

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08275

研究課題名（和文）正常妊娠維持および不育症におけるスフィンゴ脂質代謝の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of sphingolipid metabolism in normal pregnancy and 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：正常妊娠を維持するためには、胎児に対する過剰な免疫反応は制御されなければならない。本研究では、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）が形成されていた。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、脱落膜組織の血管内皮障害が改善した。さらに、NETs形成の鍵となる、peptidylarginine deiminase（PAD）酵素/シトルリン化に着目し、脱落膜組織における新規シトルリン化タンパク質の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然流産は全妊娠の約15%で見られる。不育症とは妊娠は成立するものの流産を繰り返し、最終的に健康な生児を持っていない状態と定義され、習慣性流産とほぼ同義に用いられる。不育症は全妊娠の約3-5%で一般の認知度に比べて非常に高率である。不育症の65%以上は原因不明で難治性のものがかなりの割合で存在する。原因不明の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。我々の研究により、正常妊娠・不育症発症のメカニズムを解明できれば、原因不明の難治性の不育症のスクリーニング法、治療法を確立することができ、最終的には、日本が抱える「少子化問題の解決」に大きく貢献することが期待できる。

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, I demonstrated that neutrophil extracellular traps (NETs) play a key role in the pathogenesis of sphingosine kinase (Sphk)-mediated pregnancy loss. Blocking NET formation protected Sphk-deficient mice from pregnancy loss, and ameliorated vascular injury in the decidua of Sphk-deficient mice. Moreover, I successfully identified novel substrates of peptidylarginine deiminase (PAD), a key enzyme for NET formation, expressed in decidual tissues during normal pregnancy.

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 シトルリン化

様式 C-19、F-19-1 (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、細胞内において、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 蛋白質共役受容体に結合し、血管形成や免疫制御 (特にリンパ球の遊走) などに重要な役割を果たしている。最近、S1P シグナル経路は、悪性腫瘍、多発性硬化症や関節リウマチなどの自己免疫疾患、炎症性腸疾患の発症、進展に深く関与していることが報告されており、注目が高まっている。

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、これまでに *Sphk1/Sphk2* ノックアウトマウスの作製・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ぼ正常である一方、*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^{-/-}* マウスでは、血管内皮細胞の異常による全身の出血、神経管閉鎖不全がみられ、胎生中期に死に至ることが明らかになった (Mizugishi et al. (2005) *Mol Cell Biol.* 25: 11113-11121)。

さらに、Sphk の不完全欠損である *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* の雌マウスには生殖機能に異常があることを見出した。スフィンゴ脂質代謝は正常妊娠中に非常に活性化しており、*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスは、ほぼ 100% の確率で妊娠早期に流産を起こした (Mizugishi et al. (2007) *J Clin Invest.* 117: 2993-3006)。*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 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が子宮内の脱落膜細胞 (decidual cells) および血管内皮細胞に異常に蓄積する。結果として、血管内皮細胞が完全に破壊され、胎児を取り囲む脱落膜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起こり、母親側の要因により、ほぼ全ての胎児が胎生 7.5~8.5 日目に死亡する。以上の結果は、スフィンゴ脂質代謝が子宮内膜脱落膜化および流産の発症に重要な役割を果たしていることを示している。

さらに解析を進める中、*Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 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、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。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みられた (Mizugishi et al. (2015) *J Biol Chem.* 290: 2053-2068)。以上の結果は、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異常により自然免疫系の調節異常、特に好中球の活性化が起こることを示している。さらに、自然免疫系の調節異常の本質は、“neutrophil extracellular traps (NETs)” であることを突き止めた (Mizugishi et al. (2017) *FASEB J.* 31: 5577-5591)。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 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。私は、この NETs がスフィンゴ脂質代謝異常のマウスの不育症発症の中核をなすことを見出した。さらに、Sphk 活性が阻害されたヒトの脱落膜細胞を用いて、ヒト好中球を刺激すると、大量の NETs が誘発されることもわかった。

しかしながら、生理的あるいは病的な妊娠過程に、スフィンゴ脂質代謝が機能する詳細なメカニズムは明らかになっていない。この点を解明することは、正常妊娠維持機構の理解を深めるのみならず、不育症などの疾患の治療法の開発にもつながると考えられる。今回の助成金を得て、上記のテーマを解明するためにさらに研究を進めた。

2. 研究の目的

- 1) 不育症におけるスフィンゴ脂質代謝の役割の解明および治療法の開発
- 2) 正常妊娠維持機構、特に子宮内膜脱落膜化におけるスフィンゴ脂質代謝の役割の解明

3. 研究の方法

1) NETs 形成抑制による不育症の治療

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っている。実際、*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 阻害剤などをマウスに投与し、流産発症率の減少がみられるか検討する。さらに、ヒストンのシトルリン化、血管内皮細胞障害、脱落膜組織障害の変化について、免疫染色、電子顕微鏡などを多用して検討する。

2) 子宮内膜脱落膜化における、スフィンゴ脂質代謝・PAD 酵素の役割

マウス脱落膜組織ホモジェネートを用いて、質量分析により PAD 酵素の基質を同定する。候補分子に対して、免疫組織染色、免疫沈降、ウェスタンブロッティング、リアルタイム PCR、シトルリン化タンパク質に対するサンドイッチ ELISA 法などを用いて、野生型と *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* マウスを比較検討する。

4. 研究成果

1) NETs 形成抑制による不育症の治療

PAD 阻害剤である, Cl-amidine を胎生 5 日目と 7 日目に *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスに投与し、偽薬 (Vehicle) 投与群と比較検討した。胎生 10 日目での流産発症率についての検討では、偽薬投与した *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスでは、ほぼ 100% の胎児が子宮内で死亡していたのに対し、Cl-amidine 投与群では、40% の胎児が正常に発達していた。さらに、胎生 7 日目の組織学的評価では、Cl-amidine を投与した *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスの脱落膜組織では、浸潤している好中球の数は大きく減少し、シトルリン化ヒストン陽性 (NETs 形成) の好中球はほとんど検出されなかった。胎生 7 日目に電子顕微鏡を用いて脱落膜組織障害の評価を行ったところ、偽薬投与した *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスのほぼ 100% で血管内皮細胞の重度の障害がみられたのに対し、Cl-amidine 投与群の *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスでは、約 60% の血管内皮細胞はほぼ正常であった (図 1)。以上の結果から、PAD 阻害剤を用いて NETs 形成を阻害することにより、胎児を取り囲む脱落膜組織障害が改善し、流産の発症率の低下につながる事が明らかになった。以上の結果は、NETs 形成抑制による不育症治療の可能性を示唆する結果であると考えている。

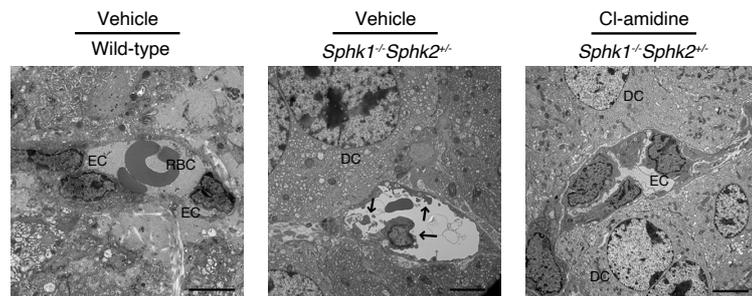


図 1

2) 子宮内膜脱落膜化における、スフィンゴ脂質代謝・PAD 酵素の役割

PAD 酵素には、PAD1-4、PAD6 の 5 種類が存在する。この中で、PAD2 は、胎児 (Em) 周囲の脱落膜組織中の脱落膜細胞に強く限局発現しており (図 2)、PAD 酵素およびシトルリン化タンパク質の子宮内膜脱落膜化における役割が示唆される。今回、脱落膜組織のホモジェネートを用いて、質量分析により、シトルリン化タンパク質の候補分子を同定することに成功した。現在、免疫沈降、ウェスタンブロッティングなどを用いて、シトルリン化タンパク質について、野生型と *Sphk1^{-/-}Sphk2^{-/-}* 雌マウスの比較、発生段階における経時的変化、妊娠子宮における空間的広がり、生理的条件による変化などについて検討中である。

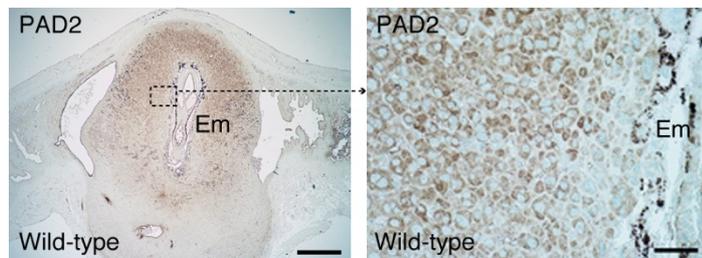


図 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamashita Kouhei, Takaori-Kondo Akifumi, Mizugishi Kiyomi	4. 巻 81
2. 論文標題 Exaggerated neutrophil extracellular trap formation in Kawasaki disease: a key phenomenon behind the outbreak in western countries?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 e177 ~ e177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2020-218593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------