

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 8日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592118

研究課題名（和文） 生殖・周産期医療における内分泌・免疫ストレス要因の影響の解析

研究課題名（英文） The effects of endocrine and immunological factors in reproductive medicine

研究代表者

下屋 浩一郎 (SHIMOYA KOICHIRO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40291950

研究成果の概要（和文）：免疫抑制因子が妊娠中の様々な病態に関連し、酸化ストレスが子宮筋収縮に直接関与し、早産の要因となった。Fractalkine や 6Ckine が、早産や子宮内感染の病態に関与し、子宮内感染においてリンパ球・NK 細胞・樹状細胞にも影響を及ぼし、これら免疫系細胞システム・ストレスの変化による妊娠への影響の可能性が示唆され、これら免疫担当細胞をターゲットとした治療戦略の可能性が示された。母体ストレス定量化に関する検討から着床期の女性のストレスレベルが着床成功率と関連し、妊娠中のストレスレベルの推移が母体の抑うつ状態と関連しており、妊娠前からの女性のストレス軽減が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Various immunosuppressive factors, such as RCAS1 were associated with neonatal complications, such as preterm birth and preeclampsia. Products of oxidative stress, such as HNE had direct effects on uterine contraction. Cytokines, such as fractalkine and 6Ckine were associated with preterm birth and chorioamnionitis. These results suggested that lymphocytes, NK cells and dendritic cells were activated in chorioamnionitis. Maternal stress was associated with implantation success rate. The titration of salivary cortisol concentrations and chromogranin A/protein levels is a useful tool to determine maternal stress levels. The elevation of cortisol and chromogranin A/protein in the saliva was suppressed in the chronic high stress group during pregnancy. Maternal health without stress was important for pregnant women.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：産婦人科学・周産期学

キーワード：早産、子宮内感染、fractalkine、6Ckine、酸化ストレス、母体ストレス、着床

1. 研究開始当初の背景

受精・着床から分娩に至るまでの過程においては喫煙、低酸素、酸化ストレス、内分泌ストレスなどの様々なストレス要因が母体に加わり、その破綻によって着床障害、流産、早産、妊娠高血圧症候群などの様々な産科異常を引き起こす。周産期医療の進歩によって低出生体重児の救命率や予後は改善されているが、依然としてこれら産科異常（流早産や妊娠高血圧症候群合併妊娠）における周産期予後や母体予後には一層の改善の余地が残されている。妊娠の成立過程から分娩に至るまで胎児成分である絨毛組織と母体組織である脱落膜・子宮筋層との連関が妊娠の維持にとって重要である。様々な疾病における病態に酸化ストレスおよびその防御系、免疫制御系、内分泌ストレス要因が深く関わっており、妊娠においてもその関与機構が明らかとなりつつある。

絨毛組織や脱落膜組織における過剰な酸化ストレスやその消去系・防御系の破綻が流早産や妊娠高血圧症候群などの病態形成に関与していることが明らかとなりつつあり、その病態の解析を行う。我々は、酸化ストレス蛋白が様々な病態でヒト妊娠組織において変化し、それが生理学的活性を有して早産の要因となること、サイトカインネットワークが妊娠中定常状態を保ち、そのバランスが早産などの妊娠合併症で崩れることが児の病態に大きく関与することを明らかとしてきた。神経保護作用を有するS100蛋白が、妊娠中のヒト卵膜組織に発現し、妊娠後半期には定常的に羊水、臍帯血、母体血中に存在することを明らかとし、羊水中S100濃度が妊娠高血圧症候群の際に上昇し、病態形成と関連することを解明した。さらに胎盤・母体側で生じた酸化ストレス・免疫制御機構の破綻が、児の発達にも影響を及ぼすことを動物実験のレベルで明らかとしてきた。こうした酸化ストレスや免疫制御因子による産科異常に対する病態を詳細に解明することは流産、早産、妊娠高血圧症候群などの予防、治療に直結する研究であり、更なる解析が重要である。一方、こうした妊娠における母児間の接点

である局所における産科ストレス、免疫応答などが妊娠中の異常に関与するとともに子宮内の環境に対して母体のライフスタイルに伴う精神的ストレス、内分泌ストレス要因が病態の発生に寄与する可能性が示唆されている。従来、こうしたストレスの客観的評価は困難であったが、内分泌マーカーを測定する系を用いて客観的に評価することが可能となった。我々は、母体のストレス状態を示す指標として非侵襲的な唾液中のストレスマーカーの測定法を確立させ、妊婦のカフェイン摂取に伴うストレス量の変化が非妊娠時と異なることを明らかとした。さらに予備的検討であるが、妊娠中の唾液中ストレスマーカーの経時的変化を明らかとし、母体の抑うつ指標との関連について明らかとした。さらに、Nepomnaschyらによって妊娠ごく初期の流産が母体のストレスと関連する可能性が示され、早産や妊娠高血圧症候群の発症にも母体のライフスタイルを含めたストレス要因が関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

妊娠中において胎児は母体内において羊水、絨毛膜、脱落膜、子宮筋により定常状態にあり、一定レベルまでの酸化ストレスや低酸素などのストレスに対しては障害から免れる。胎盤・脱落膜における酸化ストレス・制御系および免疫系機能不全になると流産・早産や様々な妊娠中の合併症を引き起こすことが推測され、その病態解明と治療・予防のためには臨床領域と研究モデルを用いた解析を行う必要がある。我々のこれまでに蓄積した情報と資料を用いて妊娠異常における胎盤・脱落膜酸化ストレス制御系・免疫制御システムの機能解析を行い、さらに臨床的に蓄積される母体ストレス指標と妊娠中の病態との関連について実際の臨床領域で確認し、検討することが可能である。本研究において流早産や妊娠高血圧症候群などの産科合併症において胎盤・脱落膜などの母児接点においてこれらの病態に関与する酸化ストレス関連因子および免疫制御因子を見

出す。さらに、妊娠中の母体ストレス指標を客観的に臨床の現場で評価する。妊娠中の病態と母体ストレス指標との関連についてまず、着床時期のストレス量と流産との関連について解析する。さらに、長期的フォローを行い、早産、妊娠高血圧症候群との関連について検討し、妊娠異常を防止するストレスから見た理想の環境（ライフスタイル）を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 検体採取

川崎医科大学産婦人科及び関連施設において患者同意のもと妊娠初期から後期にかけての全分娩（流産・人工妊娠中絶を含む）の胎盤、卵膜組織および母体血、臍帯血（可能な症例のみ）、羊水（可能な症例のみ）を採取し、保存する。卵膜、胎盤から蛋白および mRNA を回収する。また一部組織を免疫組織染色および *in site hybridization* に供する目的で保存し、患者の周産期事象に関して保存し、以後の解析に用いる。母体ストレス量の定量化と妊娠異常との関連を検討するため妊娠初期（妊娠 8～12 週）、中期（妊娠 20～25 週）、後期（妊娠 32～35 週）における唾液を専用キットであるサリペットを用いて採取保存する。母体の健康指標および抑うつ指標を SDS と GHQ-28 によるアンケートによって測定する。

(2) サイトカイン濃度測定

(1)において得られたサンプルで、RCAS1、Fractalkine、6CKine の濃度について ELISA にて測定し、妊娠中の経時的変化と産科合併症によるこれら因子の変動について解析する。

(3) Western blot 解析および免疫染色

(2)において得られた結果を基に妊娠組織における発現を確認した。

(4) 着床時期における母体ストレス定量と流産との関連についての検討

不妊専門クリニックを受診している体外受精・胚移植症例を対象に体外受精・胚移植サイクルにおける採卵以後、連続的に唾液を専用キットであるサリペットを用いて採取

保存する。母体の健康指標および抑うつ指標を SDS と GHQ-28 によるアンケートによって測定する。唾液中のストレスマーカーとしてコルチゾールとクロモグアニン A を ELISA 法を用いて測定する。唾液中のストレス指標、母体健康指標、抑うつ指標と体外受精・胚移植サイクルにおける流産との関連を検討する。

(5) 妊娠中の異常による発現の差異の検討

上記結果に関して妊娠中の異常との関連に関して検討した。

(6) 母体ストレス指標と産科異常との関連に関する検討

継続的に採取した唾液サンプル中のストレスマーカーとしてコルチゾールとクロモグアニン A を ELISA 法を用いて測定する。唾液中のストレス指標、母体健康指標、抑うつ指標と流産、早産、妊娠高血圧症候群などの産科異常における流産との関連を検討する。

4. 研究成果

分娩時の胎盤、卵膜組織および母体血、臍帯血等の臨床検体を用いた解析により免疫抑制因子である RCAS1 が、妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病などの妊娠中の様々な病態に関連していることを明らかとし、RCAS1 分子が将来的に治療ターゲットとなる可能性を示した。また、酸化ストレス産生物である 4-HNE が、子宮筋層に直接作用して早産に関与することを明らかとした。さらに、妊娠中の母体ストレス定量化を行い、妊娠中の推移を明らかとし、母体の抑鬱状態によってストレス反応がむしろ抑制化されることを明らかとした。一方、慢性炎症などに関与する Fractalkine の妊娠中の動態を解析し、臍帯血 Fractalkine は母体血に比べて有意に高値で絨毛膜羊膜炎合併症例では臍帯血清 Fractalkine は高値を示し、早産症例では母体血清 Fractalkine は高値を示した。胎盤及び卵膜において FRK 及びその受容体蛋白の発現を確認した。さらに生殖領域において体外受精胚移植の際の卵胞液を採取保存し、卵の質と卵胞液中 FRK 濃度との関連解析を行った。卵胞液中に FRK 蛋白の存在を確認したが、妊娠成立群、妊娠不成立群、科学流産

群では、卵胞液中及び血清中の Fractalkine 値は三群間で有意差を認めなかった。一方、単球や好中球に対する遊走・活性化作用を有さず、リンパ球・NK 細胞・樹状細胞に対してのみ遊走・活性化作用を有する因子である 6Ckine について周産期領域における病態とくに早産・子宮内感染への関与について検討した結果、胎盤組織・卵膜に 6 Ckine の発現が認められ、母体血中に比して臍帯血中で高濃度であった。胎盤感染を伴う場合、母体血中で高値を示し、また早産でも同様の傾向であったが、臍帯血中ではこうした変化は確認できなかった。また、胎盤組織における 6 Ckine 蛋白の発現も感染および早産において増加する傾向が認められた。6 Ckine も感染および早産において他のサイトカイン同様に産生が増加し、母体血中にそれが反映されていた。このことは、子宮内感染において好中球・マクロファージ系のみならず、リンパ球・NK 細胞・樹状細胞にも影響を及ぼし、これら免疫系細胞システム・ストレスの変化による妊娠への影響の可能性が示唆され、これら免疫担当細胞をターゲットとした治療戦略の可能性が示された。

また、着床期の女性のストレスレベルが着床成功率と相関することおよび妊娠中のストレスレベルの推移が母体の抑うつ状態と関連することを明らかとした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Effects of 4-Hydroxy-2-Nonenal, a Major Lipid Peroxidation-Derived Aldehyde, and N-Acetylcysteine on the Cyclooxygenase-2 Expression in Human Uterine Myometrium. K Temma-Asano, Shimoya K et al. Gynecol Obstet Invest 72(1); 37-42 2011 (査読あり)
- ② Change of the salivary stress marker concentrations during pregnancy :Maternal depressive status suppress the changes of those levels. H Tsubouchi, Shimoya K et al., 37(8); 1004-9 2011 (査読あり)
- ③ The effect of tumor-associated protein RCAS1 gene silencing on blood

pressure and urinary protein excretion in pregnant mouse: a pilot study. Tskitishvili E, Shimoya K et al., Am J Obstet Gynecol. 203(4): 364.e6-12 2010 (査読あり)

- ④ Maternal blood serum and plasma human tumor-associated antigen RCAS1 during the course of uncomplicated pregnancies: a prospective study. Tskitishvili E, Shimoya K et al., Am J Reprod Immunol 64(3):218-32 2010 (査読あり)
- ⑤ Human C-reactive protein enhances vulnerability of immature rats to hypoxic-ischemic brain damage: a preliminary study. Kinugasa-Taniguchi Y, Shimoya K et al., Reprod Sci 17(5):419-25 2010 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 科学的な視点から分娩の生理と病理を探る子宮収縮の生理と病理 下屋浩一郎 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 23 年 8 月 31 日 大阪
- ② 母体ならびに胎児における Fractalkine/CX3CL1 (FRK) の動態の解析 張良実 他 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 23 年 8 月 29 日 大阪
- ③ 周産期領域における Fractalkine/CX3CL1 の動態の解析 張良実 他 第 47 回日本周産期・新生児医学会 平成 23 年 7 月 11 日 札幌

[図書] (計 1 件)

- ① 産婦人科レビュー 生殖医療 内科疾患と生殖 下屋浩一郎 鎌谷書店 2011 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下屋 浩一郎 (SHIMOYA KOICHIRO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：40291950

(2) 研究分担者

中村 隆文 (NAKAMURA TAKAFUMI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：20303969

中井祐一郎 (NAKAI YUICHIRO)

川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50271193

福家 信二 (FUKE SHINJI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：50333696

郭 翔志 (KAKU SHOJI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：50464178

潮田 至央 (USHIODA NORICHIKA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：40454821

張 良実 (CHANG YANG-SIL)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：70565910