

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18182

研究課題名（和文）ステロイド剤は羊膜を脆弱化しpreterm PROMのリスク因子となりうるか？

研究課題名（英文）Can glucocorticoids weaken fetal membranes and cause preterm PROM?

研究代表者

岡崎 有香（OKAZAKI, Yuka）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期・母性診療センター・医師

研究者番号：70816967

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：前期破水の要因としてglucocorticoids(GC)が羊膜を脆弱化するという仮説を検証することを目的とした。羊膜間葉系細胞の培養中にdexamethasone(DEX)を添加すると細胞間電気抵抗が低下し、透過性が亢進することが示唆された。DEXによる同細胞、及びSLE合併患者羊膜での発現変動遺伝子には細胞接着に関わるものが有意に認められ、中でも繊維化やリモデリングに関わるITGA8が増加していた。ITGA8を過剰発現すると、MMPが増加、COL1A2, 3A1が低下し、コラーゲン分解への関与が示唆された。GCは羊膜透過性を亢進し、ITGA8を介して前期破水に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLEの治療には、一般的に妊娠中であってもできるだけ少ないグルココルチコイド(GC)とともに、免疫抑制剤を主体とした治療が推奨されている。しかし実際にはGCが比較的安全と考えられていることから妊娠中の膠原病疾患の基本治療がGCとなっていることが多い。しかし本研究で、GCは羊膜の透過性を高め、卵膜微小破綻の修復を妨げることで、前期破水に寄与する可能性があることが示された。妊娠中のGC投与量を最小限とすることで前期破水のリスクを低減できる可能性があり、またGCの卵膜の脆弱性に寄与するメカニズムをさらに検討することで前期破水 リスクを減少させるための新しいアプローチの開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The association between glucocorticoids and preterm premature rupture of membranes (pPROM) has rarely been investigated.

Mechanism analysis was performed in human amnion-derived mesenchymal cells and the amnion from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. We characterized the effects of glucocorticoids through gene expression profiling and by electric cell-substrate impedance sensing. Glucocorticoid-treated human amnion mesenchymal cells showed decreased electric resistance between cells, indicating increased permeability. Differentially expressed genes upon glucocorticoid treatment were significantly enriched with cell adhesion-related genes. Among them, ITGA8 was induced in both the amnion mesenchymal cells and in amnion from patients with SLE. Our findings indicate that glucocorticoids increase amnion permeability and modulate cell-adhesion related genes. ITGA8 represents a primary molecule that triggers pPROM through preventing resealing of the rupture site in fetal amnion.

研究分野：合併症妊娠

キーワード：前期破水 SLE グルココルチコイド 羊膜 ITGA8 コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

妊娠中のグルココルチコイド投与と早産との関連については妊娠中もグルココルチコイド投与が必須な全身性エリテマトーデス(SLE)など膠原病合併妊娠等で示されてきた。しかしその機序は不明である。早産に直結する preterm premature rupture of membranes(preterm PROM)は早産の原因の約3分の1を占め、早産児は未熟性に伴う様々な合併症を高率に生じる。新生児・周産期医療の進歩に伴い、より未熟な児や重症例でも生存が可能となつてはきているが、合併症のため在宅医療や退院後の支援が必要な例は増加している。したがって preterm PROM とそれによる早産をいかに予防するかは重要な課題である。これまでに我々は、妊娠中のグルココルチコイド投与が preterm PROM と関連がみられることを明らかにした。そのメカニズムを明らかにすべく本研究を計画した。

これまでに報告されたグルココルチコイドの卵膜への作用としては、妊娠中にグルココルチコイドに曝露されるとヒト羊膜間葉系細胞層がコントロールに比較して菲薄化していた、ヒト羊膜上皮細胞における tight junction の構成成分である occludin および claudin-7 の発現を低下させたなどがある。これらの報告は、グルココルチコイドが卵膜を脆弱化させる可能性を部分的に示唆しているが、さらに決定づけるためには網羅的な遺伝子発現解析や卵膜の物理学的な検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、早産に直結する preterm PROM とグルココルチコイドに着目する。グルココルチコイドが卵膜を脆弱化するリスク因子となるのではないかという仮説を検証し、グルココルチコイドの卵膜における標的分子および作用機序を明らかとすることを目的とする。

具体的には、グルココルチコイドが羊膜に与える影響を、合併症のない妊娠由来の初代ヒト羊膜間葉系細胞: human amnion mesenchymal cells (hAMCs)にグルココルチコイドを添加することで、電気物理学的解析および網羅的遺伝子解析で評価する。また、実際の SLE 合併妊娠羊膜における遺伝子発現を合併症のない妊娠羊膜と比較する。これらの解析で得られた発現変動遺伝子から、グルココルチコイドの羊膜脆弱化に寄与する候補遺伝子を挙げ、作用メカニズムを詳細に検討する。

3. 研究の方法

合併症のない妊婦に対して妊娠38週頃に行われた選択的帝王切開症例から卵膜を採取し、hAMCsを分離・単離した。Dexamethasone(DEX)を hAMCs 培養中に添加し、electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)を用いて細胞間抵抗および、細胞の被覆面積を反映する capacitance を測定した。またマイクロアレイを用いて DEX 添加 hAMCs の発現変動遺伝子(DEGs) “cell-DEGs” を抽出した。次いで、SLE 合併妊娠羊膜とコントロールと比較した “tissue-DEGs” を抽出し、“cell-DEGs” と比較した。“tissue-DEGs” と “cell-DEGs” で重複する遺伝子のうち *ITGA8* に注目し、HeLa 細胞および hAMCs で *ITGA8* を過剰発現させ、定量的逆転写 PCR (RT-qPCR)を用いて遺伝子発現変動を確認した。

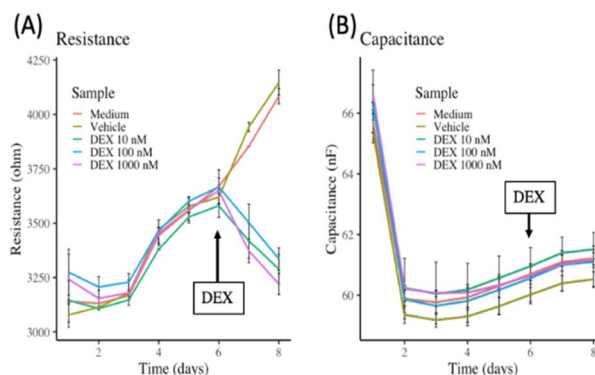
4. 研究成果

結果

1. グルココルチコイドは細胞間電気抵抗を低下させた

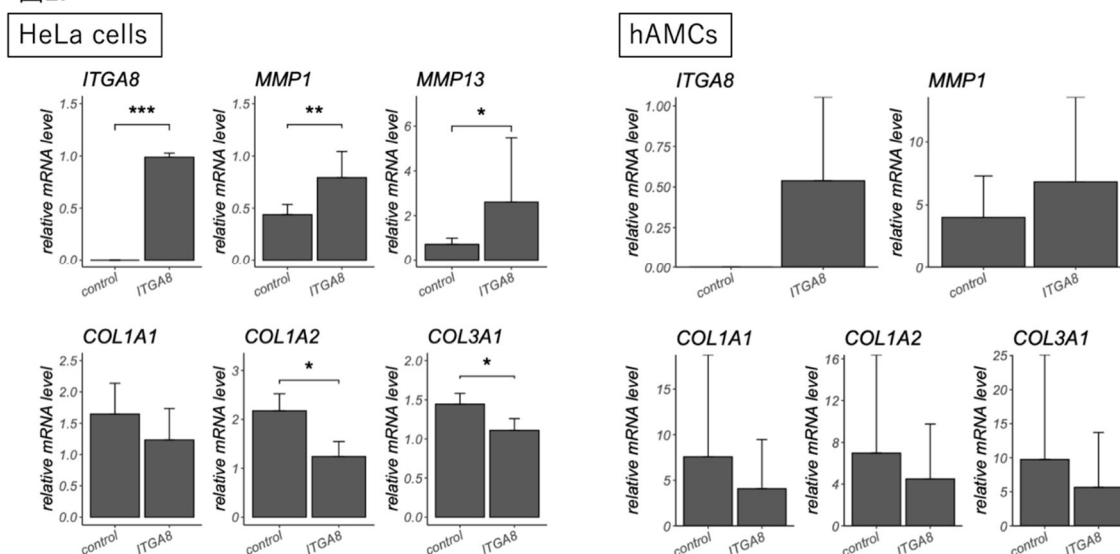
卵膜の強度を測定するために、ECISを用いて細胞間隙の密度と強度を定量化した。卵膜の強度を保っているのは羊膜で、羊膜は一層の上皮細胞および、多量のコラーゲンを含む一層の間葉系細胞からなる。間葉系細胞は羊膜の支持組織であるため、仮説を検証するために hAMCs を使用した。5つの個別電極を使用して、細胞を撒いた時(時間0)から培養8日目まで細胞をモニターした。それぞれの電極では、培養6日目に、10 nM、100 nM、または1,000 nM DEX を添加、またコントロールとしてエタノールを添加したものの、および何も添加していない培地で hAMCs を培養し細胞間抵抗を測定した。DEX を添加した hAMCs では DEX 添加以降、細胞間抵抗が低下したが、コントロールでは抵抗値が増加し続けた。一方、細胞の被覆面積を表す capacitance は、DEX 添加とコントロールで比較して有意な差を認めなかった(図1)。

図1



2. グルココルチコイドによる羊膜細胞の遺伝子発現変動
DEX 添加後 48 時間で 964 個の遺伝子発現が 2 倍以上変化しており、そのうち 543 個が発現増加、421 個が減少した。同定された DEGs で gene ontology 解析をしたところ、予想通りグルココルチコイドのよく知られた効果である「免疫反応」や「炎症反応」が高度に濃縮された。驚いたことに「細胞接着」も高度に濃縮されていた。
3. グルココルチコイドは ITGA8 発現を誘導した
“cell-DEGs” および “tissue-DEGs” はともに細胞接着関連遺伝子を多く含んでいた。DEX の転写標的をゲノムレベルで同定するために、“cell-DEGs” と “tissue-DEGs” を比較した。“cell-DEGs” と “tissue-DEGs” でオーバーラップしていた遺伝子は 36 個あり、このうち最も誘導された細胞接着関連遺伝子は 8 インテグリン鎖をコードする *ITGA8* であり、SLE 患者ではコントロールと比較して 294 倍、DEX 添加 hAMCs ではコントロールと比較して 3,104 倍増加していた。
4. ITGA8 過剰発現はコラーゲン発現を低下させた
HeLa 細胞および hAMCs で *ITGA8* を発現するプラスミドを用いて *ITGA8* を過剰発現させ、RT-qPCR によって mRNA レベルを定量した。結果、両細胞において、*MMP-1* の発現が有意に増加し、コラーゲン I 型 1、2、III 型(それぞれ *COL1A1*、*COL1A2*、*COL3A1*) レベルが低下した(図 2)。

図 2.



考察

ECIS 解析の結果はグルココルチコイドが細胞-細胞間の結合を脆弱化することを示唆した。また遺伝子発現解析の結果から、DEX 投与 hAMCs において、また SLE 合併妊娠羊膜でも発現が上昇した細胞接着関連遺伝子として *ITGA8* に注目した。*ITGA8* の機能を解明するために、HeLa 細胞および hAMCs で *ITGA8* を過剰発現させると、両細胞で、*MMP-1* が増加し、コラーゲン 型 1、2、III 型の発現が低下した。これらの結果は、hAMCs を含む細胞で *ITGA8* がコラーゲン分解に寄与することを示唆している。コラーゲンは、細胞外マトリックスの重要な構成要素であり、創傷治癒促進及び組織再生に関与することが知られている。*ITGA8* の過剰発現は、細胞外マトリックスレベルの低下や細胞外マトリックスによる足場形成の阻害とも関連しており、卵膜の微小破綻を修復しにくくしている可能性がある。合併症のない妊娠卵膜では卵膜の微小破綻が自然に修復されることは時に観察されるが、*ITGA8* レベルの上昇によって修復が困難になっている場合、pPROM の要因となる可能性がある。

本研究は、グルココルチコイド曝露が hAMCs の細胞透過性を増加させ、細胞接着関連遺伝子の発現を有意に調節することを明らかにした。さらに、グルココルチコイドの標的分子である *ITGA8* は、羊膜のコラーゲン分解を誘引し、pPROM に寄与している可能性を示した。羊膜でのグルココルチコイドの作用メカニズムをさらに検証し薬理的ターゲットを明らかにすることで、妊娠中もグルココルチコイドが必要な疾患合併妊娠における pPROM のリスクを低減することができると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Okazaki Yuka, Taniguchi Kosuke, Miyamoto Yoshitaka, Kinoshita Shiori, Nakabayashi Kazuhiko, Kaneko Kayoko, Hamada Hiromi, Satoh Toyomi, Murashima Atsuko, Hata Kenichiro	4. 巻 128
2. 論文標題 Glucocorticoids increase the risk of preterm premature rupture of membranes possibly by inducing ITGA8 gene expression in the amnion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 73 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.placenta.2022.07.012	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuka Okazaki , Kosuke Taniguchi , Yoshitaka Miyamoto , Kazuhiko Nakabayashi , Kayoko Kaneko , Hiromi Hamada , Toyomi Satoh , Atsuko Murashima , Kenichiro Hata
2. 発表標題 Glucocorticoids increase the risk of preterm premature rupture of membranes possibly by inducing ITGA8 in the amnion
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuka Okazaki
2. 発表標題 Glucocorticoids loose the cell-cell junction in amnion mesenchymal cells
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 ~ 2021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
---------	---------