

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18676

研究課題名(和文)酸化ストレスと脱落膜マクロファージのインフラマソーム活性化による不育症の病態解明

研究課題名(英文)Oxidative stress and inflammasome activation of decidual macrophages of recurrent pregnancy loss

研究代表者

後藤 志信(Goto, Shinobu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：90591909

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):不育症の発生率は約4%と稀な疾患でなく、その25%は原因不明であり病態解明が求められる。我々は原因不明不育症患者の酸化ストレスに着目し検討を行った。原因不明不育症患者の非妊娠時血液及び流産手術時に得られた脱落膜組織(妊娠により変化した子宮内膜組織)においては酸化ストレス度の指標であるd-ROMsと抗酸化力の指標であるBAPが共に上昇していることを明らかにした。また流産などの妊娠合併症を引き起こす抗リン脂質抗体症候群患者においても非妊娠時の血液中のd-ROMsとBAPは上昇していた。酸化ストレス等の刺激により活性化されるNLRP3が脱落膜組織中のマクロファージで発現していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年加速する少子高齢化社会において、不育症病態を解明する意義は非常に大きい。原因不明不育症患者の非妊娠時の血液中及び流産組織中で酸化ストレス度が上昇していることをd-ROMs・BAPで検証した研究はこれまでない。本研究で用いた測定装置は簡便に血中ストレス度を測定することができ、非妊娠時の不育症マーカーとして役立つ可能性がある。本研究は横断研究であるため検証のためには今後更なる前向き研究が必要であるが、酸化ストレス度を下げる様々な介入により妊娠予後を改善する試みに繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文):The prevalence of recurrent pregnancy loss (RPL) is about 4% in Japan, and 25% of these cases have no known cause. We focused on oxidative stress in RPL patients. We found that both d-ROMs, an index of oxidative stress, and BAP, an index of antioxidant capacity, were elevated in non-pregnant blood samples and decidual tissue obtained during miscarriage surgery from patients with unexplained RPL. Blood d-ROMs and BAP were also elevated in patients with antiphospholipid antibody syndrome, which causes pregnancy complications such as miscarriage. We also confirmed that NLRP3, which is activated by stimuli such as oxidative stress, is expressed by macrophages in decidual tissue of patients with RPL.

研究分野：不育症

キーワード：不育症 酸化ストレス 脱落膜 マクロファージ インフラマソーム

### 1. 研究開始当初の背景

不育症とは妊娠は成立するが流産や死産を繰り返す状態をいい、日本国内では5%の頻度で見られる。不育症のリスク因子は多岐に渡るが既存の系統的検査を行っても原因が特定できない症例が約25%存在する。またどのリスク因子も不育症に対する明確な治療エビデンスに乏しいのが現状である。唯一、抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome, APS) に対する抗凝固療法の有効性が確認され標準治療となっているが、APS患者では初期流産を免れたとしても妊娠高血圧腎症や胎盤機能不全等の重篤な妊娠後期合併症を発症する確率は依然として高い。胎盤の微小血栓形成が従来よりAPSの流産病態の主体とされているが、それ以外の機序も推察され、未だ明確な結論は出ていない。

申請者はこれまで妊娠初期の胎盤形成期における脱落膜中のマクロファージに注目し、その炎症亢進作用が不育症病態に関与することを報告してきた。一方生体の自然免疫機構における炎症応答として、マクロファージの細胞質に存在する蛋白複合体である“インフラマソーム”が知られている。インフラマソームの構成要素の一つであるパターン認識受容体 NLRP3 は活性酸素等の生体内に発生した様々な非感染性の刺激に応答し、IL-1ファミリー等の炎症性サイトカインを産生することが知られているが、これらの不育症への関与については未だ明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究では生体の自然免疫機構における炎症応答であるインフラマソーム活性化機構の一つである酸化ストレスが原因不明不育症患者で上昇しているかを明らかにし、更に活性化の結果産生が刺激される、IL-1ファミリーサイトカインの一種であるIL-33と絨毛の浸潤に関わるプロテアーゼMMPs/TIMPsの関与を解析することを目的とし、臨床検体を用いて検討を行った。

### 3. 研究の方法

臨床検体における酸化ストレス状態とインフラマソーム関連蛋白の発現状態を以下の方法を用いて検討する。さらに前述と妊娠帰結ならびに絨毛の浸潤マーカー (MMPs/TIMPs等) の関連を検討する。

- a) フリーラジカル解析装置 (現有設備) / 測定キットを用いた酸化ストレス度及び抗酸化力測定
- b) 免疫組織染色法：酵素法及び蛍光多重染色法によって、蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて上記各蛋白質の発現部位及び共局在の有無を観察する
- c) SDS-PAGE/western blotting法、ELISA法による各蛋白質の発現量測定
  - ・ 対象群及び対照群：インフォームドコンセントの得られた2回以上の流産歴を持つ原因不明反復流産患者及び抗リン脂質抗体症候群と診断された患者 (対象群) と、流産歴のない健常女性 (対照群) を比較検討する。
  - ・ 検体：血漿、子宮頸管粘液、子宮内組織 (稽留流産と診断された患者の子宮内容組織について、脱落膜及び絨毛組織を分離して採取)

#### 4 . 研究成果

流産脱落膜組織においてマクロファージのマーカーであるCD14陽性細胞にインフラマソームの形成に関与するNLRP3が発現していることを免疫組織染色法で確認した。また、血漿中のd-ROMsとBAPは共に不育症患者で健常人よりも有意に高値であった(共に $p < 0.05$ )。流産手術時に得られた組織のd-ROMsとBAPを絨毛染色体正常群と異常群で比較したところ、絨毛組織では明らかな差は認められなかったが、脱落膜組織では染色体正常群で有意にBAPの上昇が認められた。妊娠初期の頸管粘液中のd-ROMsとBAPは生児獲得群・流産群共に有意に正の相関を示していた(live-birth:  $r=0.71$ ,  $p=0.02$ , miscarriage:  $r=0.98$ ,  $p<0.0001$ )。また抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome, APS) 合併患者の非妊娠時血漿中d-ROMs及びBAPは共に有意に上昇しており既報告とも合致していた。APS患者で流産が引き起こされる分子機序については諸説あるが、酸化ストレス上昇が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Megumi Nonobe, Shoko Ide, Fumiko Ozawa, Shinobu Goto, Tamao Kitaori, Tatsuhiko Hojou1, Mayumi Sugiura, Yasuhiko Ozaki
2. 発表標題 Role of oxidative stress and anti-oxidative potency in patients with recurrent pregnancy loss
3. 学会等名 14th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction /The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinobu Goto, Fumiko Ozawa, Ryosuke Mori, Yuki Obayashi, Tamao Kitaori, Yasuhiko Ozaki, Mayumi Sugiura
2. 発表標題 Role of IL-33, MMPs and TIMPs in decidua of recurrent pregnancy loss patients
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤志信、小澤史子、大林勇輝、吉原紘行、北折珠央、杉浦真弓、尾崎康彦
2. 発表標題 不育症病態における妊娠初期脱落膜中のIL-33とMMPs・TIMPsの役割
3. 学会等名 第3回日本不育症学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
研究協力者	尾崎 康彦  (Ozaki Yasuhiko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	小澤 史子  (Ozawa Fumiko)		
研究協力者	野々部 恵  (Nonobe Megumi)		
研究協力者	杉浦 真弓  (Sugiura Mayumi)		

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