

よびストレス要因と不育症リスク. 第 67 回日本
公衆衛生学会総会, 福岡, 平成 20 年 11 月 5-7
日.

- 4) 佐田文宏, 江藤亜紀子, 中尾裕之, 今井博久,
水上尚典, 岸 玲子, 山田秀人. 不育症に係わ
る遺伝要因、環境要因及びそれらの交互作用.
第 21 回日本疫学会学術総会, 札幌, 平成 23 年
1 月 21, 22 日.

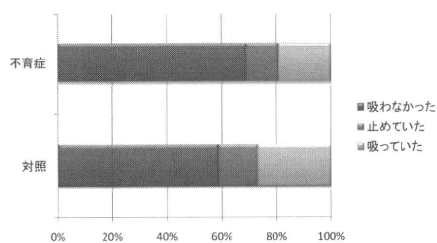
H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表1 代謝酵素、サイトカイン等の 20 一塩基多型(SNPs)

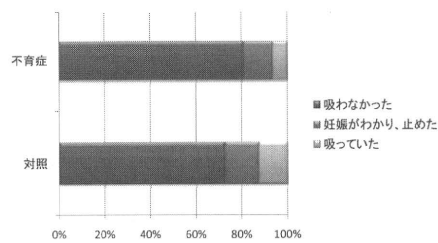
遺伝子	シンボル	rs 番号	染色体	座位
methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MTHFR</i>	rs1801133	1	Ala222Val
methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MTHFR</i>	rs1801131	1	Glu429Ala
5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	<i>MTR</i>	rs1805087	1	Asp919Gly
interleukin 1, alpha	<i>IL1A</i>	rs1800587	2	-889C>T
interleukin 1, alpha	<i>IL1A</i>	rs17561	2	Ala114Ser
interleukin 1, beta	<i>IL1B</i>	rs16944	2	-511C>T
interleukin 1, beta	<i>IL1B</i>	rs1143627	2	-31C>T
peroxisome proliferator-activated receptor gamma	<i>PPARG</i>	rs1801282	3	Pro12Ala
alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	<i>ADH1B</i>	rs1229984	4	His48Arg
interleukin 2	<i>IL2</i>	rs2069762	4	-384 T>G
5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	<i>MTRR</i>	rs10380	5	His595Try
interleukin 6 (interferon, beta 2)	<i>IL6</i>	rs1800796	7	-634C>G
beta-3-adrenergic receptor	<i>ADRB3</i>	rs4994	8	Trp64Arg
pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	<i>PAPPA</i>	rs7020782	9	Ser1224Tyr
glutathione S-transferase pi 1	<i>GSTP1</i>	rs1695	11	Ile105Val
aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	<i>ALDH2</i>	rs671	12	Glu504Lys
cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	<i>CYP1A1</i>	rs4646903	15	3698T>C
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	<i>NQO1</i>	rs1800566	16	Pro187Ser
CoA synthase	<i>COASY</i>	rs615942	17	Ser55Tyr
catechol-O-methyltransferase	<i>COMT</i>	rs4680	22	Val158Met

図1 妊婦の生活習慣、ストレス要因および居住環境

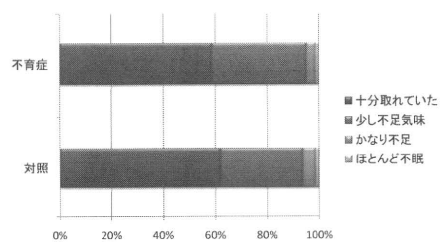
(a) 喫煙習慣(妊娠前)



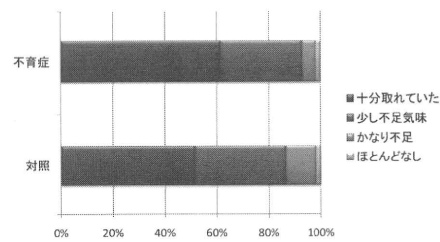
(b) 喫煙習慣(妊娠期間中)



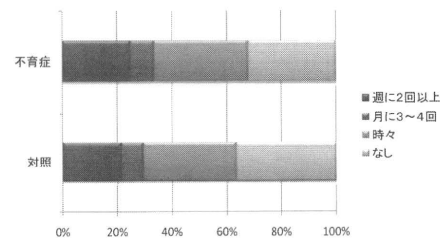
(c) 睡眠



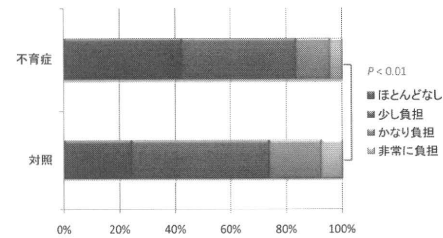
(d) 休養



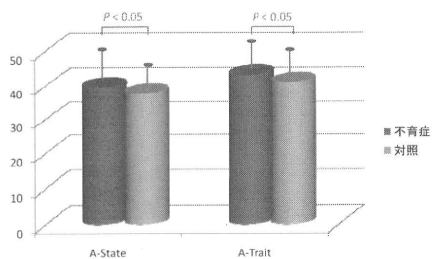
(e) 運動



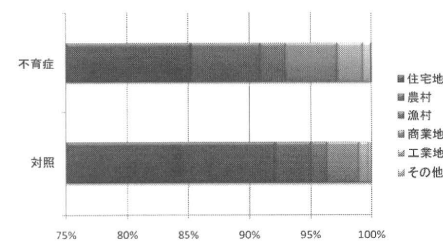
(f) 身体負荷



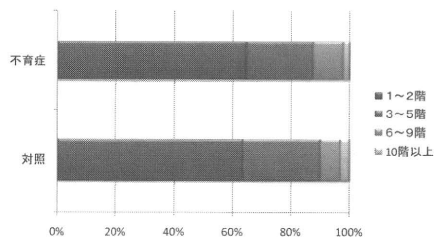
(g) 状態-特性不安検査(STAI)



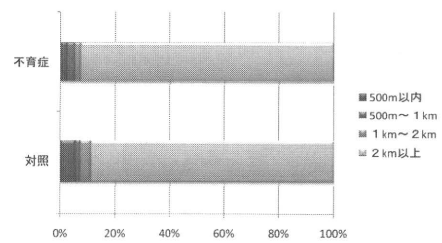
(h) 現在の居住地



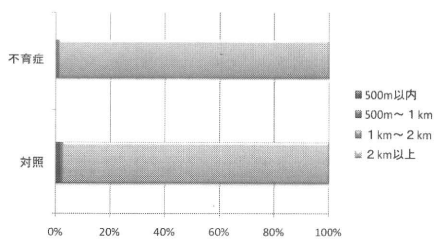
(i) 住宅の階数



(j) 廃棄物(ごみ)処理施設からの距離



(k) 製紙工場からの距離



(l) 幹線道路(片道2車線以上)からの距離

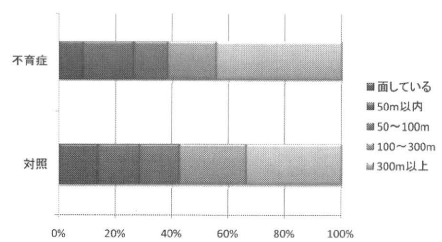
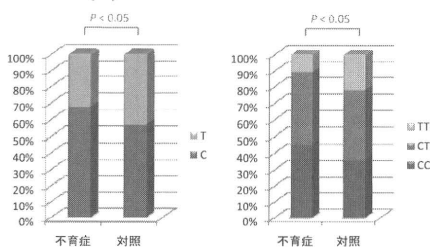
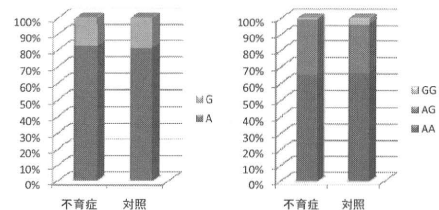


図2 代謝酵素、サイトカイン等の20SNPsのアレル・遺伝子型頻度

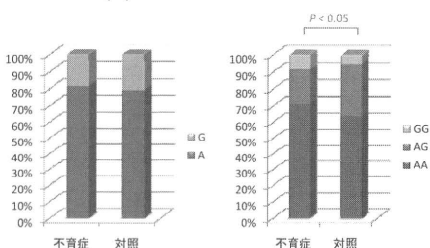
(a) MTHFR rs1801133



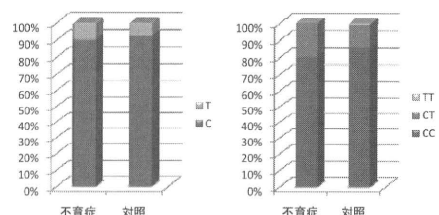
(b) MTHFR rs1801131



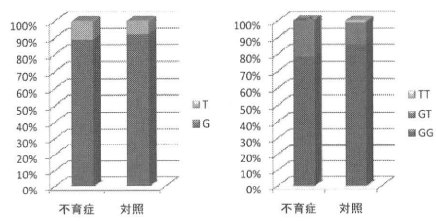
(c) MTR rs1805087



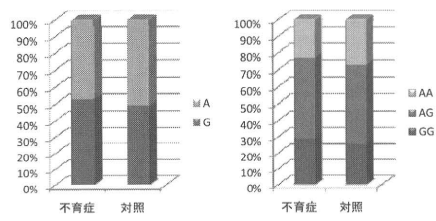
(d) IL1A rs1800587



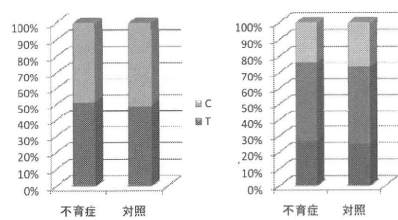
(e) *IL1A* rs17561



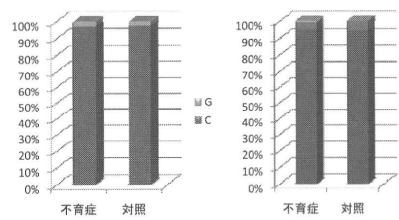
(f) *IL1B* rs16944



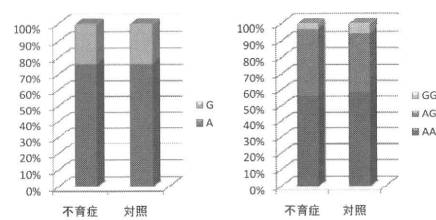
(g) *IL1B* rs1143627



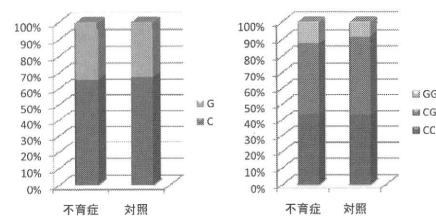
(h) *PPARG* rs1801282



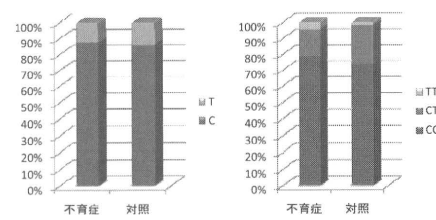
(i) *ADH1B* rs1229984



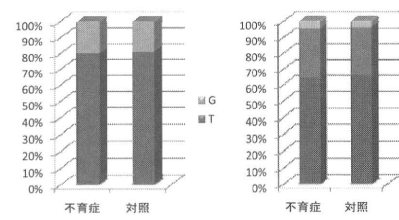
(j) *IL2* rs2069762



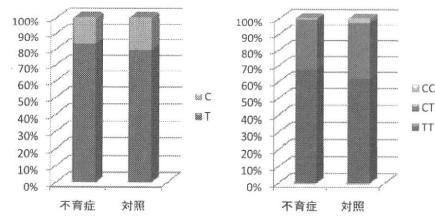
(k) *MTRR* rs10380



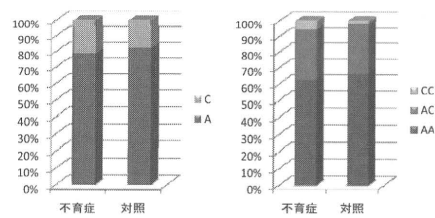
(l) *IL6* rs1800796



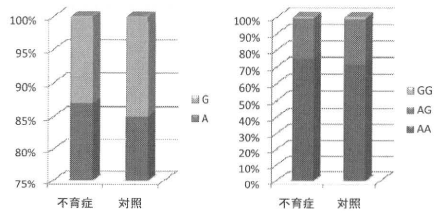
(m) *ADRB3* rs4994



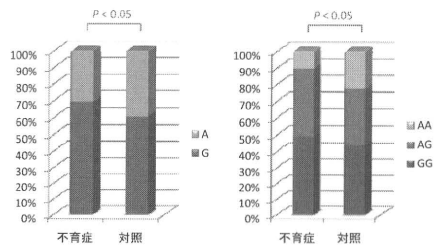
(n) *PAPPA* rs7020782



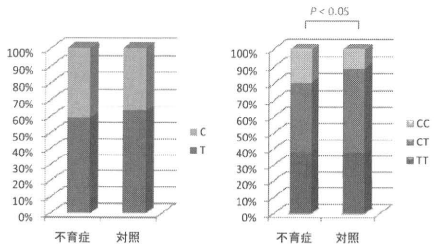
(o) *GSTP1* rs1695



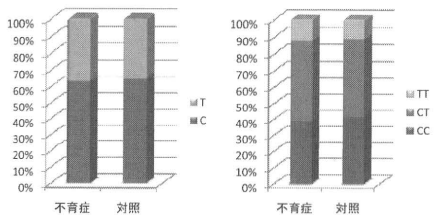
(p) *ALDH2* rs671



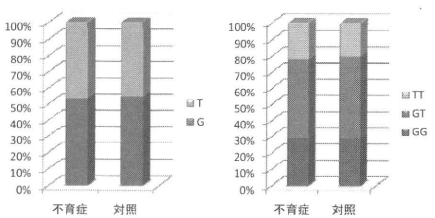
(q) *CYP1A1* rs4646903



(r) *NQO1* rs1800566



(s) *COASY* rs615942



(t) *COMT* rs4680

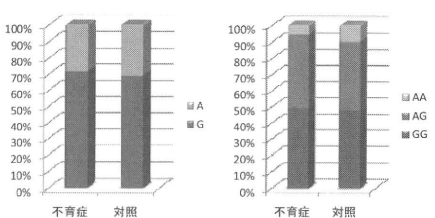
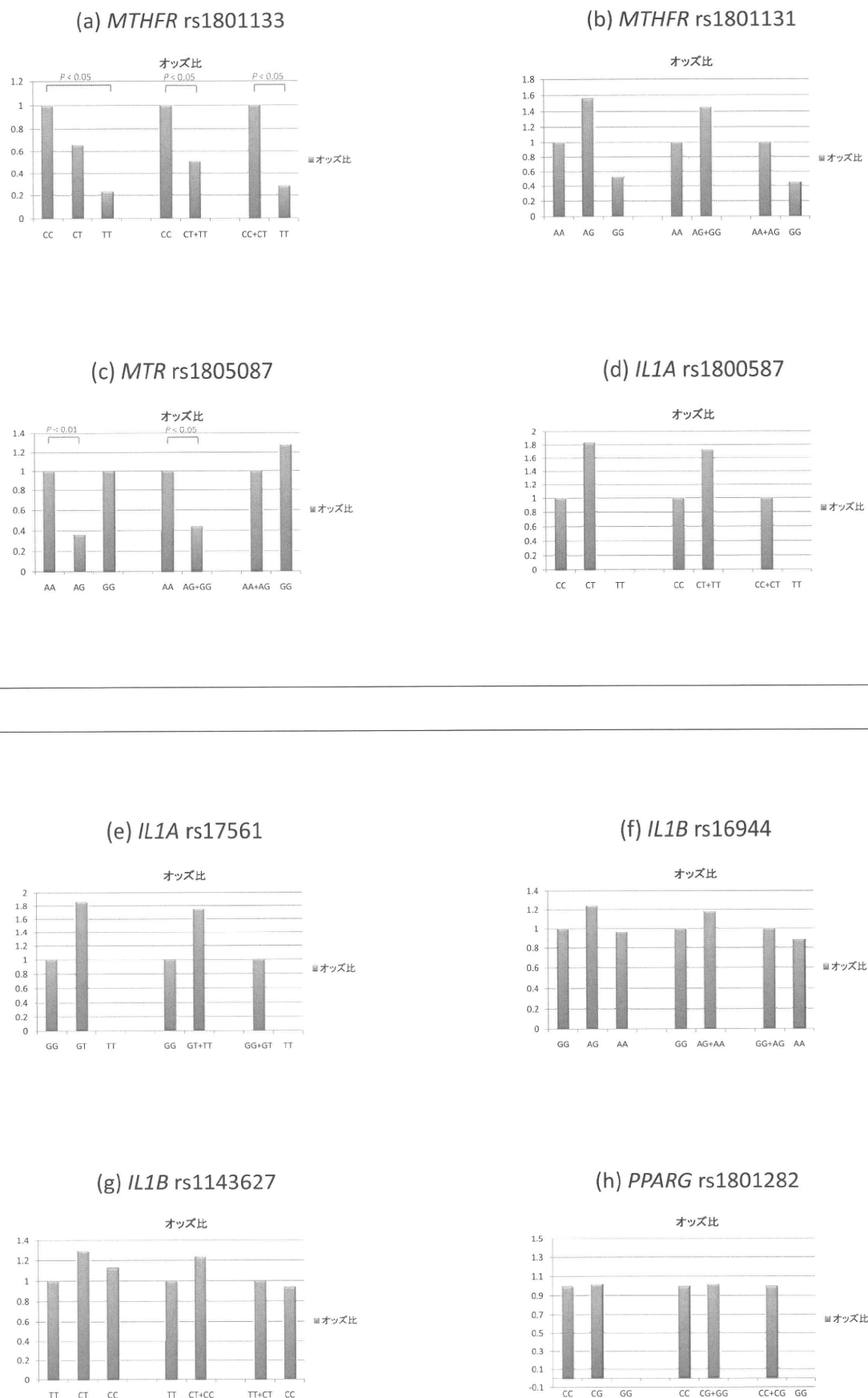
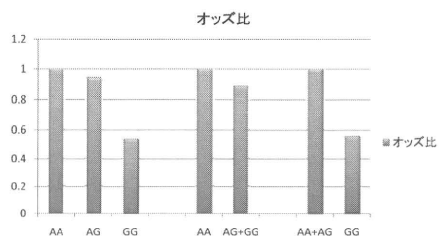


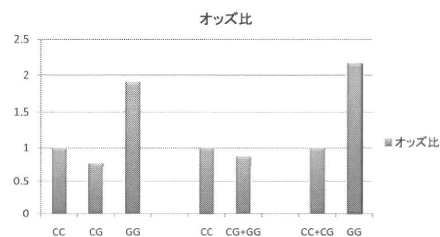
図3 代謝酵素、サイトカイン等の20 SNPsと不育症リスクとの関連



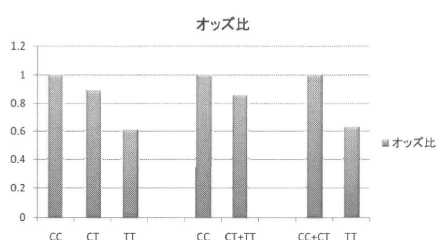
(i) *ADH1B* rs1229984



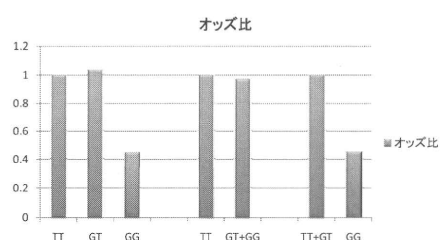
(j) *IL2* rs2069762



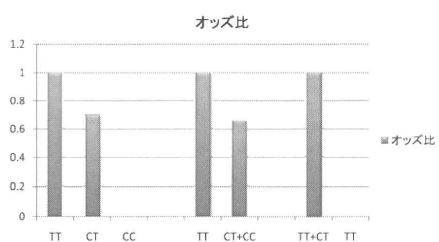
(k) *MTRR* rs10380



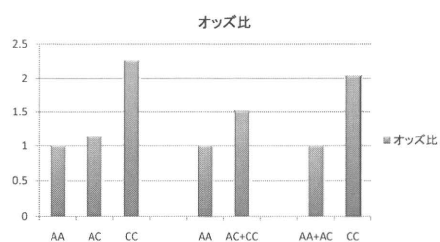
(l) *IL6* rs1800796



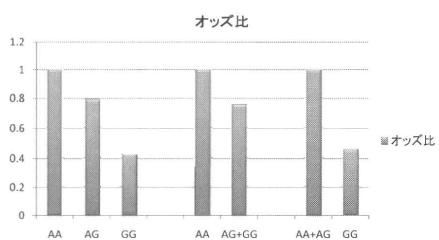
(m) *ADRB3* rs4994



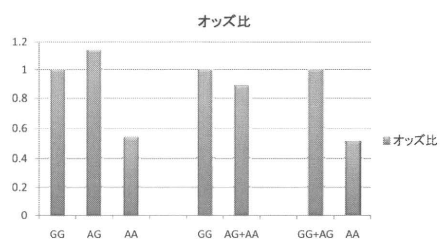
(n) *PAPPA* rs7020782



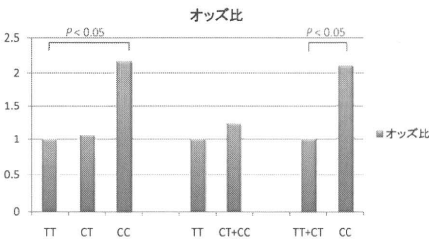
(o) *GSTP1* rs1695



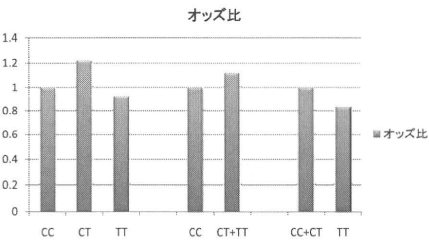
(p) *ALDH2* rs671



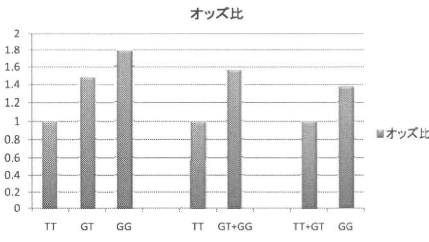
(q) *CYP1A1* rs4646903



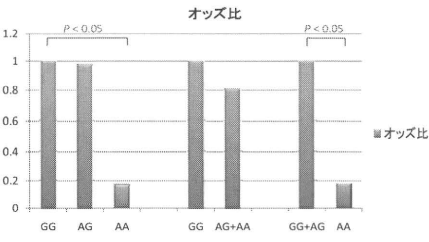
(r) *NQO1* rs1800566



(s) *COASY* rs615942



(t) *COMT* rs4680



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sata F, Toya S, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamazaki A, Minakami H, Kishi R	Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birthweight in a Japanese population.	Mol Hum Reprod	15(2)	121-30	2009
天野真理子, 森實真由美, 山田秀人	不育と遺伝因子	産婦人科の実際	59(12)	1969-83	2010
佐田文宏, 山田秀人	早産と遺伝因子	産婦人科の実際	59(12)	1991-2000	2010

総合分担研究報告 31

分担課題:不育症患者の血栓性素因の遺伝学的解析、流産とミトコンドリア

研究分担者 康 東天 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野教授

研究要旨

不育症例でプロテイン S、プロテイン C、第 XII 因子の遺伝子解析を行い、プロテイン C で未報告の遺伝子変異を見出した。今後遺伝子解析症例を増やして行き、遺伝子異常の頻度を明らかにする。

p32 のノックアウトマウスは胎生 9.5 日で著明な成長遅延を示し、10.5 日では細胞増殖はほとんど観察されなかった。p32 ノックアウトマウスより樹立した MEF 細胞の解析から、p32 はミトコンドリア内でのミトコンドリア DNA でコードされる蛋白質翻訳に必須であることを見出し、“ミトコンドリア内での蛋白質翻訳に特異的な RNA シャペロン”という、今までに報告の無い新しい機能を持つ蛋白質である可能性が示唆された。p32 ノックアウトマウスが胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするための新しいマウスモデルになる可能性を示している。

A. 研究目的

本邦における不育症の実態は不明であり、かつ不育症例に対するスクリーニング法や治療法の確立には至っていない。これらを明らかにするため、不育症のリスク因子の検索と評価を行う必要がある。リスク因子の 1 つとして、血液凝固異常の関与が強く示唆されている。本研究では、不育症における血液凝固異常の関与のなかでも、プロテイン S、プロテイン C、凝固因子 XII の(1)遺伝子変異と(2)活性の観点から明らかにすることで、EBM に基づいた不育症の診断、検査、および治療に関する指針の確立に寄与することを目的としている。また、胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするためのマウスモデルの作製とその機能解析を行う。

B. 研究方法

(1) 血栓症関連遺伝子変異解析

XII 因子、Protein C、Protein S 活性検査は一次スクリーニングとして各施設で全て行ない、低下症例について Protein C、Protein S は全エクソンの遺伝子配列決定を行ない、XII 因子については活性に大きな影響を与える第 46 塩基の多型を調べる。

(2) p32 ノックアウトマウスの作製と解析

p32 蛋白質は従来 RNA スプライシング因子の 1 つとして、核で作用すると考えられていた因子である

が、分担研究者の康のグループがそのほとんどがミトコンドリアマトリックスに存在し、酸化的リン酸化による ATP 合成に重要な役割を果たしていると報告したものである。p32 のノックアウトマウスは胎児発育におけるミトコンドリア機能不全の良いモデルになると考えられる。

p32 の全身ノックアウトマウスを作製し、その胎児からマウス胎児線維芽細胞(MEF)細胞を樹立した。その細胞の増殖能、ミトコンドリア電子伝達系活性、ミトコンドリア DNA、mRNA ならびに翻訳能を測定する。

(倫理面への配慮)

研究方法、試料提供協力者に対する説明同意等、九州大学を含む各大学倫理委員会で承認された計画のもとで行われていた。

C. 研究結果

(1) 血栓症関連遺伝子変異解析

4 例の解析を行い、プロテイン C で未報告の遺伝子変異を見出した。

(2) プロテイン S 活性低下と不育症との関連

不育症症例における妊娠中のプロテイン S 活性は対照例に比べ有意に低かった(図1)。一方、血漿 C4BP の濃度に有意差はなかった。今回症例では全症例において、プロテイン S 遺伝子のエクソン部分には異常は認められなかった。

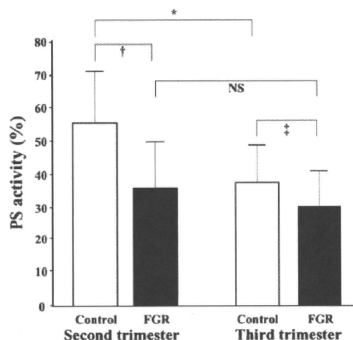


図1 不育症例と対象例におけるプロテイン S 活性

(2) p32 ノックアウトマウスの作製と解析

p32 ノックアウトマウスは胎生 10.5 日で致死であった(図 2)。そこで胎児より MEF 細胞を樹立した。樹立した細胞の細胞増殖は野生型に比べ、きわめて不良であった。細胞増殖は p32 cDNA の導入により回復したことから、p32 遺伝子の欠損が原因と考えられる(図 3)。

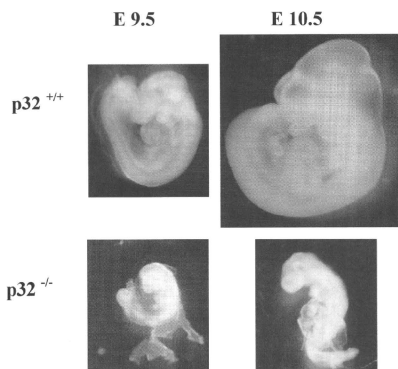


図 2 p32 ノックアウトマウス胎児

細胞増殖能の低下がミトコンドリア電子伝達系機能の低下によるかを調べるため、ミトコンドリア電子伝達系の各複合体の活性を測定したところ複合体 I, III, IV の活性低下が認められた。その原因はミトコンドリア内翻訳の阻害であった(図 4)。

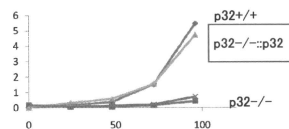


図 3 p32 ノックアウト細胞の増殖能の低下

D. 考察

妊娠中のプロテイン S 活性低下は凝固抑制系の抑制を通して出産時の出血過剰を防止するという意味で合目的である。一方で妊娠中の胎盤での静脈血栓症発生のリスクを増大させると言う側面を持っており、過度の活性低下は不育症のリスクとなることが予測される。本期間の研究結果(図 1)は、妊娠中における凝固抑制系の微妙な制御が正常な妊娠の進行に重要であることを示している。たとえばプロテイン S 遺伝子に変異がなくとも、妊娠中の獲得性プロテイン S 活性低下の変動の経過観察も重要になると思われる。

不育症の血液凝固系因子の遺伝子検査は 4 例しか実施しなかったが、今後も遺伝子検査症例を増やしていくことで、プロテイン S、プロテイン C、第 XII 因子の遺伝子異常の不育症での役割がより明らかになっていくであろう。

p32 のノックアウトマウスから樹立した MEF 細胞ではミトコンドリア DNA にコードされた蛋白質を含む複合体のみで、活性低下が見られた。ミトコンドリア DNA 量やミトコンドリア DNA 由来の mRNA 量に変化が無いこと、ミトコンドリア内での蛋白質翻訳が特異的に阻害されることから、ミトコンドリア RNA への結合が認められることから、ミトコンドリア RNA シャペロンであることが示唆される。これまで、ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的な RNA シャペロンの存在は報告されておらず、ミトコンドリア機能異常における新しい疾患概念の提唱につながる可能性があると期待している。今後ミトコンドリア内翻訳に特異的なシャペロンであることをさらに明確にするために、MEF 細胞を使い、ミトコンドリアでの翻訳レベル、ミトコンドリア DNA コード蛋白質の半減期、電子伝達系複合体の高次構造状態を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

今後さらに不育症例でプロテイン S、プロテイン C、第 XII 因子の遺伝子解析を増やして行き、遺伝子異常の頻度を明らかにする。

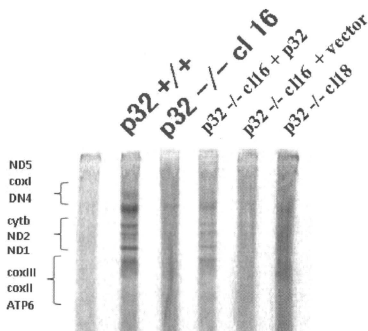


図 4 ミトコンドリア内蛋白質翻訳

p32 のノックアウトマウスより樹立した MEF 細胞の解析から、p32 が“ミトコンドリア内翻訳に特異的なシャペロン”という、今までに報告の無い新しい機能を持つ蛋白質である可能性が示唆された。p32 ノックアウトマウスが胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするための新しいマウスモデルになる可能性を示している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Abe, Y., Kuma, H., Kang, D., Hamasaki, N. and Hirai, T. (2010) Structure of the membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography. *J Mol Biol*, 397, 179–189.
- 2) Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N. and Mitsuoka, K. (2010) Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J Struct Biol*, 169, 406–412.
- 3) Uchiyama, T., Ohgaki, K., Yagi, M., Aoki, Y., Sakai, A., Matsumoto, S. and Kang, D. (2010) ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation. *Nucleic Acids Res*, 38, 5554–5568.

- 4) Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Harada, Y., Kadowaki, M., Shimono, N. and Kang, D. (2010) Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 387–391.
- 5) Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Eriguchi, Y., Nagasaki, Y., Shimono, N. and Kang, D. (2010) Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* serogroup O25 strains, and associated virulence factors. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 444–450.
- 6) Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., Kang, D. and Hamasaki, N. (2010) Mutation of His 834 in human anion exchanger 1 affects substrate binding. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 903–908.
- 7) Sekiguchi, K., Akiyoshi, K., Okazaki, N., Yamada, H., Suzuki, M., Maeda, T., Suenobu, S., Izumi, T. and Kang, D. (2010) PLEDs in an infant with congenital protein C deficiency: a case report. *Clin Neurophysiol*, 121, 800–801.
- 8) Schumann, G., Canalias, F., Joergensen, P.J., Kang, D., Lessinger, J.M. and Klauke, R. (2010) IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice. *Clin Chem Lab Med*, 48, 615–621.
- 9) Ruhanen, H., Borrie, S., Szabadkai, G., Tyynismaa, H., Jones, A.W., Kang, D., Taanman, J.W. and Yasukawa, T. (2010) Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 931–939.
- 10) Sumitani, M., Kasashima, K., Ohta, E., Kang, D. and Endo, H. (2009) Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids. *J Biochem*, 146, 725–732.
- 11) Pohjoismaki, J.L., Goffart, S., Tyynismaa, H., Willcox, S., Ide, T., Kang, D., Suomalainen, A., Karhunen, P.J., Griffith, J.D., Holt, I.J. et al. (2009) Human heart mitochondrial DNA is

organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks. *J Biol Chem*, 284, 21446-21457.

- 12) Ono, M., Aoki, Y., Masumoto, M., Hotta, T., Uchida, Y., Kayamori, Y. and Kang, D. (2009) High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method. *Clin. Chim. Acta*, 407, 75-76.
- 13) Ishimura, M., Saito, M., Ohga, S., Hoshina, T., Baba, H., Urata, M., Kira, R., Takada, H., Kusuvara, K., Kang, D. et al. (2009) Fulminant sepsis/meningitis due to *Haemophilus influenzae* in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy. *Eur J Pediatr*, 168, 673-677.
- 14) Hokazono, E., Osawa, S., Nakano, T., Kawamoto, Y., Oguchi, Y., Hotta, T., Kayamori, Y., Kang, D., Cho, Y., Shiba, K. et al. (2009) Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-III. *Ann Clin Biochem*, 46, 296-301.
- 15) Fukuoh, A., Ohgaki, K., Hatae, H., Kuraoka, I., Aoki, Y., Uchiyama, T., Jacobs, H.T. and Kang, D. (2009) DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase. *Genes Cells*, 14, 1029-1042.
- 16) Urata, M., Koga-Wada, Y., Kayamori, Y. and Kang, D. (2008) Platelet contamination causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells. *Ann Clin Biochem*, 45, 513-514.
- 17) Ohga, S., Ideguchi, H., Kato, J., Ishimura, M., Takada, H., Harada, N., Kawanaka, H., Hattori, Y., Kang, D., Hamasaki, N. et al. (2008) Thromboembolic Complications in Splenectomized Patients with Dominantly Inherited beta-Thalassemia. *Acta Haematol*, 120, 31-35.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Urata, M., Koga-Wada, Y., Kayamori, Y. and <u>Kang, D.</u>	Platelet contamination causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells.	Ann Clin Biochem	45	513-514	2008
Ohga, S., Ideguchi, H., Kato, J., Ishimura, M., Takada, H., Harada, N., Kawanaka, H., Hattori, Y., <u>Kang, D.</u> , Hamasaki, N. et al.	Thromboembolic Complications in Splenectomized Patients with Dominantly Inherited beta-Thalassemia.	Acta Haematol	120	31-35	2008
Sumitani, M., Kasashima, K., Ohta, E., <u>Kang, D.</u> and Endo, H.	Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids.	J Biochem	146	725-732	2009
Pohjoismaki, J.L., Goffart, S., Tyynismaa, H., Willcox, S., Ide, T., <u>Kang, D.</u> , Suomalainen, A., Karhunen, P.J., Griffith, J.D., Holt, I.J. et al.	Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks.	J Biol Chem,	284	21446-21457	2009
Ono, M, Aoki, Y., Masumoto, M., Hotta, T., Uchida, Y., Kayamori, Y. and <u>Kang, D.</u>	High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method.	Clin. Chim. Acta	407	75-76	2009
Ishimura, M., Saito, M., Ohga, S., Hoshina, T., Baba, H., Urata, M., Kira, R., Takada, H., Kusuhara, K., <u>Kang, D.</u> et al.	Fulminant sepsis/meningitis due to Haemophilus influenzae in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy.	Eur J Pediatr	168	673-677	2009
Hokazono, E., Osawa, S., Nakano, T., Kawamoto, Y., Oguchi, Y., Hotta, T., Kayamori, Y., <u>Kang, D.</u> , Cho, Y., Shiba, K. et al.	Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-III.	Ann Clin Biochem,	46	296-301	2009

Fukuoh, A., Ohgaki, K., Hatae, H., Kuraoka, I., Aoki, Y., Uchiuni, T., Jacobs, H.T. and <u>Kang, D.</u>	DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase.	Genes Cells	14	1029-1042	2009
Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Abe, Y., Kuma, H., <u>Kang, D.</u> , Hamasaki, N. and Hirai, T	Structure of the membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography.	J Mol Biol	397	179-189	2010
Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., <u>Kang, D.</u> , Namba, K., Hamasaki, N. and Mitsuoka, K.	Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals.	J Struct Biol,	169	406-412	2010
Uchiuni, T., Ohgaki, K., Yagi, M., Aoki, Y., Sakai, A., Matsumoto, S. and <u>Kang, D.</u>	ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation.	Nucleic Acids Res,	38	5554-5568	2010
Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Harada, Y., Kadowaki, M., Shimono, N. and <u>Kang, D.</u>	Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli strains in Asia.	Int J Antimicrob Agents	35	387-391	2010
Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Eriguchi, Y., Nagasaki, Y., Shimono, N. and <u>Kang, D.</u>	Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant Escherichia coli serogroup O25 strains, and associated virulence factors.	Int J Antimicrob Agents	35	444-450	2010
Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., <u>Kang, D.</u> and Hamasaki, N.	Mutation of His 834 in human anion exchanger 1 affects substrate binding.	Biochim Biophys Acta	1798	903-908	2010

Sekiguchi, K., Akiyoshi, K., Okazaki, N., Yamada, H., Suzuki, M., Maeda, T., Suenobu, S., Izumi, T. and Kang, D.	PLEDs in an infant with congenital protein C deficiency: a case report.	Clin Neurophysiol,	121	800-801	2010
Schumann, G., Canalias, F., Joergensen, P.J., Kang, D., Lessinger, J.M. and Klauke, R.	IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice.	Clin Chem Lab Med	48	615-621	2010
Ruhanen, H., Borrie, S., Szabadkai, G., Tynismaa, H., Jones, A.W., Kang, D., Taanman, J.W. and Yasukawa, T.	Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation.	Biochim Biophys Acta	1803	931-939.	2010

総合分担研究報告 32

分担課題: 感染と不育

研究分担者 早川 智 日本大学病態病理学系微生物学分野教授

研究要旨

生殖器および全身の慢性感染症は病原微生物の直接毒性以外に、炎症性サイトカインの産生を介して胎児胎盤を傷害する。我々は、Th1 型のサイトカイン環境が TLR を介した脱落膜 NK 細胞の IFN- γ 産生を修飾すること、従来肺胞上皮と消化管上皮でしか複製しないと考えられていた低毒性の季節性インフルエンザウイルスがヒト絨毛癌細胞で効率よく複製し、細胞をアポトーシスに陥らせることを明らかにした。また、歯周病では菌体成分による直接毒性のほかに NK 細胞の活性化を介することを明らかにした。

一方、寄生虫感染症は疫学的に習慣流産の抑制因子となる可能性がある。我々がフィラリアより精製した rDiAg は典型的の不妊症モデルである CBAXDBA マウスの系で、流産率を 1/4 に抑制した。感染とこれに伴う慢性炎症応答、寄生虫の宿主免疫修飾作用の研究から不育症診療に新たな解析と治療法の展望が開ける可能性がある。

A. 研究目的

妊娠の成立と維持には Thelper(Th)2 優位の免疫環境が重要であり、母体と胎児の接点にある脱落膜リンパ球が Th2 型の応答をすることが大きな役割を果たしている。逆に Th1 型の免疫応答は、母体の細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞を活性化し局所的には、胎児胎盤を傷害して、切迫流産や胎児発育遅延の原因となり全身的には妊娠高血圧症候群や HELLP 症候群といった生命に関わる異常妊娠の原因になる。さらに両者の関係に、もうひとつ重要な因子として細菌やウイルス感染が影響する可能性がある。病原体認識機構の一つである Toll 様受容体(Toll like receptor: TLR)は自然免疫応答の主役で、病原体の特異的な構成成分を認識して自然免疫応答の活性化を誘導する。ヒトでは 11 種類が報告されており、そのうち、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分であるリポポリサッカライド(lipopolysaccharide: LPS)を認識するのが TLR4 である。本研究ではグラム陰性菌の内毒素である LPS が、TLR4 を介して脱落膜リンパ球を活性化する過程に、Th1 誘導サイトカインがどのように作用するのか検討することを目的とした。また、妊婦における急性偶発合併症としてのインフルエンザ感染、慢性感染症としての歯周病に注目し、これらの病原体が胎児胎盤に及ぼす影響を実験的に検討した。最後に、我々が HIV 母子感染の

フィールド調査で、年に数回訪問するラオス山村では他の妊娠合併症に比較し同種免疫異常による不育症が少ないことから、衛生環境によるアレルギー疾患の頻度変化という hygiene hypothesis が習慣流産にも適応できるのではないかと考え、藤田紘一郎博士の研究室で分離された寄生虫由来免疫調節物質 rDiAg の妊娠動物への影響について基礎的検討を行った。

B. 研究方法

① Th1 サイトカインによる粘膜 NK 細胞の活性化に関する研究

グラム陰性菌の内毒素である LPS が TLR4 を介して脱落膜リンパ球を活性化する過程に、Th1 誘導サイトカインがどのように作用するのか ELISA, ELISPOT で検討した。

② 絨毛におけるインフルエンザウイルス複製

絨毛癌細胞株 BeWo、不死化初代絨毛細胞株 HTR8 に季節性インフルエンザ H3N2、新型インフルエンザ H1N1/2009 pdm を感染させ、ウイルス複製を HA 法と蛍光顕微鏡で、アポトーシスを ssDNA ELISA で検討した。

③ 歯周病の胎盤機能に及ぼす影響

歯周病起因菌 *Porphyromonas gingivalis* (PG) 由来 LPS を単独で絨毛癌細胞株 BeWo、あるいはニコチンやカフェインの存在下で不死化初代絨毛細胞株