

博士論文(要約)

妊娠高血圧症候群における

胎児・母体境界面の炎症とその制御

(脱落膜マクロファージ並びに絨毛細胞の

NLRP3 インフラマソームに着目して)

須 江 英 子

論文の内容の要旨

論文題目 妊娠高血圧症候群における胎児・母体境界面における炎症とその制御
(脱落膜マクロファージと絨毛細胞の NLRP3 インフラマソームに着目して)

氏名 須江英子

(目的) 妊娠高血圧症候群 (以下 PIH) は妊娠 20 週以後、分娩後 12 週までに高血圧が見られる場合、または高血圧に蛋白尿を伴う場合のいずれかでかつこれらの症状が単なる妊娠の偶発合併症によるものではないものと本邦では定義される。PIH は全身血管内皮細胞障害と血管透過性の亢進や凝固能亢進がおこり、高血圧や蛋白尿だけでなく、肝機能障害、凝固線溶系異常、中枢神経系異常等、致命的な多臓器障害の契機となり得る。また分娩後にも、高血圧、心疾患、脳卒中等の発症リスクとなる。さらに本症では母体のみならず胎児にも悪影響を与える。すなわち、子宮胎盤循環障害により低酸素血症、低栄養を招き、子宮内胎児発育不全や羊水過少、胎児死亡に至る場合もある。また本症の現在のところ唯一の治療法である分娩の終了により、人工早産を余儀なくされる場合があり、その際は低出生体重児として出生した児が将来メタボリック症候群を罹患しやすくなる等、その影響は生涯にわたる。このように周産期医学の分野の中でも、PIH は母児双方の長期にわたる影響を与える疾患にも関わらず、予防・治療法に関する知見は乏しい。

PIH の病因は、妊娠初期の胎盤形成不全とそれに伴う胎盤での虚血・炎症により、胎盤から分泌されたサイトカイン、抗血管新生因子等が、母体循環に放出され、母体の全身血管内皮細胞が障害されることによると考えられている。またそれらの因子により胎盤の血管内皮細胞も障害され、胎盤では更に虚血・炎症が進むという悪循環が本症の増悪に関与する。

NLRP は、Nod-like receptor (NLR) ファミリーに属するパターン認識受容体である。NLR ファミリータンパク質は、N 末端にエフェクター領域を含む Pyrin ドメイン、CARD ドメイン、BIR ドメインのいずれかを有し、NACHT とリガンド領域であるロイシンリッチリピートの構造である。主にマクロファージをはじめとする食食細胞に存在し自然免疫に関与する。NLRP3 は AIM2 等のセンサーとともにリガンドと結合すると、オリゴマーを形成する。このオリゴマーとシグナルを伝達する ASC およびプロテアーゼ活性化をおこなう Caspase-1 を含めたタンパク質複合体が NLRP3 インフラマソームである。Caspase-1 はサイトカイン IL-1 β や IL-18 のプレカーサーを活性型に変化させ、細胞外に分泌して炎症を惹起する。NLRP3 インフラマソームの誘導因子としては、LPS、尿酸結晶、細胞外 ATP、細胞性毒素等が知られている。

近年この NLRP3 インフラマソームの活性化が様々な炎症性疾患や悪性腫瘍等の病態に関与していることが報告され治療標的となりうると考えられている。PIH についても上記のように胎盤局所での炎症がその病因の主座であるが、これまで本症と NLRP3 インフラマソームの関連について調べられた報告はほとんどない。

そこで今回、NLRP3 インフラマソームが本症の病態、特に本症の病因の主座である胎児母体境界面の炎症に関連するかどうかを検証するために、特に胎児母体境界面における免疫担当細胞の中で最も割合が高く、また自然免疫の主たる役割を担う脱落膜マクロファージ、並びに、各種パターン認識受容体を発現し、自然免疫に関与していることが知られる絨毛細胞に着目し、研究を行った。また私は、PIH の治療や予防という観点から、NLRP3 インフラマソームを制御する可能性のある因子、かつ妊娠中にも比較的安心して投与できる因子として、食品化合物に着目し、なかでもオメガ 3 脂肪酸である EPA (エイコサペンタエン酸)、DHA (ドコサヘキサエン酸) とレスベラトロールの NLRP3 インフラマソームの抑制効果について検討した。

(方法)

本研究は東京大学医学部附属病院での研究倫理審査委員会にて承認を得ており、検体は患者の書面による説明と同意のもとに採取した。脱落膜マクロファージは、選択的帝王切開術で娩出された羊膜より採取した (n=78)。無菌下に羊膜を PBS にて洗浄し、脱落膜を分離した。1% コラゲナーゼ及びリコンビナント DNase I を加え攪拌した。脱落膜細胞を、Ficoll-Paque を用いて遠心し、密度

勾配分離した。絨毛細胞としては妊娠初期不死化絨毛細胞株 (Swan71) を用いた。

NLRP3 インフラマソームの刺激系として、LPS 並びにニゲリシン、ATP、尿酸ナトリウムを用いた。また NLRP3 インフラマソームの抑制系としてオメガ3 脂肪酸とレスベラトロールを用いた。具体的な培養方法は、まず細胞を LPS にて刺激し、その後、オメガ3 脂肪酸もしくはレスベラトロールを添加し、ニゲリシンもしくは ATP、尿酸ナトリウムの刺激を加えた。上清を回収し、直ちに -80 度で保管した。上清中の IL-1 β 、IL-18、Caspase-1 濃度は ELISA 法を用いて測定した。

データ解析は、JMP ソフトウェアを用い、結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。

(結果)

LPS 前処置後ニゲリシン投与を行い、NLRP3 の刺激によって分泌される代表的な因子である IL-1 β の濃度を測定した。LPS 単独群、ニゲリシン単独群と比較して LPS 前処置を行ったニゲリシン群で上清中 IL-1 β 濃度が 20.0 ± 2.0 倍に増加した。IL-18 の濃度も同様にニゲリシン単独群と比較して LPS 前処置を行ったニゲリシン群で 57.6 ± 12.8 倍に増加した。

次に、オメガ3 脂肪酸が NLRP3 インフラマソームを抑制するかを検証した。EPA もしくは DHA を添加すると、LPS 前処置ニゲリシン添加によって上昇した IL-1 β 分泌は EPA 添加によって $69.5 \pm 5.6\%$ 、DHA 添加によって $72.3 \pm 10.3\%$ それぞれ抑制された。LPS 前処置 ATP 添加でも同様に、IL-1 β 分泌は EPA 添加によって $59.9 \pm 10.7\%$ 、DHA 添加によって $70.7 \pm 9.6\%$ 抑制された。

次にレスベラトロールが NLRP3 インフラマソームを抑制するかを検証した。レスベラトロール添加によって LPS 前処置ニゲリシン添加によって上昇した IL-1 β 分泌は $45.0 \pm 8.0\%$ 抑制された。同様に IL-18 は $38.5 \pm 10.9\%$ 、Caspase-1 は $33.2 \pm 1.2\%$ 抑制された。LPS 前処置 ATP 添加で NLRP3 インフラマソームを刺激しても、IL-1 β 、IL-18、Caspase-1 分泌はそれぞれ $76.2 \pm 5.9\%$ 、 $66.0 \pm 9.9\%$ 、 $34.5 \pm 9.4\%$ 抑制された。さらに LPS 前処置尿酸ナトリウム添加で NLRP3 インフラマソームを刺激しても IL-1 β の上昇は $39.1 \pm 8.9\%$ 抑制された。

同様に Swan71 に対してもレスベラトロールによる NLRP3 インフラマソームの抑制を検証した。レスベラトロールにより、ニゲリシンおよび尿酸ナトリウムの刺激によって上昇した IL-1 β の分泌は $60.8 \pm 16.9\%$ 抑制された。Caspase-1 の分泌については有意な減少は認められなかった。

(考察)

本研究では、脱落膜マクロファージ NLRP3 インフラマソームは PIH の血中で上昇している ATP ならびに尿酸により刺激され、炎症性サイトカインである IL-1 ファミリーを分泌し、これが母体循環に放出されることで、本症の増悪、増長に関与している可能性が示唆された。次に本研究では脱落膜マクロファージの NLRP3 インフラマソームの活性化がオメガ3 脂肪酸である EPA ならびに DHA によって抑制されることを示した。さらに本研究では脱落膜マクロファージならびに絨毛細胞の NLRP3 インフラマソームの活性化がレスベラトロールによっても抑制されることを示した。

本研究の問題点と今後の課題を以下に述べる。今回は NLRP3 インフラマソームの刺激系で陽性コントロールとなる LPS とニゲリシンの刺激にて IL-1 β 分泌をアウトカムとして評価しているだけで、実際に NLRP3 を介しているかどうかの傍証として NLRP3 や ASC の抑制系の実験を、今後の課題としたい。またオメガ3 脂肪酸の効果についても今回の研究では、実際に胎盤で効能を発揮しているのが、オメガ3 脂肪酸であるか、オメガ3 脂肪酸の代謝産物であるか不明である。今回提示できなかったが、EPA の活性代謝産物である 18-HEPE でも LPS 及び ATP の刺激による炎症の抑制効果が確認されている。他の代謝産物についても NLRP3 の抑制系の実験から傍証を得る必要があると考えている。Caspase-1 については、脱落膜マクロファージではオメガ3 脂肪酸、レスベラトロールの炎症抑制傾向は認められたが、絨毛細胞では NLRP3 による上昇そのものを再現することができなかった。本論文では提示できなかったが追加実験として試みた Caspase-1 のウエスタンブロッティングでも期待された抑制効果を示す結果は得られず、今後の課題としたい。

周産期医学の分野の中でも、PIH は母児共に重篤な合併症の原因になるにもかかわらず本症の予防・治療法に関する研究解明は乏しい。PIH の病因・増悪因子として胎盤から母体循環に分泌される炎症性サイトカインが関与することが判明してきているが、本研究ではこの系に NLRP3 インフラマソームという炎症制御機構が関与していることを明らかにし、さらにオメガ3 脂肪酸やレスベラ

トロールといった妊娠中にも投与しやすい食品由来化合物がその制御に関わる可能性を示した。今後もこれらを含めた **PIH** の責任因子のさらなる検索と、**NLRP3** をはじめとする炎症制御による予防治療を目指して研究を継続したい。