

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K16864

研究課題名(和文) 切迫流・早産妊婦の便中の制御性T細胞誘導性クロストリジウム属菌と早産発生との関連

研究課題名(英文) Relation between the Clostridium which induce regulatory T cells in intestinal bacteria of women with preterm labor and the pathogenesis of preterm labor.

研究代表者

永山 志穂 (NAGAYAMA, SHIHO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80741694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では切迫早産の病態に腸内細菌と免疫系が関連していると考え、切迫流早産妊婦の腸内細菌叢の解析を行った。その結果、正常妊婦と比較して、統計学的に異なる細菌叢構成であることが示された。細菌種別の比較においても切迫流早産群と正常妊娠群で有意差のある菌が存在した。制御性T細胞誘導17菌のうち本解析では4菌が確認されたがいずれも2群間で有意差は無かった。さらに、患者末梢血からリンパ球を抽出してフローサイトメトリーで解析する測定系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産の原因は多様であるが、早期の流早産では感染症によらない胎盤の炎症が関連していることが推測されている。本研究の結果から切迫流早産妊婦は正常妊婦と異なる腸内細菌叢を有することが示された。腸内細菌叢の違いは免疫系や代謝系に影響を与えることが知られており、本疾患の病態にも影響を与えている可能性が示唆される。今後、腸内細菌叢解析と免疫系解析を組み合わせるにより本疾患の病態解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that intestinal bacteria and the immune system are related to the pathogenesis of preterm labor, and analyzed the intestinal microbiota of pregnant women with threatened preterm labor (TPL). The results showed that the composition of the intestinal microbiota was different from that of normal pregnant women (NP). In the comparison of bacterial species, the abundance of several bacterial species significantly differed between two groups. We also established an assay system in which lymphocytes are analyzed by flow cytometry. Although the causes of preterm labor are diverse, it has been speculated that early preterm labor is associated with placental inflammation that is not caused by infection. The results of the study indicate that TPL women have a different gut microbiota from NP women. In the future, it is expected that the combination of intestinal microflora analysis and immune system analysis will lead to the elucidation of the pathogenesis of this disease.

研究分野：産科

キーワード：切迫早産 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

日本の早産率は5.6%であり、その原因の70%は切迫早産が占める。妊娠28週未満の早産は、0.2%しか発生しないが、その全早期新生児死亡に占める割合は28%と高率である¹。早産は複数の原因からなり、子宮感染に起因する場合以外には明らかな原因が特定できない場合が多い。疫学的に妊娠週数が早いほど早産における絨毛膜羊膜炎の合併率は高く、妊娠20~31週では50%の症例で絨毛膜羊膜炎が合併する²。一方、同時期の早産では細菌性膣症の合併率は低い³。このことは早期の絨毛膜羊膜炎の原因として感染もしくは感染を伴わない自然炎症が示唆される。早産において胎児に対する免疫寛容の破綻などが関連することが報告されており⁴、免疫恒常性の異常に伴う病態が存在すると考えられる。

近年、腸内細菌が腸管や全身の免疫系に影響を与えることが報告されている。クロストリジウム属菌(群、群、及び群)が抗炎症作用を有する制御性T細胞を誘導することが報告されており⁵、Shiozakiらは切迫早産症例について腸内細菌叢解析(T-RFLP法)を行い、このクロストリジウム属菌が減少していることを報告した⁶。さらに、切迫早産症例では末梢血中における制御性T細胞の炎症抑制活性が低下しているという報告もある^{7,8}。これらの報告から、腸内細菌叢の変化が免疫系を炎症の方向に傾け、絨毛膜羊膜炎を引き起こし早産を発症させることが推測される。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠28週未満の切迫流・早産妊婦では腸内細菌叢(制御性T細胞誘導性クロストリジウム属菌を含む)や、全身の免疫系(特に制御性T細胞、ヘルパーT17細胞)が変化することが病態に関与するという仮説を立てた。これらを検証するため、妊娠28週未満の切迫流・早産妊婦および正常妊婦において、便中の腸内細菌を次世代シーケンサーを用いて解析するとともに、末梢血中の免疫細胞をフローサイトメトリーを用いて解析し、切迫流・早産に関連する細菌・免疫細胞を明らかにすることを目的とした。これらは流・早産の予測、腸内細菌制御による治療・予防法の開発の展望につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者:

妊娠28週未満に切迫流・早産で入院した妊婦、及び妊娠28週未満の正常妊婦

(2) 解析方法:

次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析: 対象者から糞便を収集し、細菌DNAを抽出し、16S rRNA領域のアンプリコンをillumina MiSeq および QIIME2 で解析し、R (phyloseq package)、LEfSe 等を用いて統計学的解析を行なった。

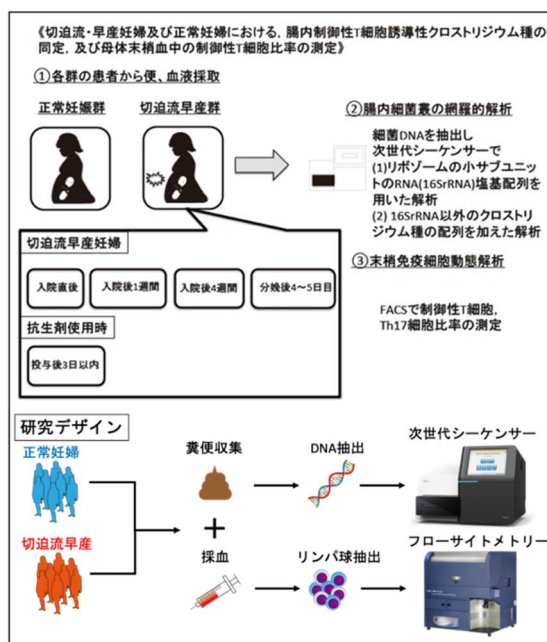


図1: 本研究のフロー 妊娠28週未満に切迫流・早産で入院した妊婦、及び妊娠28週未満の正常妊婦における、次世代シーケンサーとフローサイトメトリーを用いた腸内細菌叢および免疫系の解析

フローサイトメトリーを用いた末梢血リンパ球の解析：末梢血からリンパ球を抽出し、蛍光抗体で染色後に、BD LSRFortessa Cell Analyzer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) でデータを採取し、Flowjo Software for Mac ver. 10.5.3 (BD, Ashland, OR, USA) で解析を行なった。

(3)倫理的配慮：

本研究は本施設の倫理審査委員会により承認され、研究対象者から書面による同意を得て研究を行なった。

4 . 研究成果

(1)妊娠 28 週未満に切迫流・早産で入院した妊婦の腸内細菌叢解析

多様性解析 (OTU 数、Chao1、shannon index、simpson index) では両群に違いは認められなかった。多様性の比較 (Bray-Curtis、UniFrac 解析) では正常妊娠群と切迫流・早産群の細菌叢は有意に異なることが示された (図2)。

細菌階級別に両群の細菌叢の比較を行ったところ、Phylum (門) レベルでは有意差のあるものはなかった。Genus (属) レベルの比較において、切迫早産群では6つの菌が増加し、3つの菌が減少していた (図3)。さらに、Species (種) レベルでの比較において、切迫早産群では8つの菌が増加し、3つの菌が減少していた。制御性T細胞誘導17菌⁶のうち本解析では4菌が確認されたがいずれも2群間で有意差は無かった。

(2)フローサイトメトリー解析

カラーフローサイトメトリーを用いた末梢血リンパ球 (Th1、Th17) 測定系の確立。Treg 細胞のゲーティング方法は以前に確立していたため、本研究では、既報⁹を参考にしTh1、Th17 細胞同定のゲーティング方法を確立した (図4)。BD LSRFortessa で30,000細胞のデータを取得した。fluorescence minus one (FMO) を作成し、陽性・陰性境界を決定した¹⁰。検体の集積が少なく比較検討までに至らなかったため、今後も集積が必要である。

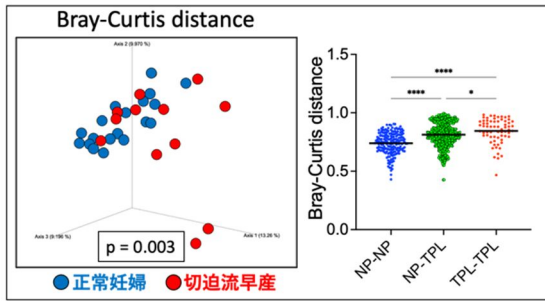


図2: 切迫流早産群(TPL)と正常妊婦群(NP)は腸内細菌叢が異なる。両群間でβ多様性を比較したところ、有意な違いを認めた。

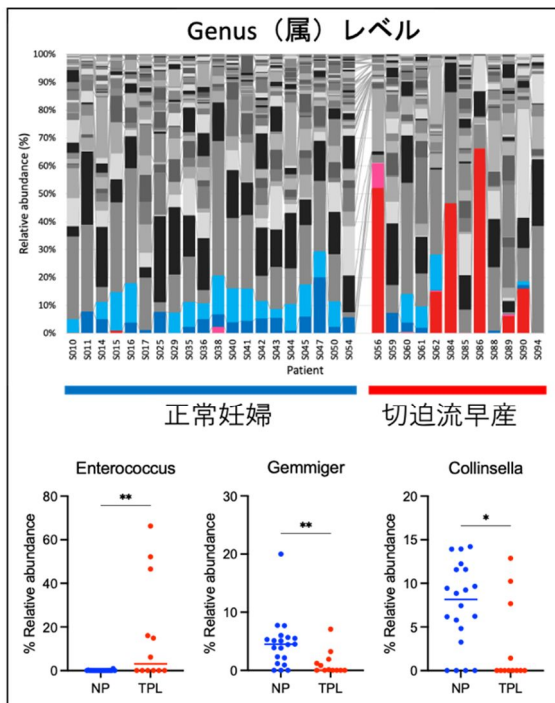


図3: 切迫流早産群(TPL)と正常妊婦群(NP)で異なる細菌群 属レベル、種レベルの比較で有意差のある細菌を複数認めた。代表的な細菌属を示す。

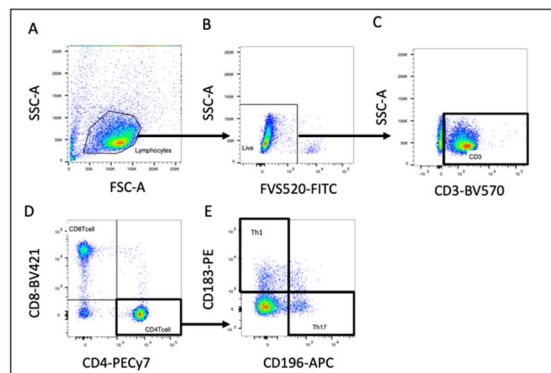


図4: フローサイトメトリーによるTh17細胞、Th1細胞のゲーティング方法 (A) SSC、FSCによるリンパ球のゲーティング。(B) FVS520による生細胞のゲーティング。(C-E) Th17細胞はCD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD183⁻ CD196⁺ 細胞、Th1細胞はCD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD183⁺ CD196⁻ 細胞とした。

引用文献

- 1.多田ら . 日本子ども家庭総合研究所 HP より
- 2.Frederik T. American Registry of Pathology. *Placental Pathology*, 2004.
- 3.Leitich H,et al. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007;21:375-390.
4. Romero R, et al. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* 2014;345:760-765.
5. Atarashi K,et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 2013 ;8:500:232-236.
6. Shiozaki A, et al. Intestinal microbiota is different in women with preterm birth: results from terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *PLoS One* 2014;5;9(11):e111374.
7. Steinborn,et al. Pregnancy-associated diseases are characterized by the composition of the systemic regulatory T cell (Treg) pool with distinct subsets of Tregs. *Clin Exp Immunol* 2012;167:84-98.
8. Schober,et al. Term and preterm labor: decreased suppressive activity and changes in composition of the regulatory T-cell pool. *Immunol Cell Biol* 2012; 2012;90:935-944.
9. Maecker, H.T., McCoy, J.P., Nussenblatt, R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;12:191-200.
10. Fox, A., et al. Cyto-Feature Engineering: A pipeline for flow cytometry analysis to uncover immune populations and associations with disease. *Sci Rep* 2020;10:7651.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------