

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09239

研究課題名（和文）新たな早産予防戦略を指向した、子宮頸管における無菌性炎症とその制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of sterile inflammation in the cervix and its control mechanism to establish the molecular basis for a novel strategy to prevent preterm birth

研究代表者

桑原 慶充（Kuwabara, Yoshimitsu）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40373013

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：帝王切開時に少量の子宮頸管組織を採取し、頸部線維芽細胞（UCFs）の培養システムを確立し、RNA seqによりプロゲステロン（P4）で発現誘導される分子群を同定した。後期流産を反復する難治性頸管無力症患者由来のUCFs培養系では、P4受容体の発現が著明に低下し、無菌性炎症応答の亢進を認めた。さらに同培養系にP4受容体拮抗薬を添加し、新たな特異的分子を同定した。次に、妊娠マウスにP4受容体拮抗薬を投与し子宮頸管組織を摘出し、CCL11-CCR3軸を介した好酸球性炎症像を見出した。さらにシングルセルRNA seq解析へ展開し、P4消退に伴う頸管組織全体の分子発現のダイナミクスを可視化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産は周産期死亡の主要な原因であり、新生児期の集中治療管理を乗り越えても神経発達予後に関わる長期的な問題をもたらす。その克服は周産期医療における中心命題であり、自然早産の多くに先行する子宮頸管熟化の制御は、早産予防戦略の鍵と考えられてきた。本研究により、難治性頸管無力症にみられる早期頸管熟化が、プロゲステロン（P4）受容体の発現低下によって誘導されている可能性が強く示唆された。マウス早産モデルとヒト線維芽細胞培養系を用いた網羅的解析により、P4消退で無菌的に誘導される頸管熟化機構における主要な分子シグナルを絞り込み、新たな早産マーカーや治療開発へ展開する基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：A culture system for human uterine cervical fibroblasts (UCFs) was established using a small amount of cervical tissue collected on cesarean section. RNA sequencing analysis identified novel molecules induced by the addition of progesterone (P4). In UCFs derived from patients with refracting cervical incompetence who experienced recurrent late miscarriages, the expression of P4 receptors was significantly reduced, and an increased sterile inflammatory response was observed. In addition, Specific molecules showing expressive change in response to P4 withdrawal were identified using the P4 receptor antagonist. Next, a P4 receptor antagonist was administered to pregnant mice, and an eosinophilic inflammatory response mediated by the CCL11-CCR3 axis was identified in cervical tissue. Furthermore, the establishment of Single-cell RNA sequencing of cervical tissue visualized molecular expression dynamics during cervical ripening in response to P4 withdrawal.

研究分野：周産期医療 生殖医療

キーワード：頸管熟化 早産予防 無菌性炎症応答 プロゲステロン消退

## 1. 研究開始当初の背景

多くの自然早産に先行する子宮頸管リモデリングの分子機序を解明する事は、早産予防戦略を開発する上で重要な鍵となる。細菌性膣炎や子宮頸管炎からの上行性感染による羊膜絨毛膜炎 (CAM) は、早産の主要な原因の一つである。一方で、CAM の伴わない早産は多く存在し、特に妊娠後期の早産では約 7 割を占める。こうした早産病態を説明する無菌性炎症 “sterile inflammation” の概念が提唱され、新たな早産機序として注目されている。一方でこの視点から早産の主要病態である頸管リモデリングを捉えた研究はなかった。

## 2. 研究の目的

ヒト臨床検体より確立した子宮頸部線維芽細胞培養系とマウス早産モデルを用いて、子宮頸管組織における炎症応答と、その制御系としてのプロゲステロンの作用分子機構を明らかにし、鋭敏な早産マーカーや標的治療の開発など、新たな早産予防戦略に向けた分子基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト頸部線維芽細胞 (UCFs) 培養系による解析

倫理委員会の承認の下、臨床背景の異なる妊婦の陣痛発来前 (予定帝王切開時) に子宮頸部組織を生検し、細切後に細胞培養フラスコにて子宮頸部線維芽細胞 (UCFs) を継代培養し純化した。-80C で凍結保存し、適時融解し、Estrogen (E2) 存在下で前継代後に諸解析に用いた。

### (2) プロゲステロン拮抗型マウス早産モデルによる解析

妊娠 15 日目マウスにプロゲステロン拮抗薬 mifepristone 500 μg を投与し 12 時間後に子宮頸管組織を摘出し、RNA 抽出、パラフィンブロック作成、セルソーティングを行い、諸解析を行った。

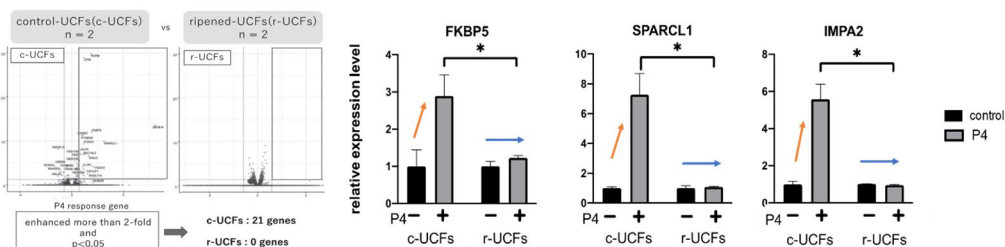
## 4. 研究成果

(1) 経腹の子宮峡部頸管縫縮術によって妊娠が維持された難治性頸管無力症患者および、骨盤位や帝王切開既往妊婦 (bishop score 4 点未満) より、それぞれ完全熟化、未熟化の頸管組織を採取し、子宮頸部線維芽細胞培養系を確立して諸解析を行った (完全熟化頸管由来 ripened cervix derived UCSF: r-UCSFs vs 未熟化頸管由来 control UCSFs: c-UCSFs)。

### プロゲステロン添加による遺伝子発現応答の網羅的解析

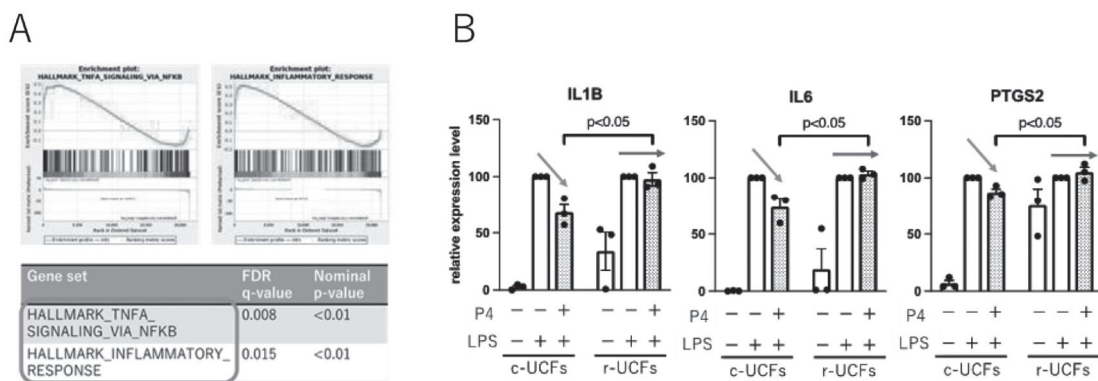
r-UCSFs と c-UCSFs それぞれの培養系にプロゲステロン (1 μM) を添加し、遺伝子発現の変化について RNA Sequencing で網羅的に解析した。未熟化頸管由来の c-UCSFs 培養系では 21 遺伝子において 2 倍以上の発現増強が見られ、プロゲステロン応答遺伝子と考えられたが、完全熟化頸管由来の r-UCSFs 培養系では、すべての遺伝子でプロゲステロン応答が消失していた (図 A)。このうち、プロゲステロン添加に対する発現応答を強く認めた、プロゲステロン受容体のコシャペロンとして知られる *FKBP5* (FKBP Prolyl Isomerase 5) と、細胞外マトリックスの形成に関与する糖タンパク *SPARCL1* (SPARC-Like Protein 1) の発現変化を、リアルタイム PCR 法で定量解析した。その結果、RNA Sequencing の結果に一致して熟化頸管由来の r-UCF 培養系でのプロゲステロン応答の消失が確認された (図 B)。

A



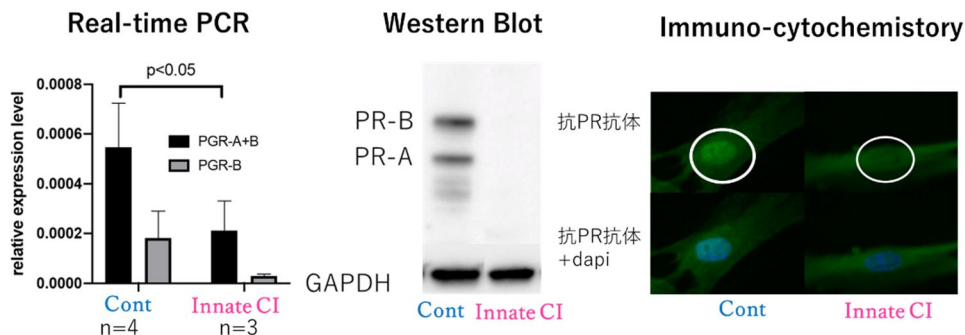
## 潜在性および外因性リガンドに対する炎症応答の比較解析

RNA Sequencing のデータを GSEA (Gene set enrichment analysis) で解析すると、r-UCFs 培養系では、c-UCFs 培養系に比べて炎症系の遺伝子セットが有意に増加していることが明らかになった (図 A)。そこで、リアルタイム PCR 法で、外因性リガンドの LPS (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) に対する炎症応答と、プロゲステロン (1  $\mu\text{M}$ ) 添加による炎症抑制作用の相違について比較解析した。r-UCFs 培養系では、LPS 添加前より既に炎症性サイトカイン IL-1, IL-6, および PTGS2 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2) の発現が亢進していた。c-UCFs 培養系では、LPS 添加による IL-1, IL-6, PTGS2 の発現誘導がプロゲステロン添加によって抑制されたが、r-UCFs 培養系ではプロゲステロンの効果が消失していた (図 B)。



## プロゲステロン受容体の発現解析

リアルタイム PCR 法では、r-UCFs 培養系において、PR 全体および PR-B の発現の有意な低下を認めた。ウェスタンブロットングによるタンパク発現レベルの解析においても r-UCFs の抽出蛋白では、PR-A, PR-B に相当するバンドを認めなかった。さらに抗プロゲステロンレセプター抗体を用いた細胞免疫染色では、c-UCFs で核に局在する PR が、r-UCFs では消失していることが示された。ATAC-sequence 法を用いたエピゲノム解析で、PR 遺伝子のプロモーター領域におけるオープンクロマチン領域の分布を確認したところ、c-UCFs と r-UCFs でクロマチン構造に差を認めなかった。



## In vitro のプロゲステロン消退系による網羅解析

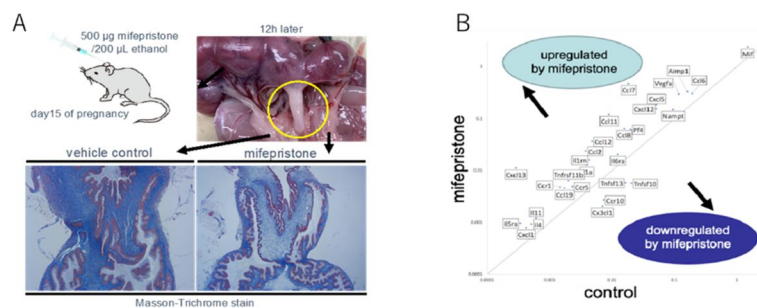
エストロゲン+プロゲステロン存在下で未熟化頸管由来の c-UCFs を培養し、プロゲステロン拮抗薬 mifepristone を添加することで、In vitro にプロゲステロン消退を再現し、RNA-sequence 法で特異的に発現誘導される遺伝子群のスクリーニングを行い、プロゲステロン消退によって発現誘導される分子群 (XYZ) と、発現が低下する分子群 (A~E) を新規同定した。

Gene	リードカウント (TMM正規化)		logFC	PValue
	コントロール	プロゲステロン消退誘導		
X	30.53	279.73	3.1900609	5.54E-17
Y	23.99	127.4	2.4025019	4.74E-09
Z	28.35	93.24	1.7128494	2.80E-05
A	97.07	11.07	-3.116951	2.93E-11
B	232.32	68.31	-1.763905	2.02E-07
C	1505.17	526.23	-1.515921	2.16E-07
FKBP5	923.82	408.98	-1.175319	6.22E-05
D	427.55	192.95	-1.147348	0.000178
E	510.44	248.34	-1.039039	0.000555

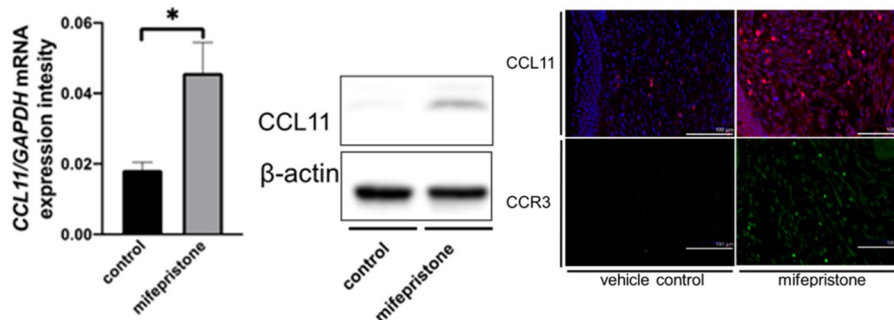
## (2) プロゲステロン消退型早産モデルマウスによる検討

PCR アレイを起点とした頸管熟化に特異的な分子発現の探索

妊娠 15 日目マウスにプロゲステロン拮抗薬 mifepristone 500  $\mu$ g を投与し 12 時間後に子宮頸管組織を摘出し特徴的な組織学的変化を確認した(図 A)。このマウスモデルを用いて、このモデルを用いて、頸管熟化と同期した炎症応答について PCR array を用いた比較解析を行い、炎症性サイトカインやケモカインを中心とした、有意に発現変化を示す分子群を同定した(図 B)。

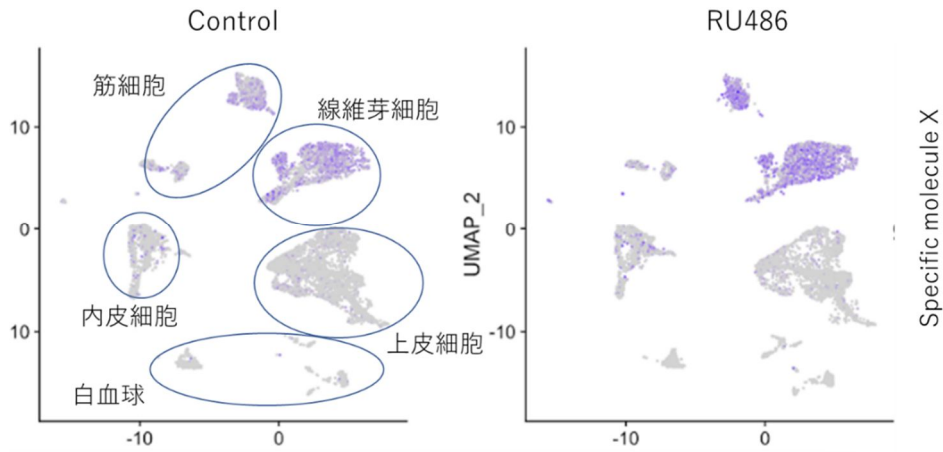


著明な発現変動を示した CCL11 に着目した発現解析により、好酸球浸潤を特徴とした頸管熟化過程における新たな無菌性炎症像が明らかとなった



## 頸管熟化に伴う頸部組織のシングルセル解析

同実験系を用いて mifepristone 投与前および投与後に採取した頸管組織採取し、子宮頸部組織の構成細胞を各細胞集団に特異的な発現マーカーを用いてクラスタリングした。シングルセル解析システムを構築し、プロゲステロン消退に伴い発現量が変化するクラスター特異的な分子群を捉えることにより、頸管構成細胞および免疫細胞における分子発現のダイナミクスの可視化に成功した。



図：In vitro のプロゲステロン消退系で新規同定された特異的分子 X をシングルセル解析へ照会するとマウス生体内でもプロゲステロン消退に伴い発現が増強している

### (3)まとめ

プロゲステロン作用の消退に呼応した無菌性炎症応答は、子宮頸管熟化プロセスに重要であり、難治性頸管無力症における病態形成メカニズムの本態であると考えられた。マウス早産モデルによる頸管熟化変化のシングルセル解析と、UCFs 培養系を用いた網羅的発現解析を両輪として、プロゲステロン消退に伴う主要な分子シグナルを絞り込むことに成功した。これらを標的に解析を進めることによって、頸管熟化機構を標的とした鋭敏な早産マーカーや新規治療の開発に向けた新たな展開が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 桑原 慶充 杉田洋佑	4. 巻 54
2. 論文標題 子宮頸管熟化制御とその破綻による早産誘導メカニズムの解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 東京産婦人科医学会誌	6. 最初と最後の頁 109-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中井章人, 桑原慶充	4. 巻 6
2. 論文標題 黄体ホルモン 切迫早産と黄体ホルモン	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 最新女性医療	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sugita Yosuke, Kuwabara Yoshimitsu, Oishi Yumiko, Takeshita Toshiyuki.
2. 発表標題 Progesterone responsiveness change associated with cervical ripening observed in cultured human cervical fibroblasts.
3. 学会等名 The 73rd Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sugita Yosuke, Kuwabara Yoshimitsu, Oishi Yumiko, Takeshita Toshiyuki.
2. 発表標題 Progesterone withdrawal induces eosinophilic inflammation in the process of mouse cervical ripening.
3. 学会等名 68th Annual Meeting of the Society for Reproductive Investigation (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 杉田 洋佑、桑原 慶充、大石 由美子、竹下 俊行
2. 発表標題 ヒト子宮頸部線維芽細胞を用いた頸管熟化に伴うプロゲステロン応答性および潜在的な炎症性変化の検証
3. 学会等名 第35回本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yosuke Sugita, Yoshimitsu Kuwabara, Yumiko Oishi, Toshiyuki Takeshita
2. 発表標題 Progesterone responsiveness change associated with cervical ripening using a human cervical fibroblast culture system
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会・学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1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
研究分担者	片山 映 (Katayama Akira)  (10333113)	日本医科大学・医学部・助教  (32666)	
研究分担者	竹下 俊行 (Takeshita Toshiyuki)  (60188175)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授  (32666)	

#### 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
---------	---------