

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09259

研究課題名(和文) 前期破水の治癒機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Healing of ruptured fetal membranes: investigation of the mechanisms and new treatment

研究代表者

最上 晴太 (Mogami, Haruta)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40378766

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)：前期破水は早産の主要な病因である。しかし感染を伴わない前期破水は、まれに自然治癒することがある。本研究では前期破水の治癒のメカニズムをマクロファージによる羊膜の再生の視点から探索した。Cre-loxPシステムを用いて胎児マクロファージ欠損マウスを作成し解析を行ったところ、破水部にはCX3CR1陽性マクロファージが遊走してTGF- $\beta$ を放出し、これが羊膜の上皮間葉転換を誘導して羊膜の治癒を促進していることが示された。ヒト羊膜でも破水部にマクロファージが遊走し、TGF- $\beta$ -Smadシグナルが活性化していた。本研究により前期破水時の羊膜の再生機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産は、児が未熟な状態、かつ低体重で出生するため、周産期死亡の一番の原因であり、さらに児に後遺症を残すことがあり、周産期医学・社会的に大きな問題である。満期に至る前に破水する前期破水は早産の主要な病因であるが、その予防・治療法は確立されていない。本研究は、自然免疫のマクロファージの助けにより、破水した羊膜上皮細胞が間葉細胞に転換しながら羊膜が治癒していくことが示され、羊膜の治癒・再生機構の一端を解明できた。この研究成果は前期破水の予防・治療への礎となり、将来、早産を減らすための第一歩となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Preterm premature rupture of membranes (pPROM) is a leading cause of preterm birth. In some cases, these ruptured membranes heal spontaneously. In this study, we investigated the mechanisms of amnion healing using conditional macrophage-depleted mice. At the rupture site of both human and mouse amnion, macrophages migrated to and reside in the ruptured site, where the epithelial-mesenchymal transition (EMT) was observed. In vivo, the wound healing of amnion was significantly compromised in the conditionally macrophage-depleted mice, and the EMT was absent. In vitro, the migration of amnion was mediated by the EMT through the TGF- $\beta$ -Smad signal. In the cases of human pPROM, macrophages were also migrated to the ruptured site of amnion with the evidence of EMT. These findings suggest the importance of fetal macrophages in the healing of amnion through induction of the EMT.

研究分野：周産期医学

キーワード：前期破水 羊膜 マクロファージ 創傷治癒・再生 早産

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠 37 週未満に破水が生ずる前期破水は全妊娠の 1-3% に生じ、また早産症例の 30-40% を占め、早産発症の主要な原因となる。前期破水の約 3 割は絨毛膜羊膜炎による子宮内感染が原因とされているが、残りの多くは子宮内出血(絨毛膜下血腫)、喫煙、母体低栄養、母体の精神的ストレス、多胎など非感染性のものである。感染による破水は胎児への感染や母体敗血症につながる危険があるため、児の娩出という妊娠の終了が避けられないが、一方非感染性の破水は治療の対象となる可能性がある。

妊娠中期の前期破水はほとんど数日以内に分娩にいたるが、ごくまれに数週間から数ヶ月の間妊娠継続ができたたり、破水の自然治癒、つまり "re-sealing" が生じることが報告されている。しかし前期破水の自然治癒のメカニズムに関してはこれまでに全くわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、妊娠マウス前期破水モデルを用いて、破水した卵膜の治癒過程を検討する。我々は、これまでマウス破水部の羊膜の治癒部位には、マクロファージが遊走・集積していることを明らかにしてきており(Mogami H et al. Scientific Reports, 2017)、マクロファージを中心とした自然免疫からの破水の治癒機構を解明する。羊膜の再生機構が解明できれば、その応用は非感染性の破水の治療、という臨床応用につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトの感染を伴わない(絨毛膜羊膜炎のない)前期破水症例より、破水部をサンプリングし、組織学的に破水部を検討する。

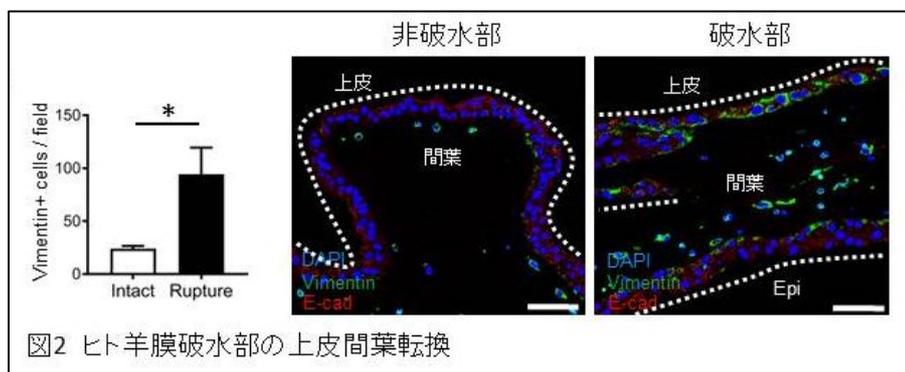
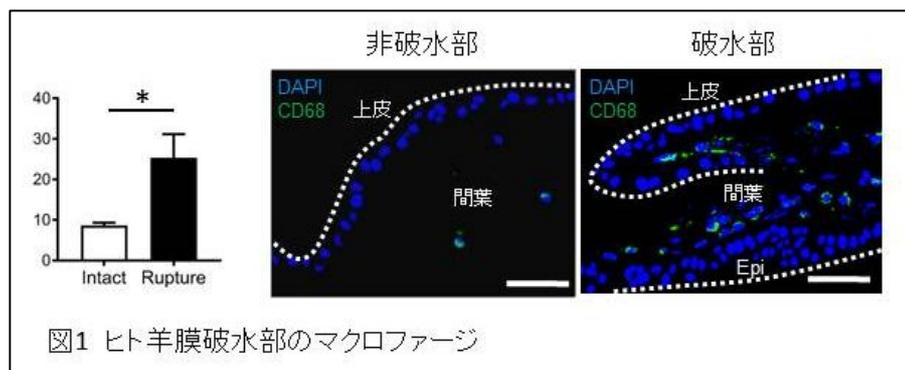
(2) Cre-loxP system を用いて、胎仔マクロファージ欠損マウスを作製する。この妊娠マウスを前期破水させ、羊膜の治癒とマクロファージとのかかわりを探る。

(3) ヒトマクロファージ、およびヒト羊膜上皮細胞を共培養し、マクロファージと上皮細胞との相互作用を *in vitro* で解析する。

### 4. 研究成果

(1) ヒトの感染を伴わない破水部羊膜では、CD68 陽性のマクロファージが遊走・集積していた(図1)。非破水部にはマク

ロファージはほとんどみられなかった。さらに、破水部の E-cadherin 陽性の羊膜上皮細胞層には、vimentin 陽性の細胞が多数認められた(図2)。これは上皮間葉転換(Epithelial mesenchymal transition: EMT)が生じていることを示唆している。



(2) 次に、 Cre-loxP system による conditional knock out mice を使用して、胎仔マクロファージ欠損マウスを作製した。このマウスでは予想通り破水部の羊膜にマクロファージの集積が見られなかった (図3)。さらに HE

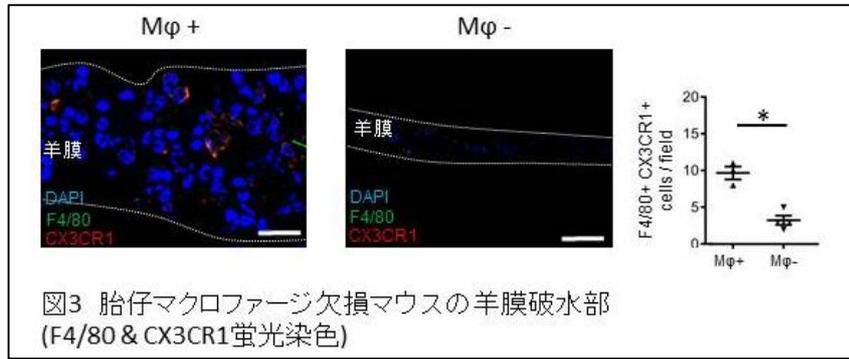


図3 胎仔マクロファージ欠損マウスの羊膜破水部 (F4/80 & CX3CR1 蛍光染色)

染色では、マクロファージを有する対照群は羊膜間葉細胞と間質組織の増殖により羊膜の治癒が見られたが (図4左) マクロファージ欠損群では、羊膜の治癒が著明に不良であった (図4右)。そしてこのときマクロファージを有する対照群でみられた羊膜治癒部の EMT が (図5左) マクロファージ欠損マウスでは全くみられなかった (図5右)。マクロファージを有するマウスでは、羊膜の創傷治癒が生じている部位に Smad3 蛋白のリン酸化がみられ、マクロファージ欠損マウスでは Smad3 のリン酸化がみられなかった。以上より、羊膜の治癒には胎仔由来のマクロファージが必須であり、マクロファージが TGF- $\beta$ -Smad シグナルを活性化して羊膜の上皮間葉転換を促進し、羊膜の再生を促していることが示された。

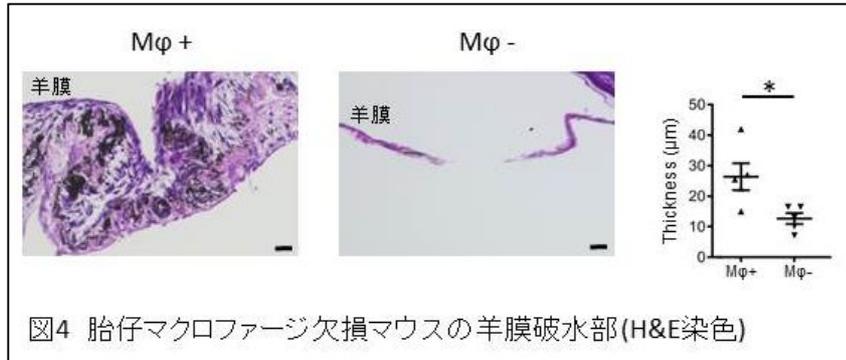


図4 胎仔マクロファージ欠損マウスの羊膜破水部 (H&E 染色)

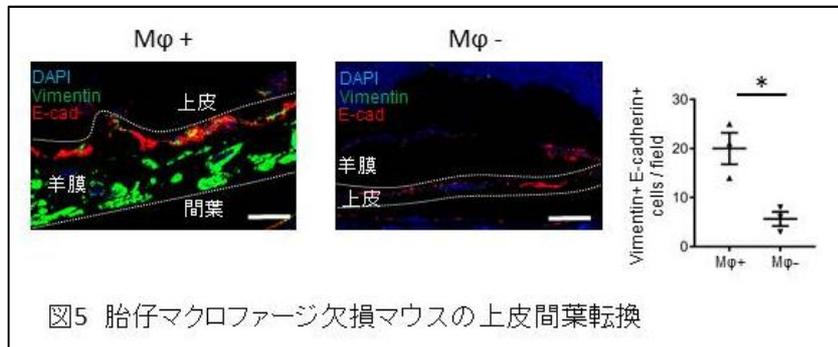


図5 胎仔マクロファージ欠損マウスの上皮間葉転換

(3) ヒトマクロファージおよびヒト羊膜上皮細胞を共培養すると、マクロファージと共培養することにより、羊膜上皮細胞の遊走が上皮細胞単独に比べて有意に促進された。このとき、マクロファージよりは TGF- $\beta$  が産生されていた。羊膜上皮細胞に TGF- $\beta$  を添加すると、羊膜上皮細胞の EMT が生じて、その遊走が促進された。

以上より、非感染性の破水では羊膜が治癒する可能性が示唆された。破水すると羊膜断端にマクロファージが遊走し、これらのマクロファージより TGF- $\beta$  が放出されて羊膜上皮細胞の上皮間葉転換を生じて羊膜が治癒することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haruta Mogami, R Ann Word	4. 巻 11
2. 論文標題 Healing Mechanism of Ruptured Fetal Membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.00623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fumitomo Nishimura, Haruta Mogami, Kaori Moriuchi, Yoshitsugu Chigusa, Masaki Mandai, and Eiji Kondoh	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanisms of thrombin-induced myometrial contractions: Potential targets of progesterone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0231944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takai Hiroshi, Kondoh Eiji, Mogami Haruta, Kawasaki Kaoru, Chigusa Yoshitsugu, Sato Mai, Kawamura Yosuke, Murakami Ryusuke, Matsumura Noriomi, Konishi Ikuo, Mandai Masaki	4. 巻 104
2. 論文標題 Placental Sonic Hedgehog Pathway Regulates Fetal Growth via the IGF Axis in Preeclampsia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 4239 ~ 4252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jc.2019-00335	査読の有無 有
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 最上晴太 近藤英治	4. 巻 87
2. 論文標題 子宮頸管無力症の管理	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 17-22
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 最上晴太 近藤英治	4. 巻 135
2. 論文標題 妊娠高血圧症候群の栄養	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床栄養	6. 最初と最後の頁 767-774
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 最上晴太	4. 巻 4996
2. 論文標題 ProからProへ 絨毛膜下血腫と早産・前期破水	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 52-53
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 Kiyokawa H, Mogami H, Ueda Y, Kawamura Y, Sato M, Chigusa Y, Mandai M, Kondoh E.	4. 巻 160
2. 論文標題 Maternal Glucocorticoids Make the Fetal Membrane Thinner: Involvement of Amniotic Macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology.	6. 最初と最後の頁 925-937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2018-01039.	査読の有無 有
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 Kawasaki K, Kondoh E, Chigusa Y, Kawamura Y, Mogami H, Takeda S, Horie A, Baba T, Matsumura N, Mandai M, Konishi I.	4. 巻 73
2. 論文標題 Metabolomic Profiles of Placenta in Preeclampsia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension.	6. 最初と最後の頁 671-679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12389.	査読の有無 有
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 Ujita M, Kondoh E, Chigusa Y, Mogami H, Kawasaki K, Kiyokawa H, Kawamura Y, Takai H, Sato M, Horie A, Baba T, Konishi I, Matsumura N, Mandai M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Impaired Wnt5a signaling in extravillous trophoblasts: Relevance to poor placentation in early gestation and subsequent preeclampsia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pregnancy Hypertens.	6. 最初と最後の頁 225-234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.preghy.2018.06.022.	査読の有無 有
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24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Kawamura, Y, Mogami H, Inohaya A, Ueda Y, Chigusa Y, Kondoh E, and Mandai M.
2. 発表標題 Fetal macrophages in amnion promote the healing of ruptured membranes through TGFb-1-induced epithelial-mesenchymal transition.
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ueda Y, Mogami H, Inohaya A, Kawamura, Y, Sato M, Kawasaki K, Chigusa Y, Kondoh E, and Mandai M.
2. 発表標題 Ligustilide inhibits oxytocin-induced human myometrial contraction and alleviates lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in human macrophages.
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hikaru Kiyokawa, Haruta Mogami, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, and Masaki Mandai
2. 発表標題 Glucocorticoid weakens Fetal Membranes via IL-1 Production by Amniotic Fluid Macrophages
3. 学会等名 The Society for Reproductive Investigation, 66th Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Kawamura, Haruta Mogami, Yusuke Ueda, Mai Sato, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, and Masaki Mandai
2. 発表標題 Fetal macrophages in amniotic fluid assist the healing of ruptured membranes
3. 学会等名 The Society for Reproductive Investigation, 66th Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruta Mogami, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, Ruth A. Word, and Masaki Mandai
2. 発表標題 Collagen Type I Gels Stimulates Healing of Ruptured Amnion in Mouse PROM
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumitomo Nishimura, Haruta Mogami, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, and Masaki Mandai
2. 発表標題 Thrombin Activates Myosin Light Chain and Induces Cyclooxygenase-2 (COX-2) Synthesis in Human Myometrial Cells and Progesterone Blocks Its Pathway
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hikaru Kiyokawa, Haruta Mogami, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, and Masaki Mandai
2. 発表標題 Glucocorticoid weakens fetal Mmembranes via IL-1 production by amniotic fluid macrophages
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Kawamura, Haruta Mogami, Yusuke Ueda, Mai Sato, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, and Masaki Mandai
2. 発表標題 Fetal macrophages in amniotic fluid assist the healing of ruptured membranes
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Ueda, Haruta Mogami, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, and Masaki Mandai
2. 発表標題 Ligustilide inhibits oxytocin-induced human myometrial contraction
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川晶、最上晴太、千草義継、近藤英治、万代昌紀
2. 発表標題 母体グルココルチコイド投与は羊膜マクロファージにより卵膜を脆弱化させる
3. 学会等名 第55回日本周産期・新生児医学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 最上晴太 川村洋介 上田優輔 佐藤麻衣 千草義継 近藤英治 万代昌紀
2. 発表標題 1型コラーゲンは妊娠マウスの前期破水の治癒を促進する
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 最上晴太、清川晶、上田優輔 千草義継、近藤英治、万代昌紀
2. 発表標題 妊娠中の高用量ステロイドは卵膜を脆弱化する
3. 学会等名 第141回近畿産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川晶、最上晴太、上田優輔 川村洋介 佐藤麻衣 千草義継、近藤英治、万代昌紀
2. 発表標題 母体グルココルチコイド投与は羊膜マクロファージにより卵膜を脆弱化させる
3. 学会等名 第27回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 最上晴太
2. 発表標題 周産期リステリア症 妊娠中の食生活を中心に
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruta Mogami, Yosuke Kawamura, Shingo Ito, Mai Sato, Hiroshi Takai, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, Masaki Mandai, and Ruth Ann Word
2. 発表標題 Amniotic fluid macrophages help the healing of ruptured amnion via epithelial mesenchymal transition (EMT)
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke Kawamura, Haruta Mogami, Mai Sato, Hiroshi Takai, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, Masaki Mandai
2. 発表標題 Repairing fetal membranes by elastomeric sealant in mouse pPROM model
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 最上晴太、川村洋介、佐藤麻衣、近藤英治、万代昌紀、 R. Ann Word
2. 発表標題 妊娠中の前期破水の治癒機構
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruta Mogami, Yosuke Kawamura, Mai Sato, Hiroshi Takai, Eiji Kondoh, Masaki Mandai and R. Ann Word
2. 発表標題 Collagen gel stimulates healing of ruptured amnion in mouse PROM model
3. 学会等名 2018 International Federation on Placenta Associations (IFPA) 平成 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke Kawamura, Haruta Mogami, Yusuke Ueda, Mai Sato, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, Masaki Mandai
2. 発表標題 Fetal macrophages in amniotic fluid assist the healing of ruptured membranes
3. 学会等名 2018 International Federation on Placenta Associations (IFPA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 最上晴太、川村洋介、佐藤麻衣、近藤英治、万代昌紀、 R. Ann Word
2. 発表標題 上皮間葉転換 (EMT) は前期破水における羊膜の治癒を促進する
3. 学会等名 第12回日本早産学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川村洋介、最上晴太、上田優輔、佐藤麻衣、千草 義継、近藤英治、万代 昌紀
2. 発表標題 羊水中の胎児肝臓由来マクロファージは破膜部位の卵膜再生を促進する
3. 学会等名 第12回日本早産学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruta Mogami
2. 発表標題 Healing of preterm PROM assisted by amniotic fluid macrophages via epithelial mesenchymal transition (EMT)
3. 学会等名 2018 Preterm Birth International Collaborative Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke KAWAMURA, Haruta MOGAMI, Yusuke UEDA, Mai SATO, Yoshitsugu CHIGUSA, Eiji KONDOH, Masaki MANDAI
2. 発表標題 Fetal macrophages in amniotic fluid assist the healing of ruptured membranes
3. 学会等名 Society for Reproductive Investigation 66th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hikaru Kiyokawa, Haruta Mogami, Yoshitsugu Chigusa, Eiji Kondoh, Masaki Mandai
2. 発表標題 Glucocorticoid weakens fetal membranes via IL-1 production by amniotic fluid macrophage.
3. 学会等名 Society for Reproductive Investigation 66th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 最上晴太 (日本胎盤学会編)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 448
3. 書名 前期破水の機序と修復 基礎と臨床の両側面からみた胎盤学	

1. 著者名 最上晴太 (吉川史隆、平松祐司、大須賀穰 編)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 314
3. 書名 胎位異常 (骨盤位・横位) 産科婦人科疾患最新の治療2019-2021	

1. 著者名 最上晴太 (杉田尚子、諏訪太郎、村井俊哉 編)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メディカ出版	5. 総ページ数 300
3. 書名 妊娠・授乳と薬 精神科の薬 - 抗精神病薬・抗うつ薬・睡眠薬・抗認知症薬... - はや調べノート	

〔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	近藤 英治  (KONDOH Eiji)  (10544950)	京都大学・医学研究科・准教授    (14301)	
研究分担者	万代 昌紀  (MANDAI Masaki)  (80283597)	京都大学・医学研究科・教授    (14301)	
研究分担者	千草 義継  (CHIGUSA Yoshitsugu)  (80779158)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	

	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
研究協力者	川村 洋介  (KAWAMURA Yosuke)		
研究協力者	ワード アン  (Word R.A.)		
研究協力者	アクガル ユーセル  (Akgul Yucel)		

## 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