

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18714

研究課題名（和文）局所細菌フローラの活動性による早産発症の制御システムの解明

研究課題名（英文）Functional analysis for regulatory systems of focal microbiota activity in preterm labor

研究代表者

宮田 康平（Kohei, Miyata）

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：80759233

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：早産は期待された時期より早く陣痛が発生することで起きる、新生児の予後に最もインパクトを与える周産期イベントの一つです。本研究では膣内細菌叢の生理活性物質、オートインデューサー2（AI-2）と陣痛および子宮収縮との関連について検討しました。陣痛発生している妊婦の膣分泌物にはAI-2が多く含まれていること、子宮収縮の頻度と膣分泌物中のAI-2の濃度は関連していることがわかりました。このことから、子宮周囲の細菌叢の生理活性により、陣痛発生が惹起されている可能性が示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は早産の予測および治療に役立てられる可能性があります。

近年早産児の予後は改善していますが、これは新生児期の医療の発展によるものであり、妊娠中の早産の予防や早産の治療などの、妊婦に対する医療は改善していません。このため、早産および切迫早産の新たな医学的知見の探索ならびに予防法・治療方法の開発が求められています。本研究の結果は今後の早産児の予後を改善するための礎となります。

研究成果の概要（英文）：Preterm birth is a most affective event for the newborn prognosis. In this study, we focused on the relationship between Labor or uterine contraction and vaginal bioactive substance. Higher concentration of AI-2 was detected in the pregnant who were in labor. Several factors were analyzed to clarified how the AI-2 affected to the uterine contraction. However there were no relation between AI-2 and inflammation status or cervical status, the frequency of uterine contraction was the only correlated to AI-2 concentration. These findings suggested that onset of labor was promoted by bioactive substance, AI-2.

研究分野：周産期医学

キーワード：クオラムセンシング 早産 細菌叢

1. 研究開始当初の背景

早産は出生児の予後ならびに成育に多大な影響を及ぼす有害な周産期イベントの一つです。本邦は母体・新生児ともに世界トップレベルの周産期予後を誇りますが、特に超早産と呼ばれる妊娠 28 週未満の早産では、神経学的予後が不良であるばかりでなく、その未熟性により確実な生存を担保できないのが現状です。また、早産の病因は多岐に及ぶと考えられており、感染症、免疫異常、循環異常、子宮の構造的な異常、内分泌学的異常などがあげられますが、個々の症例において病態を診断する方法がなく、病態生理に基づいた根本的な治療や予防策はありません。このため、早産発生の予測が困難であり、結果的に症状を有する妊婦を切迫早産として主に入院治療を行っているのが現状であり、早産の発症機序に基づいた病型分類が、診断・治療の発展には必要です。

感染によって惹起された早産は、出生後の新生児感染症の直接の原因となり、児の未熟性も加わるため予後不良です。一方で、切迫早産の治療中に感染症の存在が疑われる妊婦で、既存の精密検査により子宮内感染を疑われ早期に児を娩出したものの、分娩後の新生児感染症を発症しない症例に多く遭遇します。現行の疾患概念における「感染症による切迫早産」には、明らかにその病態が異なる病型があると推測されます。すなわち、代表者は①明らかな胎児・羊水感染を伴う「卵膜内感染型」、②子宮内に感染するものの主に胎盤に感染が止まり新生児感染を起こさない「絨毛膜羊膜炎型」、③卵膜外の脱落膜や子宮内腔に感染巣を持ち、絨毛膜・胎児には病原微生物や炎症所見が同定されない「卵膜外感染型」に分類できると考えています。このうち「卵膜内感染型」と「絨毛膜羊膜炎型」については、病原性微生物から児を守護するために早期の娩出後に新生児治療を行うことを推奨されていますが、現在は結果的に子宮内への感染の伝播がない「卵膜外感染型」であっても、「子宮内感染」を疑われ早期に児を娩出したり、あえて治療を行わずその後に前期破水の合併や陣痛発来のために「半人工」早産となる症例が少なくありません (Pathogens. 2021;10:730., Fertil Steril. 2004;82:799-804)。

高速シーケンサーの登場により、微量な細菌の検出やそのプロファイリングが可能となりました。早産に関連する子宮内・子宮周囲の細菌叢解析によって、同じ腔内常在菌でも「株」の種類によって臨床的予後が異なること、従来の方法では子宮内感染を疑わない妊婦の羊水中にも細菌が存在すること、特定の細菌を検出することで絨毛膜羊膜炎の程度が予想できることなどが分かってきました。しかし、早産ハイリスクとなる特定の細菌やプロファイルと同定できたものはなく、①正常細菌叢の破綻、②病原性細菌の増加、③多菌種による細菌叢の「乱れ」を特徴とするとしています (Front Immunol. 2020; 11: 528202.)。また、抗菌薬を使用した切迫早産の臨床研究も過去に行われておりますが、予後を改善するに至らないことから、特定の細菌を標的とした診断・治療開発戦略のみでは限界があると考えられます (Cochrane Database Syst Rev. 2019;2019:CD000490.)

2. 研究の目的

細菌には細菌同士でシグナル伝達を行うクオラムセンシングと呼ばれる仕組みがあります。これは、細菌がある一定の密度になるとオートインデューサー (AI) と呼ばれる低分子を分泌し、自己および他の細菌にシグナル伝達を行い、バイオフィルムの形成、増殖能の活性化、抗生物質の産生などを促します。AI には標的とする遺伝子により AI-1、AI-2、自己誘導ペプチド (AIP) に分類されます。このうち AI-2 (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD) はグラム陰性菌・陽性菌にかかわらず多くの細菌で分泌され、シグナル伝達を行うことが分かっています (Front Pharmacol. 2018;9:203.)。

本研究では、この細菌独自の生理活性物質に着目して、腔内細菌叢および卵膜外子宮内細菌叢を標的とした、子宮周囲の生理活性と早産の関連について検討を行いました。特に、広範な種類の細菌が応答する AI-2 を解析対象として、妊娠継続期間を主要評価項目として、二次解析として、子宮収縮や子宮頸管長などの切迫早産を示す検査所見と母体の炎症所見、新生児の炎症所見について関連を検討しました。クオラムセンシングを中心に子宮周囲の細菌叢の「生理的」な活動に着目することにより、主に「卵膜外感染型」切迫早産とこれに起因する早産の新たな治療戦略の確立に資する基礎医学的知見の集積を目指しました。

3. 研究の方法

180 人の妊婦から採取した腔分泌物を採取しました。細菌全般で機能することが知られているオートインデューサー 2 (AI-2) の活性を測定するために、AI-2 に反応して発光することが知られている腸炎ビブリオ株 (BB-170) を用いてバイオアッセイ系を確立しました。腔分泌物を添加し、4 時間 30°C でインキュベートしたのちに、吸光度計で測定しました。子宮筋の収縮には、ヒト子宮筋細胞を単細胞培養し、AI-2 を添加することでの収縮率を継続しました。臨床病理学的因子については、個人情報との交絡を削除して、診療録より収集しました。

子宮筋収縮実験については 2 種類の *in vitro* 実験を行いました。培養細胞を用いた実験で

は、1細胞ごとに足場依存性に培養可能なプレートを用いて、生着させたヒト子宮平滑筋細胞の AI-2 負荷時の収縮率を検討しました。生体に準じた実験では妊娠ラットの子宮を用いてマグナス装置を用いて筋収縮を計測することで検討しました。

4. 研究成果

まず、本研究では測定対象とした腔内 AI-2 濃度の測定方法の確立を行いました。AI-2 は特定の腸炎ビブリオに対してシグナル伝達を行うことで発光させることが知られています。代表者は妊婦の腔分泌物中の AI-2 を限外希釈し、発光時間、測定条件を検討し、全工程約 6 時間で判定的に測定可能なプロトコルを確立しました。

次に、収集した腔分泌物 180 検体についての AI-2 濃度を測定し、臨床病理学的因子との関連を検討しました。これにより、腔分泌物中 AI-2 の濃度は分娩週数、つまり早産の発症や程度とは相関がありませんでした。また、2 次検討項目として設定した、妊娠週数、母体年齢、子宮頸管熟化度、原疾患、母体炎症反応、新生児炎症反応および短期予後についても腔分泌物中 AI-2 濃度とは相関がありませんでした。臨床病理学的因子の検討で、唯一 AI-2 濃度との有意差があるとされた項目は子宮収縮の頻度でした (図 1.)。

ヒト子宮平滑筋細胞を用いた、*in vitro* 実験では、平滑筋細胞の収縮がある一定の濃度では増強されることが示されました。これは平滑筋に対して細菌の生理活性物質が直接作用を示し、収縮が増強する作用があることを示唆する結果となりました (図 2.)。

さらに、妊娠ラットの子宮を用いて AI-2 が直接妊娠子宮の収縮に影響を及ぼすか、子宮収縮促進物質であるオキシトシンの作用を惹起することで間接的に子宮収縮に影響を及ぼすかを検討しました。この検討では仮説は証明されず、AI-2 はその濃度によってラットの子宮収縮を増強することはなく、オキシトシンの作用を賦活する効果もありませんでした。

これらの結果から、①卵膜外に局在する感染巣の細菌の活動性により早産を惹起する可能性があること、②AI のシグナル伝達物質としての特性により子宮収縮を増強させる可能性があることが示唆されました。詳細な分子メカニズム、子宮収縮を増強させる可能性の検討については今後の継続した検討が必要と考えられましたが、ヒト腔分泌物中の AI-2 の生理活性と子宮収縮の頻度については十分に関連があることは示されました。

図 1. 子宮収縮の間隔は AI-2 活性と逆相関する

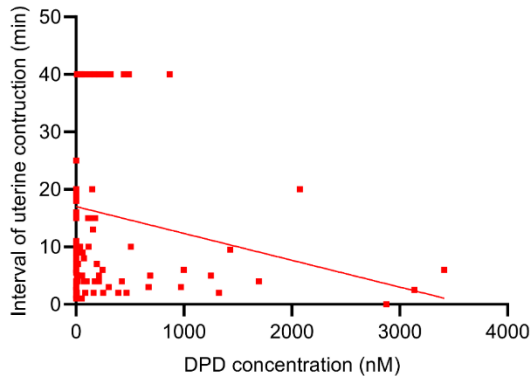
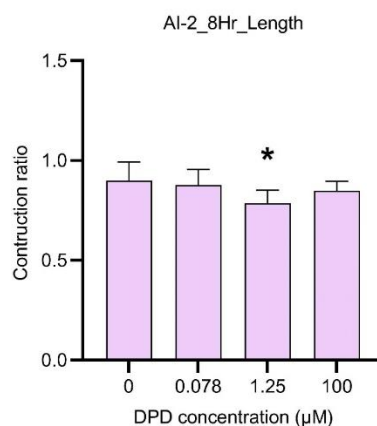


図 2. AI-2 は子宮平滑筋細胞を収縮させる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田 康平
2. 発表標題 Novel regulatory mechanism of pregnant uterine contraction associated with Quorum Sensing
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

〔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
---------	---------