

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591816

研究課題名(和文) FIRSの診断と治療への応用を目的としたフリー・アクチビン測定法の開発

研究課題名(英文) Development of free activin assay for the diagnosis and treatment of FIRS

研究代表者

安部 由美子 (Abe, Yumiko)

群馬大学・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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：FIRSの主要な背景疾患は絨毛膜羊膜炎である。羊膜は無血管性の組織であり羊膜細胞で産生されたactivin Aは羊水中に分泌されて胎児に影響すると考えられる。羊膜炎のモデル系としてヒト羊膜培養細胞にLPS又はTNF- α を作用させ、LPSとTNF- α による羊膜細胞からのactivin A分泌促進を明らかにした。活性のあるfree activin Aは結合蛋白であるfollistatinやFSTL3が結合していない状態にあるため結合部位をepitopeとしてpeptide抗原を合成、免疫後、精製抗体を得た。この抗体を用いてTNF- α 刺激により羊膜細胞から分泌されるactivin Aを解析中である。

研究成果の概要(英文)：Chorioamnionitis is the primary disease of FIRS. Because the amnion is the avascular tissue, activin A produced in the amniotic cells is directly secreted into amniotic fluid, and seems to affect the fetus. Using cultured human amniotic cells with LPS or TNF- α , as a model system of amnionitis, we clarified that these factors stimulate activin A secretion from amniotic cells. A biologically active form of activin A is free activin A, which is not bound by the binding proteins follistatin or FSTL3. Therefore, we synthesized a peptide which has an amino acid sequence of follistatin/FSTL3-binding site of activin A, used it in immunization and obtained antibodies. The antibodies were purified by immunochromatography. Using the antibodies, we are analyzing the activin A secreted from amniotic cells by the stimulation of TNF- α .

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産科学

キーワード：アクチビン フォリスタチン FIRS 絨毛膜羊膜炎 羊膜細胞

1. 研究開始当初の背景

Fetal Inflammatory Response Syndrome (FIRS) は子宮内感染によって生じた高サイトカイン環境のために胎児が炎症性多臓器障害を来した状態と考えられている。しかし、病態の詳細は不明で、病勢把握に最適な検査法も、有効な治療法も確立されていない。一方、activin は当初、FSH 産生促進因子として発見されたが、近年、種々の組織や細胞で、activin A が炎症や組織の傷害/修復過程に関与しているという知見が集積されつつある。Activin は結合蛋白質と結合していない free form が作用を発揮するが、結合蛋白質 follistatin との結合により作用の発現は阻害される。しかし、これまで研究的に用いられてきた activin の測定法は、free form と bound form の両者を検出する測定法である。

2. 研究の目的

(1) Activin binding protein である follistatin と follistatin-like 3 (FSTL3/FLRG/FSRP) は receptor と同程度の親和性を持って activin と結合するが、結合により activin と receptor との結合は阻害され、activin 活性は発揮されない。すなわち、activin としての作用を発揮するのは free form の activin であるため、free form の activin A を検出する測定系を開発する。

(2) FIRS の病態解明に資する知見を得るため、FIRS の主要な背景疾患として知られている絨毛膜羊膜炎への activin A の関与をヒト羊膜細胞培養系を用いて探索する。羊膜炎モデルとして、グラム陰性菌体成分である lipopolysaccharide (LPS)、または炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- (TNF-) 存在下で羊膜細胞を培養し、これらの因子の羊膜細胞からの activin A 分泌への

影響を明らかにする。また、分泌される activin A の存在様式を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Activin と結合し、レセプターへの結合阻害により activin 活性の発現を抑制する生体内の activin binding protein は follistatin と FSTL3 であり、これらの結合蛋白質の activin 結合部位が報告されている (Stampler R et al. J Biol Chem 283:32831-32838, 2008) ので、これらの報告を基に、activin A の free surface を認識する抗体を作成する目的で、合成ペプチドを作製した。この peptide を用いて家兎を免疫し、合成ペプチド固相化プレートを用いて、力価を測定し、抗血清を得た。CNBr-activated Sepharose 4B に合成ペプチドを coupling した affinity column を作製し、抗体を精製し、精製抗体 (IgG) を biotin で標識した。精製抗体を 96-well microplate に固相化し、biotin 標識抗体、avidin-horseradish peroxidase を用いて ELISA を構築した。

(2) 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、妊娠中毒症、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た。Okita JR らの報告 (In Vitro 19:117-126, 1983) をもとに、trypsin 処理により羊膜上皮細胞を羊膜より分離し、上皮細胞除去後の羊膜より Casey ML らの報告 (Biol Reprod 55:1253-1260, 1996) を

もとの、collagen 処理にて羊膜間葉系細胞を得た。細胞は 10% FBS 添加 DMEM/F12 培地で培養し実験に用いた。培養上清中の total activin A は SDS と H₂O₂ を用いた試料の前処理後に、Oxford Bio-Innovations (Oxfordshire, UK) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) Activin A で antigenicity の高い領域を解析用 software により推定した後、follistatin と FSTL3 の両者と結合する領域を epitope として合成 peptide を作製し、家兔を免疫し、affinity chromatography により抗血清を精製し、抗体を得た。この抗体を用いて ELISA を構築したが、試料測定可能な感度を得られなかった。現在、感度の改善を検討中である。

(2) 絨毛膜羊膜炎の Blanc 分類 III 期では、炎症が羊膜に及ぶ。羊膜は無血管性の組織であり、羊膜上皮細胞は羊水と直接接するため、羊膜上皮細胞で産生された生理活性物質は直接羊水中に分泌され、胎児に影響すると考えられる。このため、羊膜炎のモデルとしてヒト羊膜上皮細胞培養系に、LPS または、炎症性サイトカイン TNF- α を添加し、羊膜上皮細胞による activin A の産生を解析した。

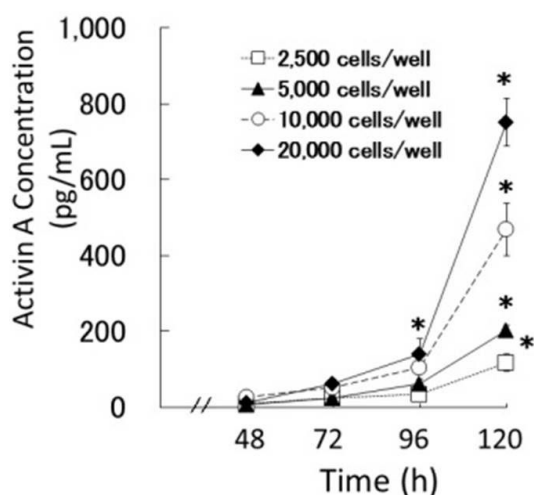


図1 ヒト羊膜上皮培養細胞からのactivin A分泌

この結果、培養羊膜上皮細胞が細胞密度と培養時間に依存して activin A 分泌を増加させること (図 1) (Abe Y et al. J Endocrinol Invest 2013) および LPS により activin A 分泌を増加させることを明らかにした (図 2) (Abe Y et al. Int J Endocrinol 2013)。

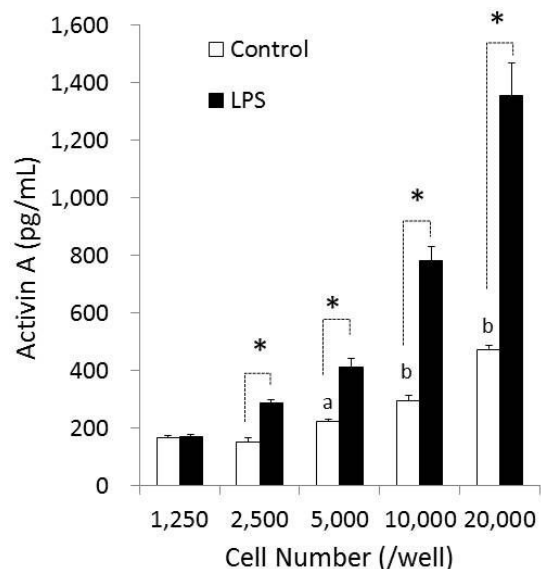


図2 LPSによるactivin A分泌促進さらに、TNF- α は時間依存的、用量依存的に activin A 分泌を促進すること (図 3、図 4) この TNF- α の羊膜上皮細胞からの activin A 分泌促進作用は LPS より強く、LPS の 1/1000 以下の用量で LPS より顕著な分泌促進作用を示すことを明らかにした (図 4) (Abe Y et al. J Endocrinol Invest 2013)。

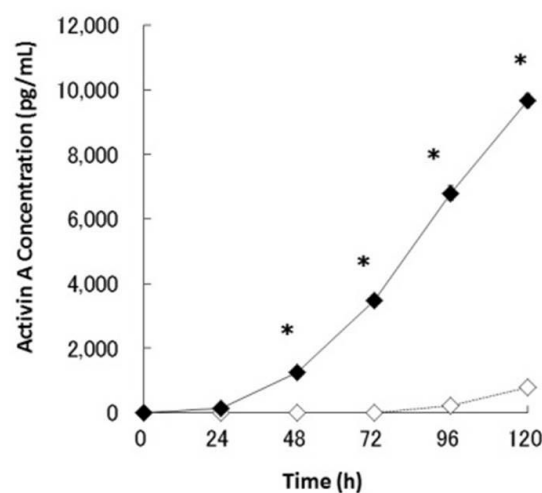


図3 TNF- α によるactivin A分泌促進

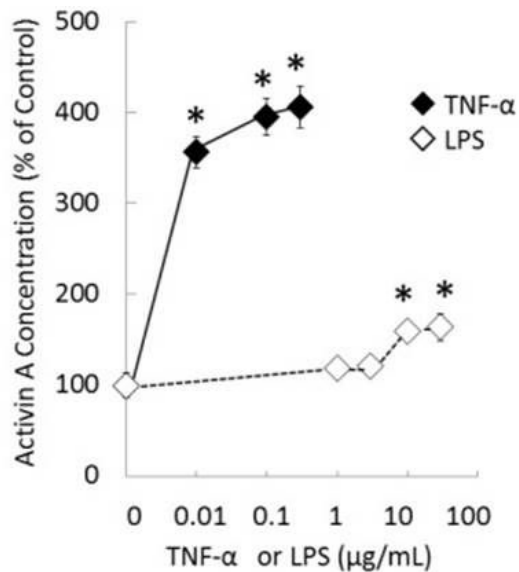


図4 LPSとTNF- α によるactivin A分泌促進

(3) TNF- α による羊膜上皮細胞、羊膜間葉系細胞における inhibin/activin A-subunit, inhibin β -subunit, follistatin, FSTL3 の mRNA 発現を quantitative PCR にて解析した。両細胞共、TNF- α 刺激による inhibin/activin A subunit mRNA 発現増加に比べ、inhibin β -subunit, follistatin, FSTL3 の mRNA 発現増加はわずかであった。inhibin/activin A-subunit のジスルフィド結合により activin A が、inhibin β -subunit と inhibin/activin A-subunit のジスルフィド結合により inhibin A が生合成される。また、follistatin と FSTL3 は activin receptor と同程度の親和性を持って activin と結合する。従って、mRNA 発現解析の結果から、羊膜細胞では TNF- α 刺激により activin A 優位な状態になることが考えられる。(1) に記述した抗体が free activin A subunit を認識することを Western blotting で確認しているの、この抗体と現有の抗 follistatin 抗体を用いて、TNF- α 刺激により羊膜細胞から分泌される activin A の存在様式を解析する予定である。

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9件)

Horii T, Arai Y, Yamazaki M, Morita S, Kimura M, Itoh M, Abe Y, Hatada I. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Sci Rep. 2014 Mar 28;4:4513. doi: 10.1038/srep04513.

査読有

Horii T, Morita S, Kimura M, Kobayashi R, Tamura D, Takahashi RU, Kimura H, Suetake I, Ohata H, Okamoto K, Tajima S, Ochiya T, Abe Y, Hatada I. Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system. PeerJ. 2013 Dec 23;1:e230. doi: 10.7717/peerj.230.

査読有

Abe Y, Marukawa R, Tsuru N, Sato M, Matsuda H, Sadakata H, Kameda T, Minegishi T. Gram-negative bacterial lipopolysaccharide stimulates activin secretion from human amniotic epithelial cells. Int J Endocrinol. 2013;2013:789012. doi: 10.1155/2013/789012. 査読有

Abe Y, Komatsubara M, Saito M, Toda M, Shinozaki H, Tamura T, Kasahara Y, Sedakata H, Minegishi T. Activin A is stimulated by tumor necrosis factor-alpha and modulates collagen gene expression in human amniotic cells. J Endocrinol Invest. 2013 Jul-Aug;36(7):515-20. doi: 10.3275/8816. 査読有

査読有

Igarashi S, Igarashi T, Abe Y, Liang SG, Minegishi T, Igarashi M. Important initiative roles of CD44 and Tenascin in Sampson's theory of the

pathogenesis and development of endometriosis. Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders 5(3):100-104, 2013. <http://www.j-endometriosis.com/article/important-initiative-roles-of-cd44-and-tenascin-in-sampson-s-theory-of-the-pathogenesis-and-development-of-endometriosis> 査読有

五十嵐敏雄, 佐川義英, 古村絢子, 寺田光二郎, 嘉本寛江, 中村泰昭, 落合尚美, 中川圭介, 中江華子, 梁善光, 五十嵐茂雄, 安部由美子, 五十嵐正雄. 子宮内膜症組織の間質細胞培養系への腹水添加の意義・効果について. 日本エンドメトリオーシス学会会誌 34 巻 Page211-214(2013.07) <http://www.endometriosis.gr.jp/non-member/kaishi/kaishi34pdf/56-ippa-n-kiso5-2.pdf> 査読有

安部由美子, 峯岸敬. LH, FSH. 内分泌・糖尿病・代謝内科, 第 36 巻特別増刊号 pp.153-159, 科学評論社(東京), 2013 年 4 月 28 日発行, ISSN 1884-2917. <http://www.kahyo.com/brand/b-Bzo201304-36S4> 査読無

安部由美子. 研究室紹介. 日本生殖内分泌学会雑誌 Vol.16:36-37,2011(2011 年 8 月 31 日). http://www.seishoku.org/11_16kan/12-shoukai1.pdf 査読無

平井俊朗, 安部由美子, 田中滋康. 下垂体糖蛋白質ホルモン- サブユニット (-PGH). 日本臨床 68 巻 増刊号 7(全 868 頁)(通巻第 982 号): 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査- その数値をどう読むか - [第 7 版](4) (2010 年 7 月 20 日発行) : pp.216-219. http://www.nippon-rinsho.co.jp/backup/z_mokuji/ketueki7-4.html 査読

無

〔学会発表〕(計 16 件)

五十嵐正雄, 横田 佳昌, 五十嵐茂雄, 安部由美子, 五十嵐敏雄, 梁善光. 深部内膜症に対する3-ethylpyridine 含有腔リングの効果. 第35回日本エンドメトリオーシス学会, 2014年1月25日-1月26日, 鹿児島市

山崎美帆, 堀居拓郎, 荒井勇二, 森田純代, 木村美香, 伊藤理廣, 安部由美子, 畑田出穂. CRISPR/Cas系を利用したノックアウトマウス直接作成法の検討. 第36回日本分子生物学会, 2013年12月3日-6日, 神戸市

小林遼平, 堀居拓郎, 田村大樹, 森田純代, 木村美香, 安部由美子, 畑田出穂. 半数体胚由来 2 倍体ES細胞(hddES)-再生医療における新たな多能性幹細胞の選択枝. 第36回日本分子生物学会, 2013年12月3日-6日, 神戸市

堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 小林遼平, 田村大樹, 高橋陵宇, 木村博信, 末武勲, 大畑広和, 岡本康司, 田嶋正二, 落谷孝広, 安部由美子, 畑田出穂. CRISPR/Cas9システムによる哺乳類半数体ES細胞のゲノム操作. 第36回日本分子生物学会, 2013年12月3日-6日, 神戸市

堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 小林遼平, 田村大樹, 高橋陵宇, 木村博信, 末武勲, 大畑広和, 岡本康司, 田嶋正二, 落谷孝広, 安部由美子, 畑田出穂. 半数体ES細胞とCRISPR/Casを用いた高効率ゲノム編集. 第3回ゲノム編集研究会, 2013年10月26日-27日, 広島市

荒井麻希, 高柳彰子, 古川涼, 大庭僚将, 山中行義, 小島望, 小島萌生, 嶋田佳奈, 渡邊和子, 安部由美子. ヒト羊膜培養細胞におけるアクチビン A の作用. 第38回日本比較内分泌学会, 2013年10月24日-26日, 宮崎市

堀居拓郎、森田純代、木村美香、田村大樹、小林遼平、山崎美帆、家坂直子、高橋陵宇、木村博信、末武勲、大畑広和、岡本康司、田嶋正二、落谷孝広、峯岸敬、伊藤理廣、安部由美子、畑田出穂。小分子 RNA 配列と相補的な DNA を切断する CRISPR/Cas9 ヌクレアーゼを用いた高効率ゲノム編集。第 5 回日本 RNAi 研究会、2013 年 8 月 29 日-8 月 31 日、広島市

五十嵐正雄、横田佳昌、五十嵐敏雄、五十嵐茂雄、安部由美子、梁善光、峯岸敬。経膈エコーとMRIで診断困難な深部内膜症の診断と新しい治療法。第34回日本エンドメトリオーシス学会、2013年1月19日、宇都宮市

高柳彰子、荒井麻希、古川涼、大橋直人、鈴木宏和、山中行義、安部由美子。ヒト羊膜培養細胞における inhibin, activin, follistatin。第37回日本比較内分泌学会、2012年11月29日-12月1日、福井市

大橋直人、鈴木宏和、山中行義、荒井麻希、高柳彰子、古川涼、安部由美子、水谷哲也、宮本薫。ヒト羊膜細胞における 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin の作用。第 37 回日本比較内分泌学会、2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日、福井市

鈴木ちかる、荒井麻希、高柳彰子、古川涼、笠原慶充、田村友宏、定方久延、勝俣祐介、峯岸敬、安部由美子。ヒト羊膜間葉系細胞と上皮細胞における TNF- α の activin A 発現促進作用。第16回日本生殖内分泌学会、2011年11月19日、東京

鈴木ちかる、荒井麻希、高柳彰子、古川涼、水流奈己、丸川りさ、小松原麻紀、安部由美子。絨毛膜羊膜炎モデルとしてのヒト羊膜細胞培養系。第 48 回関東甲信地区医学検査学会、2011 年 10 月 29 日-30 日、発表 10 月 29 日、前橋市

五十嵐正雄、横田佳昌、五十嵐敏雄、安

部由美子、五十嵐茂雄、梁善幸。子宮腺筋症・深部内膜症・卵巣内膜症に対する新薬 3 剤単独経膈の局所直接注射療法。第 32 回日本エンドメトリオーシス学会、2011 年 1 月 22 日-23 日、東京

Igarashi M, Yokota Y, Igarashi T, Igarashi S, Abe Y, Liang SG. Novel transvaginal echo-guided injection treatment for adenomyosis, vaginal and deep endometriosis, and ovarian endometriosis with danazol, 3-ethyl pyridine, or valproic acid. The First Asian Conference on Endometriosis, Oct 16-17 (Oct 16), 2010, Shanghai

水流奈己、丸川りさ、鈴木ちかる、小松原麻紀、齋藤恵美、戸田麻友穂、長谷川喜久、安部由美子。羊膜培養細胞の inhibin 産生の検討。第 57 回日本臨床検査医学会 2010 年 9 月 9 日-12 日、東京

Abe Y, Tsuru N, Marukawa R, Suzuki C, Komatsubara M, Saito M, Toda M, Mizutani T. Endocrine disruptor dioxin affects gene expression related to collagen metabolism in human amniotic cells. 28th International Congress of the Medical Women's International Association, July 28- 31, 2010, Münster, Germany

〔図書〕(計 1 件)

安部由美子。生殖医療。石原勝敏、末光隆志総編集、生物の事典、朝倉書店(東京) 2010 年 9 月 15 日初版第 1 刷(総ページ数: 542 ページ)、pp.357-363: .

〔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