

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10694

研究課題名(和文) 1-アンチトリプシンによるインフラマソーム経路を介した子宮・胎盤炎症の制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of inflammasome-mediated placental inflammation by alpha1-antitrypsin

研究代表者

田村 和広 (Tamura, Kazuhiro)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70281409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生殖器官における多機能タンパク質 1-アンチトリプシン(A1AT)の発現と胎盤炎症における意義を検討した。胎盤絨毛にはインフラマソーム系のひとつNLRP3/カスパーゼ-1/IL-1beta産生経路が存在する。また、絨毛でのサイトカイン発現に内因性A1AT発現が干渉していることが分かった。本知見は、早産を誘発する絨毛膜羊膜炎などの妊娠初期絨毛での炎症にインフラマソーム系が関与し、この経路を構成する分子が新たな治療標的になる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We provide evidence that the NLRP3 inflammasome pathway contributes to IL-1beta secretion in trophoblasts and that glibenclamide partially blocks this pathway. NLRP3 may be involved in placental inflammation such as infection-associated pregnancy complication. A1AT is highly expressed in decidual tissues rather than syncytiotrophoblasts, whereas HTRA1 expression is expressed in syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts (EVT). Functional interaction between decidual A1AT and trophoblastic HTRA1 may regulate trophoblast invasion. Imbalance of both molecules activities might be involved in the progression of HDP, supporting the notion the possible role of A1AT and HTRA1 at the maternal-fetal interface.

研究分野：生殖内分泌学、薬理学

キーワード：胎盤絨毛 インフラマソーム 1-アンチトリプシン HTRA1 栄養膜細胞 脱落膜

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症や絨毛膜羊膜炎に代表される子宮や胎盤での炎症の進展は、不妊や流早産の原因となっており、女性の生活の質(QOL)や出生率の低下を招いている。実験的ヒト内膜細胞移植病変において、炎症反応を伴う病変で α_1 -アンチトリプシン(A1AT)蛋白質が低下していることを確認している。A1ATは炎症を防御すると共に、免疫を司る機能タンパク質と考えられるが、作用機構や生殖機能との関連性は不明である。

2. 研究の目的

炎症反応の惹起に関わる経路としてインフラマソーム経路がある。細胞質受容体 NLRP、Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)、カスパーゼ 1 等から構成される装置である。NLRP3 インフラマソームは、病原体や代謝性ストレスに対する細胞防御を担う。これは、PAMP である LPS (Toll 様受容体 TLR4 リガンド)や細胞障害因子により発生するダメージ関連分子パターン(DAMPs)により活性化され、ASC と会合する。これにより、カスパーゼ 1 の活性化が起こり、IL-1 β 前駆体が活性型の成熟型 IL-1 β となり、分泌される。この IL-1 β は免疫系を調節する多機能サイトカインとして知られるが、ヒト生殖系では IL-1 β は、胎児着床や妊娠成立の他、陣痛発来や子宮頸部の熟化に関与していると考えられている。切迫早産の原因の大半は、卵膜(絨毛膜、羊膜)に細菌が感染する絨毛膜羊膜炎であり、この際に、局所に集積したマクロファージ等の炎症細胞により、IL-1 β 等のサイトカインが放出されることを契機に、頸管熟化や前期破水が起こる。絨毛を構成する栄養膜細胞にも、数種の Toll 様受容体が存在し、病原体や代謝ストレスに反応して内在性免疫反応に関与することが示唆されている。早産における TLR 4 の役割の報告に加えて、羊膜においてオートファジーの減少がインフラマソームを介して IL-1 β 産生に関与することも示唆されている。最近、胎盤発育や妊娠高血圧症でのセリンプロテアーゼの 1 つであるシャペロンプロテアーゼ HTRA1 の関与も報告された。本研究は、子宮内膜や胎盤で産生される A1AT の機能の破綻が、パターン認識受容体インフラマソーム系と関連し、過剰なサ

イトカイン産生増加や異常分子パターンシグナルの異常を引き起こし、内膜症や絨毛膜羊膜炎を増悪するという仮説を検証するために行った。

3. 研究の方法

ヒト妊娠末期胎盤よりパーコール法により単離した栄養膜細胞を用いた。TLR4 リガンド LPS、プリン受容体刺激薬してインフラマソームを活性化する ATP、また、K イオンのアンチポートであるインフラマソーム活性化因ニゲリシンを処置した。セルライゼートを調製して、ウエスタンブロットにてカスパーゼ 1, ASC, IL-1 β の発現量を確認した。リアルタイム qRT-PCR にてインフラマソーム関連因子の発現を解析した。培養メディウム中に分泌された IL-1 β は ELISA にて定量した。また、A1AT siRNA を用いて A1AT 発現抑制の IL-1 β 発現と分泌量への効果をみると共に、胎盤内に発現する分子シャペロン HTRA1 と A1AT の相互作用を検討した。

4. 研究成果

インフラマソーム構成分子の発現:
栄養膜細胞でのインフラマソーム構成タンパク質 ASC、カスパーゼ 1 前駆体、活性型カスパーゼ 1、IL-1 β 前駆体、活性型 IL-1 β の発現を検出した。次に、カスパーゼ 1 活性化に及ぼす LPS とニゲリシンの影響を検討したところ、LPS またはニゲリシン処置は、活性型カスパーゼ 1 の発現量を増加させた。なお、ATP 単独処置での効果は、認められなかった。IL-1 β 分泌量においては、LPS、ニゲリシンで有意な増加がみられ、NLRP3 インフラマソーム経路阻害薬グリベンクラミドの処置は、IL-1 β 分泌量の上昇を抑制した。グリベンクラミドは細胞内 IL-1 β 量も抑制した。

NLRP3 インフラマソームと A1AT 発現との関連性:

カスパーゼ 1 と IL-1 β 発現に及ぼす LPS の効果が、内在性 A1AT 発現により影響されるか否かについて検討した。NLRP3、カスパーゼ 1 と IL-1 β 発現は、A1AT 発現抑制により上昇した。しかし、活性型カスパーゼ 1 レベルと IL-1 β 分泌量に有意な影響はなかった。免疫組織化学的に、脱落膜及び絨毛での A1AT の局在を確認した。HTRA1 は、主に絨毛外

栄養膜細胞に発現していた。栄養膜細胞での LPS 刺激下 HTRA1 蛋白質量は、A1AT 発現抑制により上昇した。主に脱落膜に存在する A1AT が、絨毛外栄養膜細胞に発現し浸潤に関与する HTRA1 の活性を阻害している可能性が推察された。

以上の所見より、絨毛栄養膜細胞においてインフラマソーム系(TLR4/NLRP3/カスパーゼ 1/IL-1 β 産生経路)が機能していること、また、そのサイトカイン発現に内因性 A1AT 発現が干渉していることを示唆した。本知見は、早産を誘発する妊娠初期絨毛での炎症にインフラマソーム系が関与し、本経路を構成する分子が新たな治療標的になる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件) 査読有

Tamura K, Takashima H, Fumoto K, Kajihara T, Uchino S, Ishihara O, Yoshie M, Kusama K, Tachikawa E. Possible role of α 1-antitrypsin in endometriosis-like grafts from a mouse model of endometriosis. *Reproductive Sciences* 22:1088–1097, 2015.

Tamura K, Ishikawa G, Ohneda W, Yoshie M, Nakai A, Takeshita T, Tachikawa E. Glybenclamide inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion in human trophoblasts. *J. Pharmacol. Sci.* 135: 89–95, 2017.

〔学会発表〕(計 10 件)

田村 和広、乙津 舞好、吉江 幹浩、桑原直子ら ヒト子宮内膜間質細胞の炎症反応に及ぼす α 1-アンチトリプシン発現抑制の効果 第 88 回 日本内分泌学会学術総会 (2015 年 4 月東京)
大久保 孝則、田村 和広、吉江 幹浩、乙津 舞好ら ヒト子宮内膜間質細胞の炎症性因子の発現に対する α 1-アンチトリプシン発現の関与 第 132 回 日本薬理学会関東部会 (2015 年 7 月 千葉)

Tamura K, Takashima H, Fumoto K, Kajihara Okubo T, Tamura K, Yoshie M, Ishikawa G, Nakai A, Takeshita T *et al.* Inhibitory action of lipopolysaccharide-induced caspase-1 expression by alpha1-antitrypsin in human trophoblasts. International Federation of Placenta Associations (IFPA) Meeting 2015 Brisbane, Australia.

大根田 若菜、田村 和広、吉江 幹浩、桑原 直子ら ヒト絨毛栄養膜細胞におけるインフラマソーム関連分子の発現と内毒素及び細胞分化の影響 第 74 回 西東京内分泌代謝研究会 (2015 年 12 月 東京)

大根田 若菜、田村 和広、吉江 幹浩、石川 源ら ヒト胎盤絨毛栄養膜細胞におけるインフラマソーム関連分子の発現に及ぼすエンドトキシンの影響 第 89 回 日本薬理学会 (2016 年 3 月 横浜)

大根田 若菜、田村 和広、吉江 幹浩、桑原 直子ら ヒト絨毛栄養膜細胞における NLRP3 インフラマソーム経路の機能 第 134 回 日本薬理学会 (2016 年 7 月 栃木)

Tamura K, Ohneda W, Yoshie M, Ishikawa G, Nakai A, Takeshita T *et al.* Expression of NLRP3 inflammasome-related molecules in human trophoblasts. International Federation of Placenta Associations (IFPA) Meeting 2016 Portland, USA.

奥隅 奈都希、田村 和広、吉江 幹浩、大根田 若菜ら ヒト胎盤絨毛栄養膜細胞におけるインフラマソーム経路の意義 第 21 回日本生殖内分泌学会学術集会 (2017 年 1 月大阪)

田村 和広、大根田 若菜、吉江 幹浩、石川 源ら ヒト胎盤栄養膜細胞でのナイジェリシン誘導性インターロイキン 1 分泌のグリベンクラミドによる抑制 第 90 回日本薬理学会(2017 年 3 月長崎)

田村 和広、吉江 幹浩、大丸 貴子、加藤聖子ら 妊娠高血圧腎症患者の胎盤における SERPINA1 とセリンプロテアーゼ HTRA1 の発現 日本薬学会第 137 年会

(2017年3月仙台)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/shinkeiyakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 和広 (TAMURA Kazuhiro)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号： 70281409

(2) 連携研究者

吉江 幹浩 (YOSHIE Mikihiro)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号： 50434014