確立し、新たな臨床検査法の開発へ展開するための基礎研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究方法

流産手術時に得られた脱落膜組織における IL-33 と CTSG の発現を免疫組織染色法 (IHC 法) で確認した。また脱落膜組織中の IL-33 及びカテプシン G の発現量を ELISA 法で測定し、胎児染色体異常群 (n = 54) と胎児染色体正常群 (n = 28) とで比較検討した。また反復流産患者 (n = 68) の妊娠初期頸管粘液中をコットンスワブで採取し、IL-33 及びカテプシン G、ST2 を ELISA 法で測定しとその後の妊娠帰結を出産群 (n = 47) と流産群 (n = 21) とで前方視的に検討した。更に流産群については、胎児染色体異常の有無により、胎児染色体異常群 (n = 14) と正常群 (n = 4) とで比較した。

(2) データの解析

得られた情報を各々独立変数とし、正規性の検定を行った上で、2 群間の比較には対応のない t-検定及び Mann-Whitney 検定を用い、多群間の比較には Oneway ANOVA 法及び Bonferroni 法で多重比較検定を行い統計解析を行った。相関関係の解析には Spearman 検定を行った。統計解析ソフトは GraphPad Prism ver7.03 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA) を用いた。

(3) 倫理的配慮

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理委員会の承認 (No.900, 900-2) を得て、患者同意のもと実験を行った。

4. 研究成果

(1) 脱落膜組織における IL-33、カテプシン G の発現の解析

IHC 法

流産脱落膜組織中に抗 IL-33 抗体と抗カテプシン G 抗体の染色性が認められた。IL-33 は子宮内膜間質細胞が敷石状に変化した脱落膜細胞の細胞質に発現が認められた。一方カテプシン G は脱落膜細胞での発現は認められず、子宮内膜間質内の、形態学的にはリンパ球類似の非脱落膜細胞に発現が認められた。胎児染色体異常群、正常群共に同様の染色性を認め、発現の局在や強度には明らかな違いは認められなかった。

ELISA 法

脱落膜組織中の IL-33、カテプシン G の発現量は共に胎児染色体異常の有無で有意差はみられなかった〔IL-33：胎児染色体異常群 291.2 (81.3-436.8) pg/ml、染色体正常群 310.3 (84.0-533.1) pg/ml、共に中央値 (四分位範囲) 以下同様。p = 0.46、カテプシン G：胎児染色体異常群 0.59 (0.20-1.65) ng/ml、胎児染色体正常群 0.62 (0.10-1.34) ng/ml、p = 0.61〕。

カテプシン G と IL-33 の相関関係を検討したところ、対象 (染色体正常) 群ではカテプシン G と IL-33 の発現量に有意にやや正の相関 ($r = 0.42$, $p = 0.03$) がみられたが、対照 (染色体異常) 群ではカテプシン G と IL-33 に有意な相関は認められなかった ($r = 0.26$, $p = 0.06$)

年齢と脱落膜組織中の IL-33、カテプシン G の発現量の相関関係を検討したところ、IL-33 は年齢の上昇と共に発現量の低下傾向が認められた。特に対照 (染色体異常) 群では有意に負の相関が認められた ($r = -0.26$, $p = 0.049$)。カテプシン G に関しては対照群、対象群共に、年齢との相関は認められなかった。

(2) 妊娠初期子宮頸管粘液における IL-33、

ST2、カテプシン G の発現の解析

妊娠初期頸管粘液において IL-33、ST2 の発現量は出産群と流産群で有意差は認められなかった〔IL-33：生産群 34.3 (14.5-98.9) pg/ml、流産群 39.82 (21.1-92.4) pg/ml、 $p = 0.50$ 〕。ST2：生産群 533 (110-3811) pg/ml、流産群 456 (149-4623) pg/ml、 $p = 0.83$ 〕。一方カテプシン G は流産群で有意に高値であり〔出産群 0.50 (0.12-3.51) ng/ml、流産群 2.82 (0.67-17.17) ng/ml、 $p = 0.03$ 〕、特に胎児染色体正常群で胎児染色体異常群に比して有意に高値であった〔胎児染色体異常群 1.96 (0.67-6.80) ng/ml、胎児染色体正常群 14.3 (4.73-26.08) ng/ml、 $p = 0.03$ 〕。

妊娠週数と IL-33、カテプシン G の発現量を検討したところ、IL-33 は出産群、流産群共に週数との関連は見られなかったが、カテプシン G は妊娠 4-5 週のサブグループにおいて流産群が有意に高値であった。

また IL-33 とカテプシン G、ST2 の発現量についての相関関係の検討では、出産群の IL-33 と ST2 には有意な正の相関 ($r = 0.397$, $p = 0.049$) が認められたが流産群においては IL-33 と ST2 には有意な相関が認められなかった。IL-33 とカテプシン G には出産群、流産群共に有意な相関は認められなかった。

母体年齢と IL-33、ST2、カテプシン G の発現量に関しては、いずれもどの群においても有意な相関は認められなかった。

(3) 考察と今後の展望

今回我々は妊娠初期のヒト子宮頸管粘液と流産脱落膜における IL-33、ST2 及びカテプシン G の存在と意義を初めて明らかにした。特に妊娠初期子宮頸管粘液においてカテプシン G の発現量は流産群で有意に高値であったことから、妊娠の予後因子として使用できる可能性がある。更にカテプシン G 発現の亢進した病態に対して、より早期にまたは予防的に、抗炎症反応に関連した治療介入を

応用できる可能性がある。但し胎児染色体異常の有無に関しては、今回検討できた症例数が少なく、更に検証が必要である。

また今後は IL-33、ST2、カテプシン G の相互作用について背景となるメカニズムを理解するため in vitro での実験を検討している。

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 2 件)

1. Obayashi Y, Ozaki Y, Goto S, Obayashi S, Suzumori N, Ohyama F, Tone S, Sugiura-Ogasawara M.: Role of Indoleamin 2,3-Dioxygenase and Tryptophan 2,3-Dioxygenase in Patients with Recurrent Miscarriage. American Journal of Reproductive Immunology, 2016;75(1):69-77. 査読有
2. 後藤志信 若手の最新研究紹介コーナー「子宮内膜の脱落膜化不全病態に関わるプロテアーゼの同定及び非侵襲的臨床診断法の開発」産科と婦人科、第 84 巻 12 号、2017 年、査読無

[学会発表](計 10 件)

<2017 年>

1. 森 亮介、尾崎康彦、小澤史子、大林勇輝、後藤志信、北折珠央、杉浦真弓 反復流産病態における MMP および TIMP の存在と意義 第 32 回日本生殖免疫学会学術集会、日本大学医学部記念講堂、東京都板橋区、2017.12.2-3
2. 小澤史子、森亮介、大林勇輝、後藤志信、北折珠央、古野忠秀、杉浦真弓、尾崎康彦 反復流産病態における MMPs および TIMPs の存在と意

義 第 22 回日本病態プロテアーゼ学会、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市、2017.8.11~8.12

3. 森亮介、尾崎康彦、大林勇輝、後藤志信、松川泰、北折珠央、杉浦真弓 反復流産病態における MMP-2 および MMP-9 遺伝子の一塩基多型解析 第 69 回日本産科婦人科学会学術集会、広島県広島市、2017.4.13~4.16

<2016 年>

4. 森亮介、尾崎康彦、小澤史子、大林勇輝、松川泰、後藤志信、北折珠央、杉浦真弓 反復流産病態における MMP-2 および MMP-9 遺伝子の一塩基多型解析 第 31 回日本生殖免疫学会学術集会、神戸国際会議場、兵庫県神戸市、2016.12.2-12.3
5. Shinobu Goto, Yasuhiko Ozaki, Ryosuke Mori, Klas Blomgren, Mayumi Sugiura-Ogasawara Role of IL-33 and Cathepsin G in Cervical Mucus of Patients with Recurrent Miscarriage. XVth International Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control September 17-21,2016, Portoroz, Slovenia
6. 後藤志信、尾崎康彦、森亮介、小澤史子、平谷菜都子、北折珠央、国松己歳、杉浦真弓 反復流産病態における妊娠初期頸管粘液中の IL-33 と cathepsin G の関与 第 21 回日本病態プロテアーゼ学会、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市、2016.8.5~8.6
7. 後藤志信、尾崎康彦、大林勇輝、倉兼さとみ、杉浦真弓 反復流産病態における妊娠初期頸管粘液中の IL-33 と cathepsin G の関与 第 68

回日本産科婦人科学会学術集会、東京国際フォーラム、東京都千代田区、2016.4.22.~4.24

< 2015 年 >

8. 後藤志信、尾崎康彦、大林勇輝、倉兼さとみ、杉浦真弓 反復流産病態における妊娠初期頸管粘液中の IL-33 と cathepsin G の関与 第 30 回日本生殖免疫学会学術集会、くまもと県民交流館パレア、熊本県熊本市、2015.11.21~11.22
9. 後藤志信、尾崎康彦、山本健二、杉浦真弓 ワークショップ「産婦人科領域におけるプロテアーゼ研究の最新トピックス」: Role of cathepin E in decidual macrophage of patients with recurrent miscarriage.(反復流産病態における妊娠初期脱落膜中マクロファージの cathepsin E の役割) 第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市、2015.8.21-8.22
10. 後藤志信、尾崎康彦、大林勇輝、倉兼さとみ、熊谷恭子、北折珠央、鈴森伸宏、杉浦真弓 反復流産病態における妊娠初期頸管粘液中の IL-33 と cathepsin G の関与 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2015.4.9~4.12

〔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

http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/obgyne.dir/group_huiku.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 志信 (SHINOBU GOTO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：90591909