

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09711

研究課題名(和文) スフィンゴ脂質代謝異常による流産のメカニズムの解明と治療薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism and development of therapeutic strategies for the sphingolipid-mediated pregnancy loss

研究代表者

水岸 貴代美 (Mizugishi, Kiyomi)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70518448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：正常妊娠を維持するためには、胎児に対する母親の過剰な免疫反応は制御されなければならない。本研究で、私はスフィンゴ脂質代謝異常により不育症様の症状を呈するモデルマウスを用いて検討を行った。モデルマウスでは、胎児を囲む脱落膜組織で過剰な好中球細胞外トラップ(NETs)が形成され、流産が引き起こされた。NETsを阻害する試薬をモデルマウスに投与すると、流産の割合が減少した。さらに、スフィンゴシンキナーゼ活性が阻害された脱落膜細胞を用いて、ヒトの好中球を刺激すると、大量のNETsが誘導された。以上より、マウスおよびヒトの流産発症にNETsが大きく関わっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不育症には原因不明で、難治性のものが多い。難治性不育症については、確立された治療法が全くないのが現状である。ヒトの不育症研究では、患者の血清/血漿を用いた研究が多く、検出された異常が原因か結果であるかを判断するのが難しい。現在、原因不明の不育症に対する免疫グロブリン療法が国内で多施設共同の臨床試験として行われている。免疫グロブリン療法を用いた臨床試験は世界でも行われているが、その有効性についてはまだ議論が分かれている。不育症モデルマウスを用いた私の研究は、不育症の原因解明・治療法開発に有用であり、ヒトへの応用に向けた未来に大きく道を開くものだと考える。

研究成果の概要(英文)：Exaggerated maternal immune responses must be strictly controlled to ensure a successful pregnancy. In this study, we demonstrated that Neutrophil extracellular traps (NETs) play a key role in the pathogenesis of sphingosine kinase (Sphk)-mediated pregnancy loss. Perturbing the sphingolipid pathway by disrupting Sphk genes during pregnancy led to excessive NET formation exclusively at the fetomaternal interface and early fetal death. Neutrophils that formed NETs were characterized by histone hypercitrullination and peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) overexpression. Blocking NET formation with a PAD4 inhibitor protected Sphk-deficient mice from pregnancy loss. Moreover, NET formation was induced in human neutrophils stimulated with Sphk-deficient human decidual cells. Together, these findings indicate that targeting NETs might be a novel therapeutic strategy to treat idiopathic pregnancy loss in humans.

研究分野：スフィンゴ脂質

キーワード：スフィンゴ脂質 妊娠 不育症 自然免疫 好中球細胞外トラップ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質と呼ばれる一群の脂質の一つであるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、多様な生物学的活性を有する脂質メディエーターである。S1P は細胞内で細胞の生存、増殖の制御やカルシウムの動員を引き起こすセカンドメッセンジャーとして作用する一方、細胞表面の S1P 受容体 (S1PR1-5) と呼ばれる G タンパク質共役受容体に結合し、血管形成、リンパ球の遊走などに非常に重要な役割を果たしている。S1P が近年、特に注目を集めているのは新規免疫抑制剤 FTY720 の登場にある。FTY720 は体内でスフィンゴシンキナーゼ (Sphk) と呼ばれる酵素によってリン酸化されて FTY720 リン酸となり、これが S1P の作用を模倣して S1P 受容体に結合し、胸腺やリンパ節からのリンパ球の遊走を阻害する。さらに FTY720 は再発性多発性硬化症の治療薬として承認されている。

S1P は、生体内でスフィンゴシンキナーゼ (Sphk) によってスフィンゴシンがリン酸化されることにより生成される。現在、Sphk には Sphk1 と Sphk2 の 2 種類が知られている。私はこれまで主に *Sphk* ノックアウトマウスを用いてスフィンゴ脂質代謝の解析を行ってきた。*Sphk1* および *Sphk2* シングルノックアウトマウスの表現型はほとんど正常である一方、*Sphk1/Sphk2* ダブルノックアウトマウスは胎生致死であった。*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* マウスは胎生 11.5~12.5 日目に全身とくに頭部の出血で死亡し、血管内皮細胞の重篤な異常や神経管の閉鎖を含む神経系の発生異常が見られた。

さらに、私はスフィンゴ脂質代謝経路が妊娠の継続維持に不可欠であることを発見した (Mizugishi *et al.* (2007) *J Clin Invest.* 117: 2993-3006)。スフィンゴ脂質の代謝は正常妊娠中に非常に活性化しており、*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* の雌マウスは不育症様の症状を呈する。*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* の雌マウスでは、亢進した代謝経路の一部が遮断されることにより、細胞毒性の強いスフィンゴシンおよびジヒドロスフィンゴシンが子宮内の脱落膜細胞 (decidual cell) および血管内皮細胞に異常に蓄積していた。これらの結果、血管内皮細胞が完全に破壊され、胎児を取り囲む脱落膜 (decidua) 領域における出血および脱落膜細胞の細胞死の著明な増加がおり、母親側の原因により、ほぼ全ての胎児は胎生 7.5~8.5 日目に死亡した。以上の結果より、スフィンゴ脂質の代謝経路が子宮内膜脱落膜化 (decidualization) や血管形成において極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった。

Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-} の雌マウスでは、胎児を取り囲む脱落膜組織に好中球遊走因子である CXCL1 および CXCL2 が大過剰に発現しており、同部位に一致して好中球が異常に浸潤していた。その結果、tissue factor 等の発現が増加し、重度の脱落膜組織障害が起こり、胎児は妊娠早期に死亡することが明らかになった。さらに、好中球浸潤を阻害することにより、流産の発症率は大きく改善した。また、自然流産または人工妊娠中絶を行った患者から採取した脱落膜細胞においても、Sphk 活性を阻害することにより、CXCL1 および IL-8 の発現の著明な増加が認められた。以上の結果より、マウスおよびヒトの脱落膜組織において、スフィンゴ脂質代謝が非常に重要な役割を果たしており、その代謝異常により自然免疫の異常、特に好中球の活性化が起こることが明らかになった (Mizugishi *et al.* (2015) *J Biol Chem.* 290: 2053-2068)。

2. 研究の目的

同種移植片である胎児が、母体内で拒絶されず、平和的に共存するメカニズムは何か？流産が起こるメカニズムは何か？私は、スフィンゴ脂質代謝に異常があり、不育症様の症状を呈するモデルマウスを用いて、この謎に迫る。このモデルマウスでは、正常妊娠では抑制されている、母体脱落膜組織中の炎症反応が妊娠初期に大過剰に惹起され、その結果、胎児は子宮内で死亡することがわかってきた。私は、このモデルマウスを用いて、スフィンゴ脂質代謝が正常妊娠においてどのように母児免疫寛容を制御しているのか、スフィンゴ脂質代謝異常によって如何に流産が引き起こされるのかを解明する。また、スフィンゴ脂質代謝異常による流産の治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) スフィンゴ脂質代謝異常によって引き起こされる流産のメカニズムの解明

①モデルマウスを用いた研究

近年、好中球の新たな殺菌作用として neutrophil extracellular traps (NETs) が注目を集めている。さらに、NETs は、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患、血栓症、動脈硬化など多様な疾患の病態形成に関与していることが明らかになっている。興味深いことに、妊娠中の合併症の一つである preeclampsia の病態形成に NETs が重要な役割を担っていることが明らかになっている。私が研究しているモデルマウスでは、好中球系の異常が流産の病態形成に大きな役割を果たしていることから、NETs の関与が強く示唆される。本研究では、*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* の雌マウスにおける NETs の関与を検討する。非妊娠、妊娠中の野生型および *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* の雌マウスの血漿を採取し、DNA 量 (NETs の量と相関) の測定を行い、比較検討を行う。また、野

生型および *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* の雌マウスの妊娠早期の子宮組織について免疫染色などを用いて、NETs の有無の検討を行う。さらに、末梢血や組織標本を用いて活性酸素 (ROS) の関与についても検討を行う。

②ヒトのサンプルを用いた研究

自然流産あるいは人工妊娠中絶した患者から同意を得て、脱落膜組織を採取する。脱落膜細胞を単離・精製し、細胞培養を行い、Sphk の阻害剤を投与する。Sphk 活性が阻害されたヒトの脱落膜細胞の上清を用いて、ヒトの好中球を刺激し、NETs が誘発されるか検討する。

2) スフィンゴ脂質代謝異常によって引き起こされる流産の治療法の開発

Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-} の妊娠している雌マウスに NETs 生成を阻害する試薬を投与し、治療効果について検討する。

4. 研究成果

1) スフィンゴ脂質代謝異常によって引き起こされる流産のメカニズムの解明

NETs は、DNA、ヒストン、エラスターゼなどの顆粒が好中球の細胞外に突出する現象である。NETs 形成では、peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) 酵素による、ヒストンのアルギニン残基からシトルリン残基への変換 (シトルリン化) が鍵である。病的状態では、PAD4 が過剰発現し、シトルリン化の異常亢進が起こり、NETs が過剰に形成される。野生型および *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* の

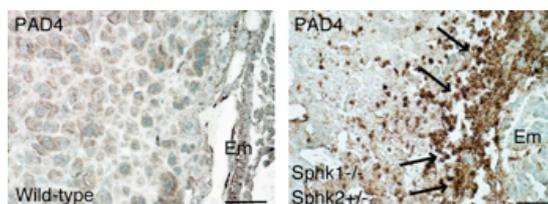


図 1

雌マウスの妊娠早期の子宮組織を用いて検討を行うと、*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスでは、胎児 (Em) を取り囲む脱落膜領域に浸潤する好中球において PAD4 の過剰発現がみられた (図 1 右図、矢印)。さらに、*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスの脱落膜組織に浸潤する好中球 (Neu) では、ヒストンのシトルリン化 (H3Cit) が異常に亢進しており (図 2)、その結果、DNA、ヒストン、エラスターゼなどの顆粒が好中球の細胞外に突出し、NETs が過剰に形成されていることが明らかになった。一方、妊娠中の野生型および *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* の雌マウスの血漿を採取し、二重鎖 DNA 量 (NETs の量と関連) の測定を行なったが、両者で有意な差異はみられなかった。以上より、NETs がスフィンゴ脂質代謝異常のマウスの流産発症の中核をなすことが明らかになった。

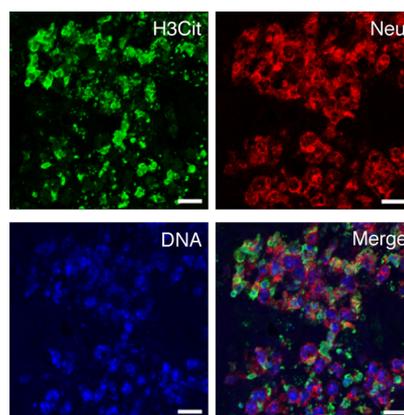


図 2

さらに、ヒトの脱落膜組織でも Sphk 阻害により NETs 形成が誘発されるか検討を行った。自然流産あるいは人工妊娠中絶した患者の脱落膜組織から、脱落膜細胞を単離・精製し、Sphk の阻害剤を投与した。Sphk 活性が阻害されたヒトの脱落膜細胞の上清を用いて、ヒト好中球を刺激すると、大量の NETs が誘発されることがわかった (図 3、右図)。

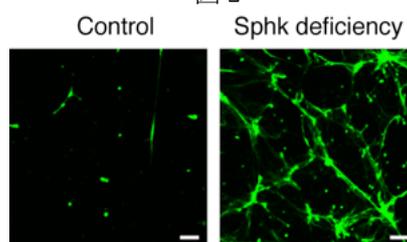


図 3

以上より、モデルマウスおよびヒトの検体を用いた研究結果から、スフィンゴ脂質代謝異常により引き起こされる流産の病態形成に NETs が大きく関与していることが明らかとなった。

2) スフィンゴ脂質代謝異常によって引き起こされる流産の治療法の開発

Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-} 雌マウスでは、胎児を取り囲む脱落膜領域に浸潤する好中球で PAD4 の過剰発現がみられた。したがって、NETs 形成を抑制するため、PAD 阻害剤をマウスに投与し、流産発症率の減少がみられるか検討した。その結果、PAD 阻害剤を投与した *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスの胎児のうち、約 40% の胎児で正常な発達が認められた。さらに、免疫組織染色にて、PAD 阻害剤を投与された *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスの脱落膜組織に浸潤した好中球では、ヒストンのシトルリン化が著明に抑制されていた。電子顕微鏡を用いた検討により、PAD 阻害により、*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 脱落膜組織では、血管内皮細胞の障害も軽減していた。以上より、PAD 阻害薬は、*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスの流産の発症率を減少させ、脱落膜組織障害を改善させることが明らかになった。

これらの研究成果をまとめ、学術論文として掲載された (Mizugishi *et al.* (2017) FASEB J. 31: 5577-5591)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yamashita Kouhei, Mizugishi Kiyomi, Takaori-Kondo Akifumi. Familial Mediterranean fever mutations in a patient with periodic episodes of systemic pain deriving from cancer bone metastases. *Internal Medicine*. 査読有 57, 2018, 2901-2904. DOI: 10.2169/internalmedicine.0431-17.
- ② Mizugishi Kiyomi, Yamashita Kouhei. Neutrophil extracellular traps are critical for pregnancy loss in sphingosine kinase-deficient mice on 129Sv/C57BL/6 background. *The FASEB Journal*. 査読有 31, 2017, 5577-5591. DOI: 10.1096/fj.201700399RR.
- ③ Arai Yasuyuki, Yamashita Kouhei, Kuriyama Katsutoshi, Shiokawa Masahiro, Kodama Yuzo, Sakurai Toshiharu, Mizugishi Kiyomi, Uchida Kazushige, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi, Kudo Masatoshi, Okazaki Kazuichi, Strober Warren, Chiba Tsutomu, Watanabe Tomohiro. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- α Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *The Journal of Immunology*. 査読有 195, 2015, 3033-3044. DOI: 10.4049/jimmunol.1500971.
- ④ Arai Yasuyuki, Mizugishi Kiyomi, Nonomura Kazuhiko, Naitoh Katsuki, Takaori-Kondo Akifumi, Yamashita Kouhei. Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 査読有 21, 2015, 564-569. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.04.011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者氏名：水岸 貴代美

ローマ字氏名：MIZUGISHI KIYOMI

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：研究員

研究者番号 (8 桁)：70518448

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。