

妊娠機能破綻におけるS100A9-NLRP3 インフラマソーム機構の役割

東京農業大学 農学部 動物科学科 動物生殖学研究室 白砂 孔明

要約

【目的】妊娠高血圧腎症(PE)では母体血中で炎症性サイトカイン(IL-1 β)や抗血管新生因子(sEng)が上昇するが、その機序は未解明である。カルシウム結合性タンパクの一種であるS100A9は、種々の炎症性疾患や反復性流産患者の胎盤内で発現が増加し、血管内皮細胞の炎症性サイトカイン分泌や細胞死を誘導することが分かっている。本研究では、S100A9が胎盤で炎症反応を引き起こしてPE病態に関与する仮説を立て検証した。【方法・結果】①PE患者血清中のS100A9濃度は正常妊婦と比較して高く、胎盤組織におけるS100A9 mRNA発現量はPE患者で高かった。②ヒト胎盤組織とSw71(ヒト絨毛細胞株)細胞にS100A9を添加すると、IL-1 β やsEng分泌量が増加した。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)においてS100A9はsEng分泌を促進した。③IL-1 β はNLRP3インフラマソーム(NLRP3・ASC・Caspase-1)というタンパク質複合体の活性化で制御されている。Sw71細胞においてS100A9はインフラマソーム構成因子のmRNA発現には影響を与えなかったが、Caspase-1を活性化することでIL-1 β 分泌を刺激した。NLRP3抑制剤やCaspase-1抑制剤を前処理した場合、S100A9誘導性のIL-1 β およびsEng分泌が軽減された。【結論】S100A9およびS100A9 mRNA発現はPE患者で高発現し、胎盤構成細胞においてNLRP3インフラマソームを介してIL-1 β やsEng産生を促進したことから、S100A9がPE病態に関与している可能性が考えられた。

緒言

妊娠高血圧腎症(Preeclampsia、以下PEと略す)とは、妊婦全体の約3~8%において、妊娠20週以降で発症する妊娠特異的な疾患である[1]。母体側では高血圧、蛋白尿、手足のむくみ、脳出血、流産、胎児側では発育不全や低体重などの症状が引き起こる。しかし、この疾患の唯一の治療ともいえる妊娠の終了は早産になる可能性が高く、早産で生まれた子どもは発達障害や後遺症が残ることがあるため、PEの予防・早期発見が重要とされる。

PEは非感染性の疾患であり、その病態発症には2つのステージが提唱されている。初めに、絨毛膜浸潤の異常により胎盤内が低酸素環境になり、胎盤の不完全な形成が起こる。次に、胎盤から様々な炎症促進性因子(炎症性サイトカインおよび抗血管新生因子など)が分泌され、母体の全身性の炎症を引き起こす。さらに、増加した抗血管新生因子が血管内皮機能障害を引き起こすことで血管抵抗に耐えられずに高血圧の症状を示し、腎糸球体内皮細胞の障害によるろ過機能の低下でタンパク尿の症状を示す。また、この疾患の原因には胎盤の形成不全による胎盤炎症が関係しているとの報告がある。実際に、

PE患者の血中ではinterleukin-1 β (以下IL-1 β と略す)やIL-6などの炎症性サイトカインレベルが正常妊婦よりも高いことが知られており、それらが病態のマーカーになり得ることもわかっている[2]。抗血管新生因子であるsoluble Endoglin(以下sEngと略す)についてもPE患者の血中で正常に比べ高く、sEngを妊娠ラットに投与するとPE様の症状がみられるという報告もある[3]。

CalgranulinB/MRP-14:Myeloid-Related Protein-14(以下S100A9と略す)はカルシウム結合性タンパクの一種で、貪食細胞の細胞質中に多数存在し、特に好中球の細胞質タンパク質の約40%を占めるといわれているが、機能は複雑で未解明な部分が多い[4]。S100A9は加齢に伴って発現レベルが増加し、悪性腫瘍や自己免疫疾患などの非感染性疾患においても発現レベルが高まるという報告がある。さらに、反復性流産患者の脱落膜中で発現レベルが増加するという妊娠系疾患との関連も報告されている[5]。しかし、S100A9がPEに関与しているという報告は未だ無い。

PEの発症原因として胎盤における自然炎症が挙げられており、病原体関連分子パターン(以下

PAMPと略す)および障害関連分子パターン(以下DAMPと略す)などの危険シグナルが認識されることで体内での炎症反応が進行する。この危険シグナルを認識する受容体にNOD-like receptor(以下NLRと略す)が知られており、その中でもNLR family, pyrin domain containing 3(以下NLRP3と略す)は様々な内在性・外来性因子を認識し、痛風や動脈硬化などの原因となることが明らかとされ、注目されている[6]。NLRP3に認識された危険シグナルはNLRP3インフラマソーム機構を介して体内で炎症を亢進する。NLRP3インフラマソームはNLRP3とタンパク分解酵素であるCaspase-1およびそれらを結合するapoptosis-associated speck-like protein containing a CARD(以下ASCと略す)からなるタンパク質複合体である。刺激因子が認識されると、3つのタンパク質が会合しCaspase-1を活性化することでIL-1 β の前駆体であるpro-IL-1 β を切断し、細胞外へIL-1 β を分泌させる[6]。PE患者胎盤においてNLRP3インフラマソーム発現量が増加しているという報告があることから、PE患者におけるIL-1 β 産生がNLRP3インフラマソームの活性化を介している可能性が考えられる[7]。

よって本研究では、S100A9がヒト胎盤において胎盤形成不全や炎症応答の原因になることでPE病態に関与するのではないかと考え、S100A9がヒト胎盤組織、ヒト絨毛細胞株(以下Sw.71と略す)およびヒト臍帯内皮静脈細胞(以下HUVECと略す)における抗血管新生因子や炎症性サイトカイン産生に与える影響を検討した。また、胎盤組織、Sw.71、HUVECにおけるS100A9とNLRP3インフラマソームの関連についても検討を行った。

方法

正常妊婦とPE患者の血清の採取

自治医科大学の臨床研究倫理委員会承認を受けた後、インフォームドコンセントを得て正常妊婦(以下NPと略す)およびPE患者の血液を自治医科大学で採取した。血液を遠心分離し、回収した血清中S100A9およびsEng濃度をELISAで測定した。

胎盤組織およびヒト臍帯静脈内皮細胞の培養と実験条件

胎盤は自治医科大学の臨床研究倫理委員会承認を受けた後、インフォームドコンセントを得て自治

医科大学で帝王切開患者から採取した。NPおよびPE患者の胎盤から分泌されるS100A9およびsEngを調べるために5mm角に切断した組織を37.0°Cで48時間培養し、培養上清および組織片を採取した。また、NPおよびPE患者の臍帯静脈から血管内皮細胞を単離し、培養実験に用いた。

S100A9(Cloud-Clone Corp., Katy, TX)によるIL-1 β およびsEngの分泌とNLRP3インフラマソームへの影響を検証するために、正常胎盤組織片やHUVECを培養した。胎盤組織を1wellにつき1切片で、HUVECを 2×10^5 cell/mlの濃度で24wellプレートに設置した。S100A9 (0.1-1.0 μ g/ml)を添加し、6時間培養した。

NLRP3インフラマソームの重要性を検討するため、NLRP3の阻害剤MCC950(InvivoGen, Carlsbad, CA)およびCaspase-1阻害剤(Merck Millipore, Temecula, CA)を添加し、さらにS100A9 (0.5 μ g/ml)添加して24時間培養した。

胎盤細胞株の培養と実験条件

ヒト妊娠初期栄養膜細胞株であるSw.71はGil Mor教授から入手した[8]。Sw.71細胞を 2×10^5 cell/mlの濃度で24wellプレートに播種した。S100A9によるIL-1 β およびsEngの分泌への影響を検証するために、S100A9(0.1-1.0 μ g/ml)を添加し、24時間培養した。培養上清および細胞溶解溶液はELISAおよびRT-PCRを行うために採取した。

解析

遺伝子発現およびタンパク質発現の解析は本研究室の過去の報告と同様に実施した[9]。

統計解析

データはMean \pm SEMで解析し、2群間の差についてはt検定を用いて比較した。多重比較は一元配置分散分析を用い、続いてボンフェローニ多重比較検定を行った。P < 0.05を統計学的に有意差ありとみなした。

結果

実験1：

NPとPE患者の血清中S100A9およびsEngレベルを比較した。血清中ではNP区に比べてPE患者のS100A9およびsEng濃度が有意に増加した。胎

盤組織中においてもNPに比べてPE患者においてS100A9 mRNA発現レベルが増加したが、Eng mRNA発現量に有意な差は見られなかった。また、胎盤組織培養上清においてはNPに比べてPE患者においてS100A9およびsEng濃度分泌量が増加した。

実験 2 :

正常胎盤組織におけるIL-1 β およびsEng分泌へのS100A9の効果を検証した。S100A9添加によってIL-1 β およびsEng分泌は有意に増加した。

実験 3 :

S100A9誘導性のIL-1 β 分泌もNLRP3インフラマソーム経路が関与するのかを確認するために、Sw.71におけるNLRP3、ASCおよびCaspase-1 mRNA発現量を測定した。S100A9の添加によりCaspase-1 mRNA発現量が増加したが、NLRP3およびASCのmRNA発現量の増加はみられなかった。続いて、S100A9添加によるASCの凝集およびCaspase-1の活性化について検討した。Sw.71において蛍光免疫染色法を用いてASCの凝集体形成を観察した。S100A9の添加によりASCの凝集体が形成されることが観察された。また、Caspase-1の活性化においてはSw.71を用いてFLICA assayを行った。その結果、S100A9の濃度依存的な活性型Caspase-1の発現量が増加した。

S100A9とNLRP3インフラマソームの関連性を検討するために、NLRP3阻害剤処理して1時間後にS100A9を添加し、ASC凝集体形成およびCaspase-1活性化を観察した。その結果、NLRP3インフラマソーム阻害剤添加によりASCの凝集およびCaspase-1活性化が抑制されることが観察された。

実験 4 :

胎盤組織、Sw.71およびHUVECにおけるsEng分泌へのS100A9の効果を検証した。胎盤組織およびSw.71にS100A9を添加すると、S100A9濃度依存的にsEng分泌が増加した。また、NPおよびPE由来のHUVECにおいてもS100A9濃度依存的にsEng分泌が増加し、NP由来のHUVECに比べて、PE患者由来のHUVECでより高いsEng分泌を示した。さらに、NPおよびPE由来のHUVECにNLRP3阻害剤を処理して1時間後、S100A9を添加してsEng分泌量を測定した結果、NPおよびPE由来HUVECのどちらに

においてもNLRP3阻害剤の添加によりsEng分泌量が有意に減少した。

考 察

本研究から、以下のことが分かった。①PE患者における血中および胎盤組織中のS100A9およびsEngレベルはNPに比べて高かった。②S100A9は胎盤組織およびSw.71においてNLRP3インフラマソームを介してIL-1 β 産生を促進した。③S100A9は胎盤組織、Sw.71およびHUVECにおいてNLRP3インフラマソームを介してsEng産生を促進した。

sEngの過剰分泌は血管新生を抑制し、胎盤の血行不全を引き起こすことから、PEの病態に大きな関連がある。本研究においても、胎盤組織、Sw.71およびHUVECでS100A9添加によりsEng分泌量が増加した。さらに、NP由来HUVECに比べ、PE患者由来HUVECでsEng分泌量が上昇しており、S100A9に対する感受性も高かった。この結果から、PE患者ではsEng分泌が活性化されていることに加え、S100A9などの刺激因子による反応性も高く、より病態を悪化させていくことにつながる事が考えられた。NLRP3インフラマソームとsEng産生機構の関連性については、引き続き検討を重ねる必要がある。

今回の成果から、PE患者でS100A9が増加することも明らかとなり、S100A9がPE発症に関連するバイオマーカーとなりうることを示した。今後、NLRP3インフラマソームの抑制等についてさらなる検討を重ねることで、PE治療法の確立に繋げていきたい。

謝 辞

本研究は、2019年度 公益財団法人 神澤医学研究振興財団の研究助成金交付により研究が遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, et al. International Society for the Study of Hypertension in P. Hypertensive Disorders of Pregnancy: ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice. *Hypertension* 2018; 72:24-43.
2. Shirasuna K, Karasawa T, Takahashi M. Role of the NLRP3 Inflammasome in Preeclampsia. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11:80.
3. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12:642-649.
4. Donato R, Cannon BR, Sorci G, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 2013; 13:24-57.
5. Nair RR, Khanna A, Singh K. Role of inflammatory proteins S100A8 and S100A9 in pathophysiology of recurrent early pregnancy loss. *Placenta* 2013; 34:824-827.
6. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 2019; 19:477-489.
7. I CW, Romao-Veiga M, Matias ML, et al. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2017; 123:40-47.
8. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, et al. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1221:80-87.
9. Ozeki A, Tani K, Takahashi H, et al. Preeclamptic patient-derived circulating cell-free DNA activates the production of inflammatory cytokines via toll-like receptor 9 signalling in the human placenta. *J Hypertens* 2019.

Abstract

Pathophysiological changes of preeclampsia (PE) include inflammation and immune cell activation. Indeed, inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β and anti-angiogenic factors (sEng), have been considered to be the main pathological features of PE. S100A9 plays an essential role in the regulation of inflammatory responses and immune response. Therefore, in the present study, we investigated the effects of S100A9 on inflammatory response in human placenta, placental trophoblast cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We observed higher S100A9 mRNA expression levels in preeclamptic placentas compared to healthy placentas. Treatment of S100A9 stimulated the inflammatory cytokines and sEng secretion in a dose-dependent manner. Recent evidence indicates that sterile inflammation is mediated through the NLRP3 inflammasomes, composed of NLRP3, ASC, and caspase-1 and NLRP3 inflammasome regulates IL-1 β secretion. We showed that S100A9 activated caspase-1 in Sw.71 cells. Treatment with NLRP3 or caspase-1 inhibitors significantly suppressed IL-1 β secretion stimulated by S100A9. S100A9 increased sEng secretion in HUVEC. These results demonstrate that S100A9 increased in PE placentas induces the increase IL-1 β and sEng secretion via NLRP3 inflammasomes, suggesting the involvement of S100A9 in pathogenesis of PE.