

機関番号 : 12601

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591907

研究課題名 (和文) 妊娠の成立と維持における胎盤炎症反応系の生理的・病理的役割に関する研究

研究課題名 (英文) Physiological and pathological roles of inflammation system in placenta during pregnancy.

研究代表者

藤井 知行 (FUJII TOMOYUKI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 40209010

研究成果の概要 (和文) :

妊娠の成立と維持における胎盤炎症反応系の役割に関する研究として、トロホプラスト上のCD1d抗原と、リゾリン酸(LPA)系に注目して検討した。その結果、CD1d抗原については、妊娠初期胎盤の未分化なトロホプラスト上のCd1d抗原が、絨毛外トロホプラスト(EVT)に分化するにつれて発現が減弱する現象は、自らの分泌するトランスフォーミング増殖因子ベータ(transforming growth factor-beta(TGF-beta))により誘導されていること、CD1d抗原が提示するフォスファチジルセリン(phosphatidylserine (PS))に結合したベータ2糖タンパクI(β_2 glycoprotein I (β_2 GPI))を、 β_2 GPI依存性抗リン脂質抗体が認識することにより、トロホプラストからのインターロイキン(interleukin)-12分泌が促進され、胎盤における過剰な炎症反応が誘導されて、流産が発症する可能性を示した。また、リゾリン酸(LPA)系については、トロホプラストがLPA産生酵素として最も重要なオートタキシン(ATX)を発現していること、その発現が妊娠経過とともに促進されていること、切迫早産患者で血中濃度が上昇していることを明らかにし、LPAが妊娠の生理と病理に関与している可能性を示した。

研究成果の概要 (英文) :

To clarify the physiological and pathological roles of inflammation system in placenta during pregnancy, we investigated the roles of CD1d antigen on trophoblasts and of lysophosphatidic acid (LPA) system in placenta. The decrease of CD1d expression on cytotrophoblasts with extravillous trophoblast (EVT) differentiation was induced via transforming growth factor (TGF) - β secretion by trophoblasts. β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI)-dependent anti-phospholipid antibody induced interleukin-12 release from trophoblasts via recognition of β_2 GPI bound to phosphatidylserine on CD1d on trophoblasts, which might cause pregnancy loss via inflammatory mechanism.

Trophoblasts expressed the major lysophosphatidic acid (LPA) producing enzyme, autotaxin (ATX). RNA amounts of ATX in placenta tissues increased with gestational

weeks. The serum concentration of ATX protein was higher in patients with preterm labor than that in normal pregnant women. These results suggest the physiological roles of its bioactive resultant substance, LPA, during pregnancy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生殖免疫学、生殖内分泌学、周産期医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：1. 妊娠、2. 胎盤、3. 炎症、4. CD1d、5. 不育症、6. 抗リン脂質抗体、7. invariant NKT

1. 研究開始当初の背景

受精卵は、胞胚期に子宮内膜に着床し、その中に侵入していくが、この過程で、内膜組織を破壊し、浸潤する必要がある、炎症反応が重要であると考えられている。したがって、妊娠局所における炎症反応の詳細を検討することは、妊娠成立および維持における免疫反応の仕組みを明らかにするために非常に重要である。しかし、従来の妊娠免疫に関するほとんどの研究は、母体の胎児に対する移植免疫反応がいかに抑制されているかという視点に立って行われ、胎盤局所の炎症反応についての研究はほとんどなされてこなかった。したがって、妊娠の生理と病理において、胎盤における炎症反応がどのように誘起され、制御され、機能しているのかは、必ずしもよくわかっていなかった。そこで、炎症に関連する反応系は多数存在するが、その中で特に、(1)CD1d/インバリアントナチュラルキラーT細胞(invariant natural killer T cell (iNKT))系と、(2)オートタキシン(autotaxin (ATX))/リゾリン酸(lysophosphatidic acid (LPA))系に注目し、

妊娠現象における、炎症反応系の生理的、病理的意義について検討することとした。

2. 研究の目的

(1)CD1d/ iNKT 系の妊娠の生理と病理における役割

MHC クラス Iと構造上非常に類似しているCD1dは、母体胎児面に位置するトロホブラストで発現しており、細胞性トロホブラストが子宮脱落膜に浸潤してEVTに分化するにつれ、発現が減弱する。また、CD1dと特異的に反応するiNKTが、ヒト母体胎児面に存在していることが報告されている。CD1dのiNKTとの結合や、抗体結合によるCD1d分子の架橋反応が起こると、CD1d陽性細胞からはインターロイキン(interleukin (IL))-12などの向炎症性サイトカインが分泌される。胎盤において、胎児側のCD1d陽性トロホブラストと母体(子宮)側のiNKTとは、相互作用により適度な炎症反応を起こすことで胎盤形成に重要な役割を担っている可能性が考えられている。一方、不育症の原因の中で重要な抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome; APS)

は、フォスファチジルセリン (Phosphatidylserine(PS)) などの陰性荷電を持つリン脂質に対する自己抗体の産生により引き起こされる。しかしAPLの真の対応抗原はリン脂質そのものではなく、リン脂質に結合するベータ2糖タンパクI (\cdot_2 -glycoprotein I (\cdot_2 GPI)) などの血漿蛋白である。 \cdot_2 GPIは細胞膜リン脂質に結合し血液凝固を抑制する因子である。 \cdot_2 GPI依存性抗カルジオリピン抗体は、この機能を妨げ凝固能を亢進させて血栓傾向を誘導し、胎盤内の血栓形成を促進させるために胎盤機能不全が生じ流産を引き起こすと考えられてきた。しかし胎盤血管形成がなされ血流が確立する妊娠 9-10 週以前の流産についてはそれだけでは説明困難である。CD1dは自己の糖脂質であるPSを提示している。 \cdot_2 GPI依存性抗カルジオリピン抗体が、PSと結合したCD1dを介し直接的にトロホブラストに作用し、サイトカイン分泌を促進することにより流産に関与している可能性がある。

本研究では、胎盤トロホブラストにおけるCD1d 抗原の発現調節機序と妊娠維持機構における生理学的役割を明らかにし、さらに抗リン脂質抗体症候群による不育症の発症メカニズムへの CD1d 抗原の関与を解明することを目的とした。

(2) オートタキシン (autotaxin (ATX)) / リン酸 (lysophosphatidic acid (LPA)) 系の妊娠の生理と病理における役割

炎症誘導物質の1つであるLPAは多様な機能を有しており、主として細胞外に存在するATXによって合成されている。ATXは、LPAの活性調節、細胞外液中濃度の調節に非常に重要と考えられており、ATX濃度は細胞外液中のLPA活性と強く相関する。妊娠中、血中ATX濃度は妊娠週数とともに上昇し、分娩後ただちに非妊娠レベルまで低下することが知ら

れており、胎盤、特にトロホブラストによるその産生が想像されている。そこで、ATXと、LPA-2をはじめとするLPAの受容体の胎盤における発現状況を解析し、胎盤におけるATX/LPA系の生理的意義について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究において、ヒト検体を用いた実験はすべて、東京大学医学部倫理委員会の承認を受け、さらに提供者本人から文書によるインフォームドコンセントを得たうえで実施した。

(1) CD1d/ iNKT 系の妊娠の生理と病理における役割

A) 妊娠の生理における役割

(i) 妊娠初期胎盤から採取したトロホブラストを一次培養し、そのCD1d発現を、RNAレベル、タンパクレベルで検討した。なお、この一次培養系では、トロホブラストは絨毛外トロホブラスト (EVT) に分化していくことがすでに証明されている。次いで、調節因子としてトロホブラストが分泌するサイトカインのうち、トランスフォーミング増殖因子ベータ (transforming growth factor- $\cdot\cdot$ (TGF- $\cdot\cdot$)) に注目し、それによるCD1d発現変化を検討した。

(ii) 抗CD1d抗体およびクロスリンカーとしての二次抗体を上記トロホブラスト一次培養系に添加して、CD1dの架橋反応が誘導されるか検討した。

B) 妊娠の病理、特に抗リン脂質抗体陽性不育症発症機序における役割

(i) ヒト絨毛癌由来の細胞株JEGに、CD1d遺伝子、または機能実験における陰性コントロールとして細胞外構造がCD1d、細胞内構造がCD1aであるキメラ分子 (細胞内へのシグナル伝達を行わない) CD1d/aを導入し、CD1dあるいはCD1d/aを恒常的に発現するトロホブラ

スト株JEG/CD1dおよびJEG3/CD1d/aを樹立した。次いで、CD1dあるいはCD1d/a、PS、 \cdot_2 GPIの細胞表面存在をフローサイトメトリー法によって観察した。またCD1dとPS- \cdot_2 GPI複合体の結合をIP-ウェスタンブロット法で確認した。

(ii) JEG/CD1d、JEG3/CD1d/a、JEGに対して、抗CD1d抗体およびクロスリンカーとしての二次抗体を添加し、CD1d抗原の架橋反応が誘導されるか、炎症性サイトカインであるIL-12の発現を検討した。また、抗 \cdot_2 GPI抗体は \cdot_2 GPI 2分子と結合することから、抗 \cdot_2 GPI抗体単独でも架橋反応様の反応が生じないかと考え、各トロホブラスト株培養系に抗 \cdot_2 GPI抗体を単独で添加して、IL-12の発現を検討した。

(iii) 脱落膜中の母体iNKTと胎児側CD1dの相互作用を検討するため、ヒト脱落膜から脱落膜リンパ球を分離し、iNKTの増殖誘導剤 α GalCerを7日間添加して培養した。添加前後でV α 24V β 11陽性iNKTの細胞数をフローサイトメトリー法で比較した。JEG/CD1dもしくはJEGに、 α GalCer刺激した脱落膜iNKTを加え共培養し、上清中のIL-12の濃度を測定した。さらに、JEG/CD1d、JEG3/CD1d/a、JEGに、脱落膜iNKTを加えた共培養系に抗 \cdot_2 GPI抗体またはコントロールIgGを添加した群と添加しない群で、炎症性サイトカインIL12、IFN γ 、およびIL-4の産生を検討した。

(2) ATX/LPA系の妊娠の生理と病理における役割

A) 妊娠の生理における役割

(i) 妊娠初期、中期、後期(予定帝王切開例)の胎盤を採取し、抗ATX抗体により免疫組織染色をした。また、胎盤組織中のATXタンパクの有無を抗ATX抗体によるウェスタンブロット法で検討した。

(ii) 上記胎盤から、RNAを抽出し、ATXの発

現量を定量的RT-PCRで検討した。

B) 妊娠の病理における役割

妊娠合併症として、切迫早産に注目し、入院患者の血清中ATX濃度を正常妊婦とELISA法で比較検討した。

4. 研究成果

(1) CD1d/iNKT系の妊娠の生理と病理における役割

A) 妊娠の生理における役割

(i) EVTに分化するトロホブラスト一次培養系において、トロホブラスト上のCD1d発現は、培養時間とともに減少したが、HLA-Gの発現は増加した。EVTにおけるCD1d発現の減少が、サイトカインを介して制御されている可能性を考え、TGF- \cdot_1 に注目して検討した。EVTからのTGF- \cdot_1 分泌をELISAにて検討したところ、EVT培養上清中のTGF- \cdot_1 濃度が経時的に増加していくことがわかった。このことは、培養EVTがTGF- \cdot_1 を分泌していることを示している。EVTの培養上清中にTGF- \cdot_1 またはインターフェロン(interferon (IFN))- \cdot を添加し、CD1d発現に及ぼす影響を検討したところ、IFN- \cdot は、発現を促進したが、TGF- \cdot_1 は抑制した。CD1d発現の減少は、TGF- \cdot_1 を中和することによって緩和された。

(ii) トロホブラストの一次培養系に抗ヒトCD1d抗体を添加したところ、トロホブラストからのIL-12 p70分泌が誘導された。

以上より、妊娠の生理において、EVTは、自己の分泌する発現するTGF- \cdot_1 により、CD1dの発現を減少させていることがわかった。

B) 妊娠の病理、特に抗リン脂質抗体陽性不妊症発症機序における役割

(i) JEG3/CD1d/、JEG3/CD1d/aの細胞表面において、CD1d、PS、 \cdot_2 GPIが複合体を形成していることが確認された。

(ii) 抗CD1d抗体＋二次抗体による架橋反応では、JEG/CD1dにおいてIL-12 誘導能の増加が確認された。JEG/CD1dにおけるIL-12 誘導能の増加は抗・ α_2 GPI抗体単独でも認められた。(iii) 脱落膜リンパ球に対する α GalCer刺激によりiNKTの細胞数が約 15 倍に増加した。脱落膜iNKTとJEG/CD1dとの共培養では、培養液中のIL12 濃度上昇が確認された。この共培養を抗・ α_2 GPI抗体存在下で行うと、さらに大量のIL12 産生が認められた。また、この実験において、JEG/CD1d細胞との共培養でのみ、IFN- γ 産生が増加した。IL-4 の産生は変わらなかった。

以上より、生理的状态では、トロホプラストのCD1dと脱落膜iNKTとの相互作用で産IL-12 が産生され、適度な炎症が誘導されて、胚の着床が促進される。しかし、 α_2 GPI依存性抗リン脂質抗体が存在すると、CD1dの架橋反応→IL12 産生→脱落膜iNKTによるIFN- γ 産生→CD1d発現促進＋過度の炎症誘導→流産のサイクルが生じ、不育症が発症するという機序の存在が推測された。本研究成果は、国内、国外の学会で発表し、American Journal of Reproductive Immunologyに掲載予定である。

(2) ATX/ LPA 系の妊娠の生理と病理における役割

A) 妊娠の生理における役割

(i) 妊娠初期、中期、後期（予定帝王切開例）のすべての時期において、胎盤組織中の ATX タンパクが免疫組織染色およびWestern blot で検出された。ATX は主としてトロホプラストが発現しており、絨毛性合胞体トロホプラスト、絨毛性細胞性トロホプラスト、絨毛外細胞性トロホプラストのすべての種類のトロホプラストに発現が証明された。

(ii) 定量的 RT-PCR により、胎盤組織中の ATX mRNA 量が妊娠週数とともに上昇することが

証明された。この動態は、ATX タンパクの妊娠中血中濃度推移と一致していた。

B) 妊娠の病理における役割

(i) 切迫早産患者の血中 ATX タンパク濃度は正常妊婦に比べ、優位に上昇していた。

以上より、妊娠中に母体血中に増加する ATX は胎盤、中でもトロホプラストが産生しておることがわかった。また、血中 ATX 濃度の妊娠週数に伴う上昇は、胎盤における産生量の増加によるものであることが明らかになった。さらに、切迫早産患者では血中 ATX 濃度が高いことが示され、血中 LPA 量の増加によろ子宮筋の収縮増加が病態発生の一端を担っていると考えられた。本研究により、ATX/ LPA 系が、妊娠の生理と病理に関与している可能性が示された。

本研究成果を、英文雑誌に論文発表した。

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 1 件)

1. Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, Matsumoto J, Tomio A, Hyodo H, Yamashita T, Oda K, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Taketani Y: Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. Am J Reprod Immunol 2009; 62:90-95. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 岩澤有希, 川名敬, 藤井知行, 永松健, 松本順子, 三浦紫保, 山下隆博, 兵藤博信, 上妻志郎, 武谷雄二妊娠初期における絨毛細胞上のCD1dと脱落膜invariant NKT細胞の相互作用に関する研究第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 東京, 2010. 4
2. Iwasawa Y, Kawana K, Miura S, Fujii T:

A novel pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with α -2glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibody through CD1d on the trophoblast. 14th International Congress of Mucosal Immunology. Boston, MA, USA, 2009. 7

3. Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Nagamatsu T, Matsumoto J, Miura S, Yamashita T, Hyodo H, Kozuma S, Taketani Y: A possible pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with α -2 glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibody through the function of CD1d. 29th Annual Meeting of The American Society for Reproductive Immunology, Orlando, FL, USA, 2009. 6
4. 岩澤有希, 川名敬, 藤井知行, 永松健, 松本順子, 三浦紫保, 吉田志朗, 兵藤博信, 山下隆博, 上妻志郎, 武谷雄二: 絨毛細胞上に存在するリン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した、 α -2glycoproteinI依存性抗リン脂質抗体による新規流産メカニズムに関する検討. 第61回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 京都, 2009. 4
5. 岩澤有希, 川名敬, 藤井知行, 永松健, 松本順子, 三浦紫保, 山下隆博, 兵藤博信, 上妻志郎, 武谷雄二: 絨毛細胞上に存在するリン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した、 α -2glycoprotein I依存性抗リン脂質抗体による新規流産メカニズムに関する検討. 第23回日本生殖免疫学会総会・学術集会. 富山. 2008. 12

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 知行 (FUJII TOMOYUKI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 40209010

(2) 研究分担者

川名 敬 (KAWANA KEI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60311627

(3) 連携研究者

兵藤 博信 (HYODO HIRONOBU)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 00436495