

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：25861469

研究課題名(和文) 血漿RNAはTLR3を介して妊娠高血圧症候群を惹起する

研究課題名(英文) Plasma RNA induces inflammatory response of preeclampsia via TLR3 activation.

研究代表者

中田 恵美里 (NAKADA, Emiri)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30447289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：TLRsは外因性物質のみならず内因性物質を認識し炎症性疾患の発症に関わる。全身性炎症反応を伴う病態である妊娠高血圧症候群PIHにおいて、血中RNAが絨毛細胞のTLR3を介して炎症反応を惹起しPIHの病態形成に関与するとの仮説を立て研究を行った。リポソームでカプセル化した血漿由来のRNAは絨毛細胞TLR3経路の炎症反応を亢進させた。PIHの血漿RNAによる刺激は、正常妊娠RNAの刺激に比し炎症反応をより強く惹起する傾向にあった。これはPIH患者血漿中のRNAがTLR3を介してその病態形成に関与している可能性を示しており、今後のPIHの予防及び治療の可能性を広げるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptor (TLR)-mediated inflammation is believed to be of critical importance not only in systemic infectious diseases but also in non-infectious auto-immune disorders. Preeclampsia is characterized by a systemic inflammatory response. TLRs are known to bind to pathogen-associated molecular patterns expressed by microorganisms and endogenous molecules. We tested the hypothesis that plasma-derived mRNA in preeclampsia induces an inflammatory response in a trophoblast cell via TLR3 and pathogenesis of Preeclampsia. We found trophoblast cells respond to TLR3 stimulation with plasma-derived RNA resulting in expression of inflammatory mediators. Preeclamptic plasma derived RNA signals induced a higher inflammatory response via TLR3. The lipid encapsulated RNA that is observed in the blood of patients with Preeclampsia may be an important endogenous ligand for TLR3. TLR3 ligation then may contribute to the inflammatory response that defines preeclampsia.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠高血圧症候群 TLR3

1. 研究開始当初の背景

(1) 妊娠高血圧症候群 Pregnancy induced hypertension (PIH)は妊娠母体の全身性急性炎症反応を伴う病態である。この全身性炎症反応はPIHにおける様々な産科的合併症の病態形成に関与すると考えられているが、その病因や詳しい病態は明らかにされておらず、治療法も確立していない。

(2) 近年、全身性炎症反応を伴う各種疾患における自然免疫機構の果たす役割が解明されるようになった。特に Toll-like receptors (TLRs)は、様々な病原体に共通して存在する構造を認識する重要な受容体として注目されている。最近の研究では、TLRsは外来性の病原体物質のみならず自己由来の内因性物質にも応答することが報告され、炎症反応を伴う様々な病態発症のメカニズムに関与することが明らかとなった。

(3) TLR3 のライガンドとしてウィルスの dsRNA やそれを模した合成配列の polyI:C が知られている。絨毛以外のいくつかの細胞において TLR3 が自己の壊死細胞由来の RNA などの内因性ライガンドを認識する可能性が報告された。

しかし、絨毛細胞においてこれらの内因性 RNA が TLR3 を介して炎症を惹起するかどうかは明らかとされていない。

2. 研究の目的

PIH の血中では正常妊娠に比べ、胎児胎盤由来の RNA が多く検出されることが報告されている。

そこで、妊娠中の母体では、絨毛細胞に発現されている TLR3 が胎児胎盤から血中に放出されている内因性の RNA を認識して炎症性メディエーターを産生することにより、PIH の病態形成・維持に関与しているとの仮説を立てて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 絨毛細胞に対し各種 TLR ライガンド刺激を行い、惹起される炎症反応と反応経路について検討する。

(2) 特に TLR3 刺激に関し、ヒト血漿由来の RNA を用い、惹起される炎症反応と反応経路について検討する。

(3) PIH 血漿由来の RNA による刺激と正常妊娠血中の RNA による刺激を比較し、TLR3 を介する反応にどのような違いがあるか検討する。

4. 研究成果

(1) ヒトでは TLR1 から TLR10 までの 10 種類の TLR が報告されている。絨毛細胞はこれら各種 TLRs を発現していることから、絨毛細胞株を各種 TLRs ライガンドで刺激する実験を行った。ライガンドとして、TLR2 にペプチドグリカン PGN、TLR3 に polyI:C、TLR4 にリポポリサッカライド LPS、TLR5 にフラジェリン、TLR7 にロキソリピン、TLR9 に CpG DNA を使用した。

絨毛細胞の TLR 刺激により、炎症性メディエーターの遺伝子発現量と蛋白濃度がどのように変化するか検討した。その結果、絨毛細胞において、各種 TLR 刺激の中で、TLR3 刺激が最も効果的に炎症性ケモカインである RANTES の産生を誘導することがわかった。

そこでこれ以降は TLR3 に注目して研究を行った。

sFLT-1、soluble FMS-related tyrosine kinase-1 は別名 soluble VEGF receptor-1 と呼ばれる。VEGF は代表的な血管新生因子であるが、sFLT-1 はそのレセプターである VEGF-R のスプライシングバリエーションとして産生される。sFLT-1 は VEGF と VEGF-R の結合を競合的に阻害することで、アンタゴニストとして作用し血管新生を抑制する。

正常妊娠では妊娠初期に絨毛細胞が子宮筋層へ浸潤する際に、子宮らせん動脈の再構築と拡張が生じ、子宮胎盤血流量が増加する。これに対し、PIHでは、絨毛細胞の浸潤やらせん動脈の再構築に異常が認められるが、sFLT-1はこの過程の障害に関与する形でPIHの発症に関与すると考えられている。

sFLT-1濃度はPIHの症状発現に先立って上昇すること、さらに、妊娠ラットへのsFLT-1投与によりPIH様の症状を誘導できることも報告され、sFLT-1はその臨床マーカーとして、また病原因子として注目を集めるようになった。

そこで、各種TLR刺激の中でTLR3刺激が特に顕著に炎症反応を誘発したことから、次にTLR3刺激が絨毛細胞においてsFLT-1産生を惹起するか検討した。

polyICによるTLR3刺激に対して絨毛細胞のsFLT-1産生は有意に増加した。

その産生はHELAやHUVECといった他の細胞では認められず、絨毛細胞に特徴的であった。TLRのシグナル伝達経路としては、NF- κ Bとinterferon regulatory factor IRFの2種類の主要な経路が報告されている。そこで、reporter gene assayを用いてシグナル伝達経路に関する検討を行った。

その結果、絨毛細胞において、TLR3刺激によりNF- κ B、IRFの両経路共に活性化されることを確認した。

(2) TLRは外来性の微生物由来の成分ばかりでなく、内在性の成分を認識することが明らかとなってきた。

従来知られているTLR3のライガンドはウィルス由来のdsRNAとそれを模した合成配列であるpolyICだが、近年、絨毛以外のいくつかの細胞においてTLR3が自己の壊死細胞由来などの内因性mRNAを認識することが報告された。

かねてより、母体の血漿中には胎児胎盤由来

のRNAが検出されることが報告されていることから、このRNAとTLR3に注目し、ヒト血漿由来のRNAが絨毛細胞のTLR3を介した炎症反応を惹起するとの仮説を立てて実験を行った。

ヒト血漿由来のRNAをもとに合成したRNAを用いて絨毛細胞を刺激する実験を行った。

その結果、リボソームでカプセル化した合成RNAが絨毛細胞の炎症性メディエーターRANTESの産生を亢進させることを確認した。さらにリボソーム化RNA刺激によるRANTES産生がTLR3を介したものであることを証明するためにTLR3のノックダウンを行った。その結果、RNA刺激により増加した炎症性メディエーター産生は、TLR3siRNAにより有意に抑制され、この反応がTLR3を介したものであることを確認した。

また、シグナル伝達経路に関する検討を行い、リボソーム化RNA刺激によるTLR3を介した炎症反応はNF- κ B経路の活性化を促し、RANTES産生を惹起し、また、ISRE経路の活性化を促し、interferon- γ 産生を惹起することを確認した。

(3)次にPIH症例と対照症例より採取した血液サンプル中のエクソソームから単離・精製したRNAを用いて絨毛細胞株を刺激する実験を行なった。その結果、PIH症例のRNA刺激では対照症例のRNA刺激に比べ、TLR3を介した炎症反応がより強くより早く惹起される傾向にあることを確認した。

(4)以上の研究結果は、PIHの病態形成にTLR3を介する経路が関与する可能性、PIH患者血漿中のリボソーム化された物質がそのライガンドとして働いている可能性を示している。今後のPIHの予防及び治療の可能性を広げるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

中田恵美里、血漿 RNA は TLR3 を介して妊娠高血圧症候群を惹起する、産科と婦人科、査読無、Vol.82、No.12、2015、1434-1435

6. 研究組織

(1)研究代表者

中田 恵美里 (NAKADA, Emiri)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30447289