

## 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- $\gamma$  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 は典型的不育症モデルである 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

HTR8 に添加してその viability を観察した。また、浸潤の程度を matrigel assay で観察した。NK 細胞活性化による絨毛細胞傷害性をテラスキャン法により検討した。

#### ④ 寄生虫由来抗原による免疫学的流産治療の可能性の実験的研究

免疫機序による不育症モデルである DBA/2J オス X CBA/J メスの系にオスモティックポンプで rDiAg メス背部皮下に無菌的に植え込み妊娠 13 日目に屠殺し、生存胎仔数と吸収胎仔数を判定した。血中サイトカインを Bioplex suspension array によって網羅的に解析した。

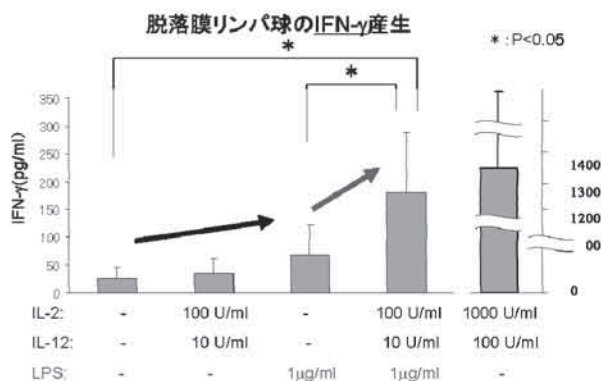
(倫理面への配慮)

臨床検体、実験動物、感染性病原体を用いた実験では各々、倫理委員会、動物実験安全委員会、バイオリスク管理委員会の承認を得た。ヒトの臨床検体を用いる実験では提供者にあらかじめ書面で同意を得た。特に妊娠中絶検体を用いた検討では、説明と同意は本研究班に属さない医師が患者の自由意志を確認した。

### C. 研究結果

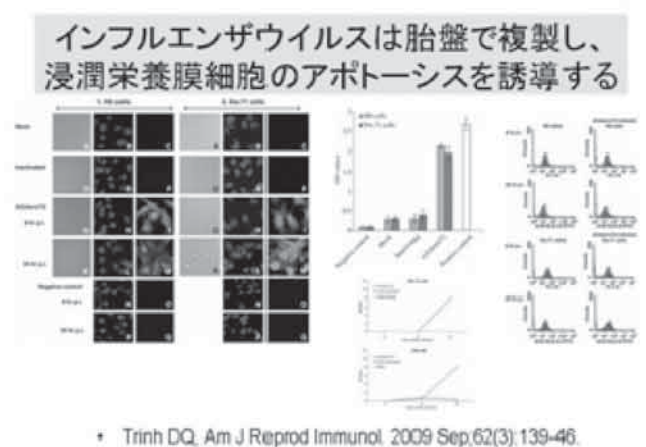
#### ① Th1 サイトカインによる粘膜NK細胞の活性化に関する研究

妊娠の成立と維持には Th2 優位の免疫環境が重要であり、Th1 型の応答は、母体の細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞を活性化し、胎児胎盤を傷害する。さらに両者の関係に、第三の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。我々はグラム陰性菌の内毒素である LPS が Toll 様受容体 (TLR) 4 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を検討した。その結果、IL-2、IL-12 は脱落膜単核細胞の、LPS 感受性を亢進して IFN- $\gamma$  産生を増強するが、TNF $\alpha$  の産生には影響しないことが明らかになった。



#### ② 胎盤絨毛におけるインフルエンザウイルス複製

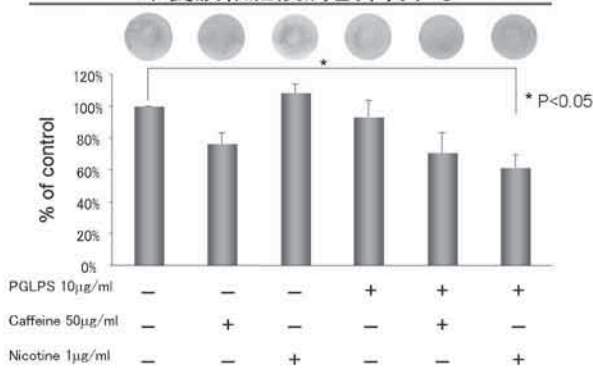
従来肺胞上皮と消化管上皮でしか複製しないと考えられていた低毒性の季節性インフルエンザウイルス (H3N2) がヒト絨毛癌細胞で効率よく複製し、細胞をアポトーシスに陥らせること、細胞の分化の程度によりインフルエンザウイルス感受性が異なることを明らかにした。いわゆる新型インフルエンザ H1N12009 pdm における検討では H3N2 に比較して複製効率が低くアポトーシス誘導活性も低いことが明らかになった。



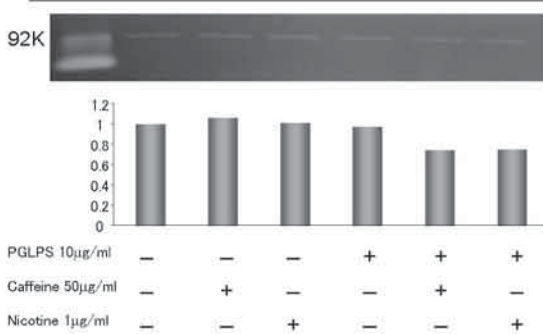
#### ③ 歯周病の胎盤機能に及ぼす影響

母体のコントロール不良の歯周病は、早産や胎児発育遅延 (IUGR) による低出生体重の原因となると考えられている。また近年、歯周病は慢性尿路感染や細菌性膣症とともに妊娠高血圧症候群の重要なリスク因子としても注目されている。その機序として、歯周病起因菌 *Porphyromonas gingivalis* (PG) などによる胎盤の直接的傷害のほか、母体免疫系の活性化による寛容の破綻が想定されている。我々は PG やによる直接の絨毛細胞傷害はみられないが、これが NK 細胞を活性化し、絨毛癌細胞株 BeWo に対する foaming 誘導による細胞傷害の原因になること、PG-LPS は suboptimal のニコチンやカフェインの存在下で不死化絨毛細胞株の浸潤を抑制することを明らかにした。

PGLPSはニコチンの存在下で  
栄養膜細胞浸潤を抑制する



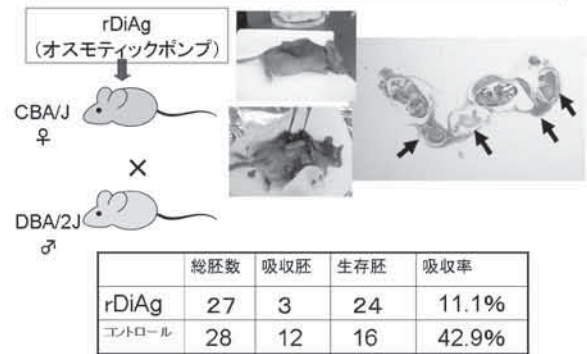
PGLPSはニコチン、カフェインの存在下で  
MMP9の発現を抑制する



④ 寄生虫由来抗原による免疫学的流産治療の  
可能性の実験的研究

途上国では寄生虫疾患が多い一方、同種免疫異常による不育症の患者は稀である。不育症においてアレルギー疾患同様に Hygiene hypothesis が成立する可能性を検討するため、免疫機序による不育症モデルである DBA/2J オス X CBA/J メスの系にオスモティックポンプで rDiAg メス背部皮下に無菌的に植え込み妊娠 13 日目に屠殺し、生存胎仔数と吸収胎仔数を判定した。その結果非投与群の DBA/2J オス X CBA/J メスの胎児吸収は、42.9%であったが、rDiAg 投与により 11.1%まで減少した。血中サイトカインの解析では IL-4, IL-23, TNF- $\alpha$  が有意に減少し、IL-17 は減少傾向を見た。

寄生虫抗原rDiAgによる不育症治療



D. 考察

胎児胎盤が妊婦にとって、半非自己であることは間違いない。従って、これを許容するためには寛容が成立する必要がある。しかし、妊婦を免疫不全患者と同一視することは完全な誤りであり、胎児胎盤に特異的な免疫寛容が成立していると考えらるべきである。感染症に対する免疫応答が生じることは非妊婦者も妊娠している患者も同様であるが、その質が変化している可能性がある。我々の研究より、Th1 型のサイトカイン環境は本来無害である常在菌に対する粘膜免疫応答を活性化し、胎児胎盤を傷害する可能性が示唆された。次に絨毛癌細胞はインフルエンザウイルスに感受性があることから、妊娠中にインフルエンザウイルスに感染すると、胎盤が直接傷害され、低酸素状態や代謝障害によって胎児の神経学的発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。最後に妊娠は Th2 優位の現象であることは大筋で正しいとしても、Th1/Th2 二分法のスキームのみでは説明できない現象も少なくない。最近、IL-17 を産生する Th17 細胞が独自の細胞集団であり、様々な自己免疫疾患のみならず、移植臓器や胎児胎盤の拒絶にも関与する。Th17 は IL-23 によって誘導されることから、寄生虫抗原の主要なターゲットは IL-23 と考えられる。流早産の原因の一つとしての感染症に注目している研究者は内外ともに少なくないが、感染症(寄生虫)と宿主との共進化を考え、寄生虫由来の物質でこれを治療しようという逆転的な発想は申請者独自のものである。

## E. 結論

生命にとって自己（種ではなく、あくまで自己と子孫親類縁者）の遺伝子の複製と保存が生き残るための至上命題であるが、寄生体、特に病原微生物から自己を守る生態防御も生殖と同様の重要性がある。多くの生物は感染防御と生殖が天秤にかかるような状態にあれば、あえて不妊や流早産を選択し、次の生殖機会を待つという適応戦略をとる。胎児もろとも感染症で死んでしまえば自己の遺伝子の複製がなしえないからである。臨床的には、妊娠による免疫状態の変調が時に胎児胎盤を傷害する諸刃の剣となりえるという事実を理解し、積極的な抗菌薬やワクチン投与を進めてゆく必要があるだろう。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, Hayakawa S, Yamamoto S Influence of advanced age on Mycobacterium bovis BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2010 Oct;17(10):1500-6.
- 2) Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, Hayakawa S. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Interferon (IFN)-gamma production by decidual mononuclear cells (DMNC) is interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent. Am J Reprod Immunol. 2011 Jan;65(1):20-7.
- 3) Trinh QD, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Shibata T, Shimotai Y, Kuroda K, Mizuguchi M, Ushijima H, Mor G, Hayakawa S. H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis. Am J Reprod Immunol. 2009 Sep;62(3):139-46.
- 4) 相澤志保子[小峰](日本大学 医学部病態病理学系微生物学分野), 早川智 【妊娠免疫 Update 子宮内膜局所免疫と妊娠】 Toll-like receptor の胎盤における機能 :医学のあゆみ 233 巻 2 号 Page147-150 2010 【著書】
- 5) 早川 智 産婦人科学領域への関与 清野宏編著 臨床粘膜免疫学 シナジー 2010
- 6) 早川 智 妊婦の感染症 山口 徹他 編 今日の治療指針 vol53 2011 医学書院

### 2. 学会発表

- 1) 根岸正実, 林田志峯, 岡崎隆行, 庄田亜紀子, 西川正能, 大島教子, 早川智, 稲葉憲之 Th1 サイトカインは脱落膜免疫細胞の LPS 感受性を亢進する 第 62 回日本産科婦人科学会 2010 年 4 月 23 日 東京
- 2) 根岸正実, 泉泰之, 大島教子, 稲葉憲之, 早川智 Th1 サイトカインはヒト脱落膜リンパ球の LPS 感受性を亢進する 第 37 回日本臨床免疫学会 2009 年 11 月 14 日 東京
- 3) Shihoko Komine-Aizawa, Yasuyuki Izumi, and Satoshi Hayakawa The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune mediated pregnancy loss 14th International Congress of Immunology. Workshop 26 Aug 2010 Kobe

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
早川 智	産婦人科学領域への関与	清野 宏編	臨床粘膜免疫学	シナジー	東京	2010	
早川 智	妊婦の感染症	山口 徹他編	今日の治療指針 vol53	医学書院	東京	2011	

### 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
Trinh QD, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Shibata T, Shimotai Y, Kuroda K, Mizuguchi M, Ushijima H, Mor G, Hayakawa S.	H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis.	Am J Reprod Immunol.	62(3)	139-46	2009
Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, Hayakawa S, Yamamoto S	Influence of advanced age on Mycobacterium bovis BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis.	Clin Vaccine Immunol.	17(10)	1500-6	2010
相澤志保子[小峰], 早川智	【妊娠免疫Update 子宮内 膜局所免疫と妊娠】 Toll-like receptorの胎盤に おける機能	医学のあゆみ	233(2)	147-150	2010
Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, Hayakawa S.	Lipopolysaccharide (LPS)-induced Interferon (IFN)-gamma production by decidual mononuclear cells (DMNC) is interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent.	Am J Reprod Immunol.	65(1)	20-7	2011