

子宮平滑筋特異的メカニカルストレス受容体を介した流産・早産保護機構の解明

Elucidation of the protective mechanism of miscarriage and preterm birth via uterine smooth muscle-specific mechanical stress receptor

日本医科大学 微生物学・免疫学 助教 佐々木 文之

要約

胎盤や羊水の細菌感染に起因する絨毛膜羊膜炎は、早産の主たる原因であるが、その詳細な発症機序はまだよくわかっていない。本研究にて我々は、妊娠後IL-18が主に子宮平滑筋より産生されることを証明した。LPS投与によるマウス流産モデルを用いて、流産率が抗IL-18抗体の投与により有意に増加した。また我々は、LPS単独投与と比較して、LPSと抗IL-18抗体の投与により、IL-4産生CD4陽性T細胞が減少することも見出した。さらに、IL-4の腹腔内投与はLPS誘導性流産を抑制した。一方で、子宮平滑筋は機械刺激のみではIL-18産生を誘導しなかった。従ってこれらの結果は、IL-18の誘導に伴うIL-4産生は妊娠の維持において重要な役割を担う。

緒言

世界の全出生児の11%が早産で産まれており、新生児死亡の35%は早産が直接的な死亡原因となっている¹。また、早産の原因は様々であるが約40%は感染に関連していると推定されており、我が国のみならず世界的に大きな問題となっている²。これまで細菌感染に起因する絨毛膜羊膜炎は、早産の主たる原因と考えられてきたが、近年『感染を伴わない早産』が以外にも多い事が知られるようになった。この『感染を伴わない早産』は自然免疫の異常反応（無菌性炎症）により生じると考えられているが、その詳細な発症機序はよくわかっていない。子宮筋層は平滑筋でできており、妊娠時には筋層の太さや長さが増すため強い力学的負荷（メカニカルストレス）を受けている。これにより子宮平滑筋は妊娠や出産のプロセスに重要な様々なメディエーターを放出する重要な役割を担っている^{3,4}。しかし、メカニカルストレス受容機序は依然不明のままである。そこで我々は現在、子宮平滑筋のメカノバイオロジーに着目し、子宮平滑筋特異的に発現している新規メカニカルストレス受容体を同定し、機能的役割の解明を目指している。

近年、メカニカルストレスを直接感知するイオンチャンネルとしてPiezo1やPiezo2が注目されており、

例えば血管平滑筋に発現しているPiezo1は血圧を感知し、血管リモデリングの制御に関わるが明らかとなっているが、子宮平滑筋におけるPiezo群の関与はまだ報告されていない^{5,6}。国内外の研究グループより、これらPiezo群以外にもTRPチャンネル、P2X受容体、一部のGPCRや接着分子など膜タンパク質、さらには細胞骨格やシグナル伝達分子など様々なメカノセンサーが発見されており、血管や心筋細胞、肺、神経、骨などにおいて、これらのメカノセンサーの機能的役割が徐々に解明され始めている⁷。筋肉とメカニカルストレスに関する研究も比較的進められており、これまで多くの研究者がメカノセンサーの同定を試みてきたが未だその全容解明には至っておらず、この現状はメカノバイオロジー分野にとって由々しき事態である。本研究は、世界初となる子宮平滑筋のメカニカルストレス受容機序の報告として位置づけられるとともに、本メカノセンサーを標的とした新たな流産・早産予防療法の開発に向けた創薬研究への発展が期待される。

方法

1. 子宮組織を用いたIL-18のウェスタンブロット解析
妊娠16.5日目の雌マウス（C57BL/6/J）子宮組織より子宮平滑筋、脱落膜、胎盤を単離し、各々の細胞

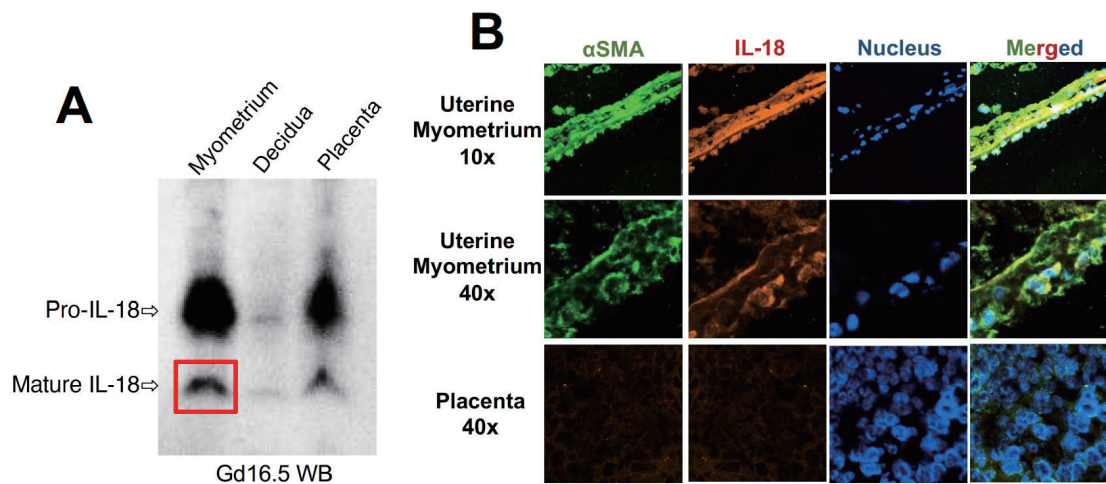


図1. ウェスタンブロット法 (A) および免疫染色法 (B) による子宮組織を用いたIL-18の発現解析

溶解液を調製した。その後SDS-PAGE、さらに抗マウスIL-18抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

2. 子宮組織を用いたIL-18の蛍光免疫染色

妊娠16.5日目の雌マウス子宮組織より子宮平滑筋、胎盤を単離し、PFA固定・スクロース処理後、OCT包埋し、凍結切片を作製した。続いて、PFA固定、Triton-X100透過処理後、ヤギ血清でブロッキング、さらに抗マウス α SMA抗体、または抗マウスIL-18抗体を用いて染色、さらに二次抗体で染色した。洗浄後、核をDAPIで染めた。

3. LPS誘導性流産モデルマウスの作製

雄マウス (C57BL/6/J) と交配後の雌マウスに、妊娠後8.5日目にLPS (2 μ g) を投与し、13.5日目で解剖し、流産判定を行なった。また、抗マウスIL-18抗体 (600 μ g) を妊娠後、2.5、5.5、8.5、11.5日目に腹腔内投与した。IL-4の投与実験として、リコンビナントマウスIL-4 (1 μ g) を妊娠後、8.5~12.5日目間で毎日 (計5回) 腹腔内投与した。

4. 細胞内サイトカイン染色

LPS誘導性流産モデルマウスを作製後、妊娠後9.5日目の子宮組織より平滑筋を採取し、リベラーゼを用いて細胞を単離した。抗マウスCD45抗体、抗マウスCD4抗体で染色後、細胞の固定および細胞膜透過性亢進の処理をした後、抗マウスIL-4抗体で染色した。死細胞除去として7AADの染色も行なった。

細胞はフローサイトメーター (LSRFortessa, BD) を用いて解析した。

結果

まず子宮組織内のIL-18の発現量をウェスタンブロット解析で調べたところ、子宮平滑筋で成熟型IL-18の発現量が亢進していた (図1A)。また、子宮平滑筋よりは少ないものの胎盤でも成熟型IL-18の発現量が増加傾向にあったが、脱落膜ではほとんど発現していなかった。次に、子宮平滑筋の凍結切片を作製し、平滑筋のマーカである α SMAとIL-18の共染色を行なったところ、 α SMA陽性の平滑筋領域においてIL-18が発現していることを確認した (図1A)。一方で、胎盤ではIL-18の発現は観察されなかった。そこでIL-18と流産との関係について調べるために、LPS投与による流産モデルマウスを作製し、マウスIL-18中和抗体投与の有無による流産率を解析した (図2A)。その結果、LPS単独投与では流産率が30%ほどであったが、驚くことにLPS+IL-18中和抗体投与により流産率は100%に近い値を示した (図2Bおよび2C)。このことは流産においてIL-18が保護的な役割を果たしていることを意味する。続いて、LPS+IL-18中和抗体投与後による子宮組織のFACS解析を行なったところ、CD4陽性T細胞のIL-4産生能が著しく低下していることも確認している (図3A)。そこでLPS+IL-18中和抗体投与による流産率低下が、IL-4投与により改善できるか調べたところ、部分的に流産率の抑制効果を確認することができた (図3A)。さらに我々はIL-18の産生経路について、

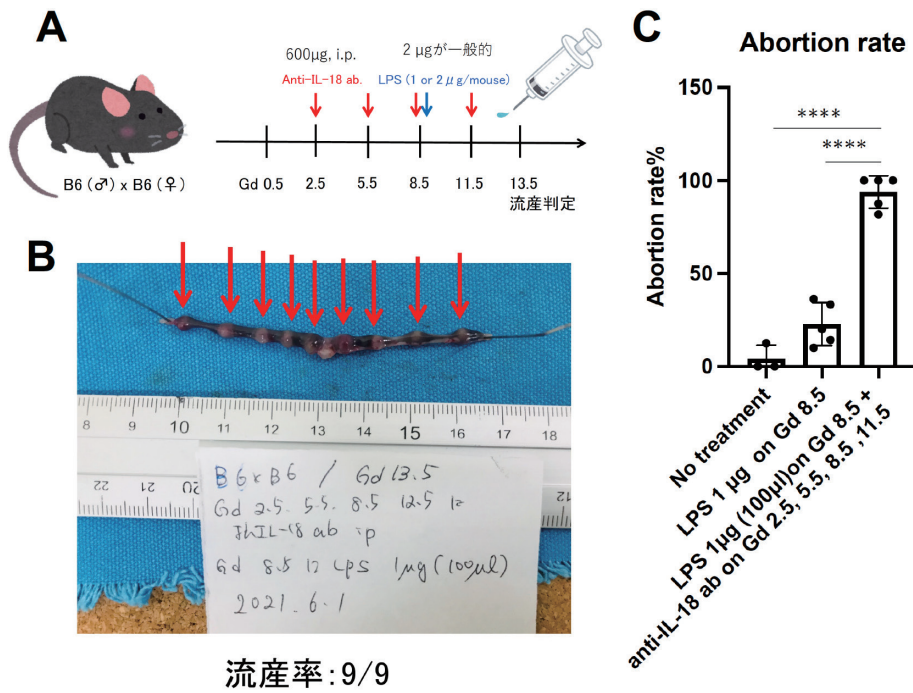


図2. LPS誘導性マウス流産モデルを用いた抗IL-18抗体投与による流産率の解析

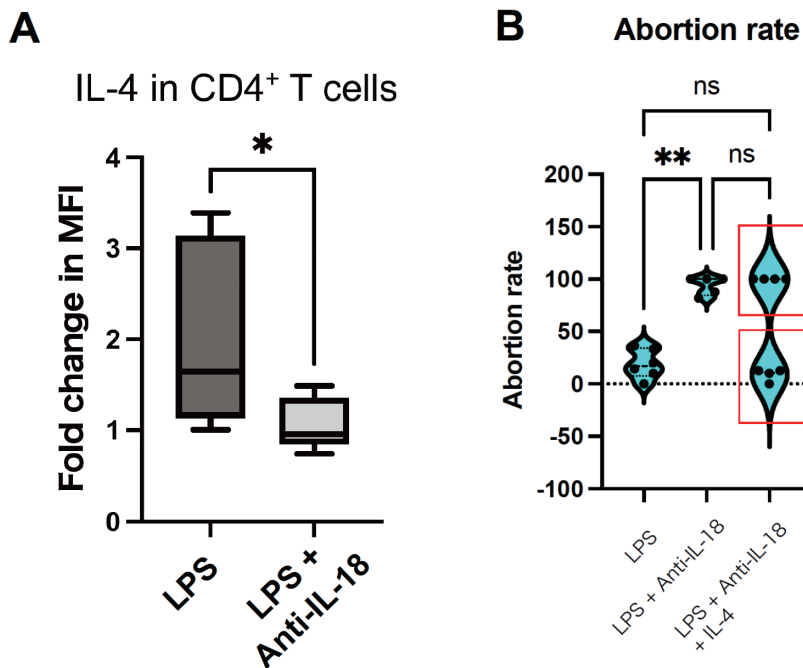


図3. LPS誘導性マウス流産モデル作製後、抗IL-18抗体投与によるCD4陽性T細胞の細胞内IL-4の発現解析 (A) およびIL-4投与による流産改善効果の検討 (B)

メカノバイオロジーに着目して研究を進めている。一般的にIL-18は、NLRP3やNLRP6を始めとするインフラマソームを介したCaspase-1経路やインフラマソームを介さないCaspase-11 (ヒトではCaspase-4/5) 経路により成熟型IL-18産生されるが、実際に子宮平滑筋でNLRP3やNLRP6の発現、活性

型Caspase-1や活性型Caspase-11の発現を確認している (データ未掲載)。一方で、子宮から単離した平滑筋のプライマリー細胞を用いて、メカニカルストレスである伸展圧縮刺激前後におけるIL-18の測定を試みたが、その産生は確認できなかった。

考 察

我々は子宮平滑筋から産生される IL-18 が IL-4 産生を促し、流産や早産の保護的に働くことを世界で初めて見出した。また、子宮平滑筋のインフラマソーム経路依存的に IL-18 が産生されることもわかってきている。その一方で、メカニカルストレスを介して IL-18 の産生が促進されているか否か、現段階ではまだ不明である。今後の展望として、LPS などプライミング刺激後、メカニカルストレスの有無における IL-18 の産生について調べる予定である。さらに、インフラマソーム依存的に IL-18 の産生を促す内因性のリガンドの同定についても検討している。

参考文献

1. Hannah Blencowe *et al.*: Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health*, 10, 2013
2. Varkha Agrawal *et al.*: Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med*, 17 (1): 12-9, 2012
3. Carole R Mendelson *et al.*: Multifactorial Regulation of Myometrial Contractility During Pregnancy and Parturition. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10: 714, 2019
4. Nora E Renthall *et al.*: MicroRNAs—mediators of myometrial contractility during pregnancy and labour. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9 (7): 39-401, 2013
5. Bertrand Coste *et al.*: Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, 330 (6000): 55-60, 2010
6. Kevin Retailleau *et al.*: Piezo1 in Smooth Muscle Cells Is Involved in Hypertention-Dependent Arterial Remodeling. *Cell Rep*, 13 (6): 1161-1171, 2015
7. Patrizia Romani *et al.*: Crosstalk between mechanotransduction and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22 (1): 22-38, 2020

Abstract

Chorioamnionitis, an infection of the placenta and the amniotic fluid, is a major risk of the preterm birth; however, the molecular mechanisms underlying this regulation are still not fully elucidated. Here, we demonstrate that IL-18 is mainly produced in the myometrium after pregnancy. Using an LPS-induced murine abortion model, the abortion ratio was significantly increased by the administration of anti-IL-18 antibody. We also found that IL-4-producing CD4⁺ T cells were decreased in the myometrium post-LPS and anti-IL-18 antibody injection compared with post-LPS injection alone. Furthermore, intraperitoneal injection of IL-4 suppressed LPS-induced abortion. On the other hands, myometrium was not induced the production of IL-18 by mechanical strain alone. Together, these results indicate that the IL-18-IL-4 axis plays a key role in the maintenance of pregnancy.