

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

正常妊娠では局所あるいは全身の免疫応答が Th2 にシフトする。Th1 サイトカインは直接に、あるいは免疫細胞を介して間接的に胎児胎盤を傷害するが、着床や絨毛浸潤の調節など生理的な意義もある。本研究では、Th1 優位の免疫環境がグラム陰性桿菌細胞壁の主要成分である LPS に対する局所の自然免疫応答にどのような影響を及ぼすかを検討した

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、切迫流早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。

B. 研究方法

妊娠初期に社会経済的理由にて人工妊娠中絶を受けた妊婦より、脱落膜組織を採取した。脱落

膜組織を細切し、メッシュを通した後、比重遠心法にて脱落膜単核球(Decidual mononuclear cells : DMNC)を分離した。DMNC に IL-2、IL-12、および LPS を添加して 48 時間培養し、その上清中の IFN- γ および TNF- α を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。また、フローサイトメトリーで T 細胞マーカーの CD3、粘膜型 NK 細胞マーカー CD56、TLR4、IL-2 レセプターである CD25、IL-12 レセプターである CD212 の発現、および培養後の TLR4、CD25、CD212 の発現を解析した。DMNC における TLR4 の発現を RNA レベルで確認するために reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。測定値は平均値±標準偏差で示した。各データの解析は Mann Whitney 検定にて行い、危険率 5% で有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

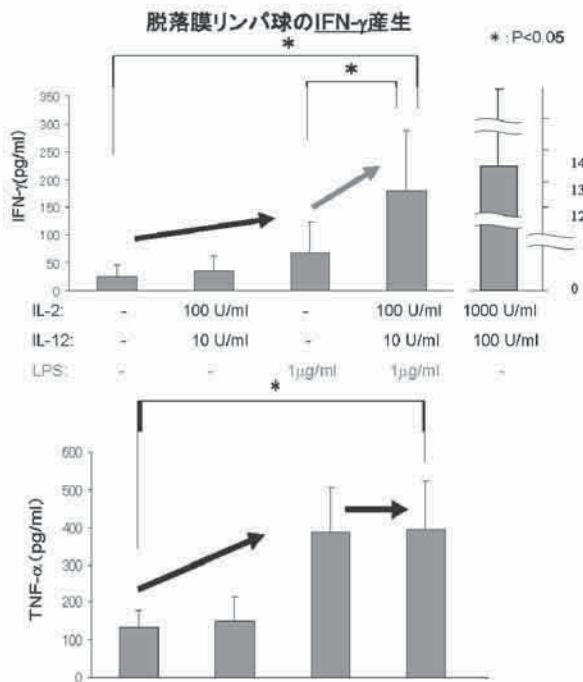
すべての実験は獨協医科大学および日本大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った。事前に本人・パートナーより文書による承諾を得た。検体を採取する医師と、研究者は別の組織に所属し、研究目的で妊娠中絶の適応を広げることがないように予め固い意志で中絶を希望する患者のみを対象とした。

C. 研究結果

1. 脱落膜リンパ球は 非刺激時には、IFN- γ 、TNF- α とも産生を認めなかった。
2. LPS 単独刺激により、IFN- γ 、TNF- α とも

産生が誘導された。

3. IL-2 + IL-12 の存在下では LPS 刺激による IFN- γ 産生は増強された。
4. LPS 刺激による TNF- α 産生は IL-2 + IL-12 による増強を受けなかった。
5. IL-2+ IL-12 は CD56 陽性細胞の CD69 発現を増強したが、TLR4 自体の発現は顕著な変化はなかった。
6. 粘膜型 NK 細胞株でも同様の結果を得た。



D. 考察

IL-2、IL-12 のみでは誘導されない IFN- γ の産生が LPS の存在下で著しく増強したことより、Th1 優位の免疫環境では、LPS に対する感受性が高ま

ることが示唆された。このことは、グラム陰性菌によって引き起こされる尿路感染症や子宮内感染症が、妊娠異常を引き起こすというデータに一致する。また、妊娠維持のために母体、胎児の次に重要な因子が LPS であるとする最近の報告を支持するものである。IL-2、IL-12 が DMNC の LPS 感受性を亢進する機序として、TLR4 シグナルが CD25、CD212 の発現を亢進させ Th1 サイトカインの感受性を亢進する可能性が示唆された。TNF- α の産生が IL-2、IL-12 の存在に影響されないことは、進化の上でその起源が NK 細胞や NKT 細胞特異的な IFN- γ よりも古く別のコントロールを受けている可能性が示唆される。感染に伴う異常妊娠の予防には、それを引き起こす IFN- γ や TNF- α の産生を抑えることよりも、抗菌薬の適正投与により子宮胎盤にまで到達する LPS の量を減らす事が重要であると考えられた。

(一行分あける)

E. 結論

LPS が DMNC の IFN- γ と TNF- α の産生を誘導することを明らかにした。しかし、IFN- γ の産生は IL-2、IL-12 に依存しているが、TNF- α の産生は IL-2、IL-12 の影響を受けないという異なった病態が存在することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Negishi M et al. Lipo polysaccharide (LPS) induced Interferon (IFN)- γ production by decidual mononuclear cells is Interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent. submitted

2. 学会発表

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 11 月 14 日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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
Trinh QD, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Shibata T, Shimotai Y, Kuroda K, Mizuguchi M, Ushijima H, Mor G, <u>Hayakawa S.</u>	H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis.	Am J Reprod Immunol.	62(3)	139-146	2009
Ohto H, Yonemura Y, Takeda J, Inada E, Hanada R, <u>Hayakawa S.</u> Miyano T, Kai K, Iwashi W, Muto K, Asai F	Japanese Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy (JSTMCT). Guidelines for managing conscientious objection to blood transfusion.	Transfus Med Rev.	23(3)	221-228	2009
<u>早川智</u>	女性生殖器における 感染防御機構 オー バービュー	Hormone Frontier in Gynecology	16(4)	295-299	2009
<u>早川智</u> , 木下優子	原因不明の不妊症に 対する漢方療法	産婦人科の 実際	58(11)	1767-1772	2009