

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659779

研究課題名(和文) In vitro 盤構築モデルの作成とそれによる胎盤剥離の分子機構の網羅的解析

研究課題名(英文) The molecular analysis of placental abruption using in vitro placental model

研究代表者

木村 正 (Kimura, Tadashi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90240845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：常位胎盤早期剥離(早剥)がなぜ発生するのかの解明を行い新たな分子標的を発見する事を目的とした。その代表的な原因に前期破水・子宮内感染が考えられている。そこで絨毛羊膜炎を認めた胎盤検体を用いて様々なサイトカインの発現を検討しインターロイキン6(以下IL-6)が絨毛膜細胞及び絨毛内の間質で強く発現している事を解明した。早剥の実験モデルマウスにおいてIL-6受容体抗体治療が胎盤剥離を抑制する可能性を提示した。つまり前期破水に伴う子宮内感染が羊膜細胞よりのサイトカイン産生を通じて子宮収縮を促し早剥にいたる可能性がある事、IL-6に焦点をあてた分子治療はそれを抑制する可能性がある事を証明した。

研究成果の概要(英文)：Intrauterine infection is a key trigger of placental abruption. In order to analyze the potential role of inflammatory cytokines in this pathogenesis, we examined the expressional pattern of various cytokines in placentae complicated with severe chorioamnionitis (CAM) and found that IL-6 is mainly expressed in macrophages in villous mesenchyme. Using an experimental lipopolysaccharide (LPS)-induced PTD model, the therapeutic potential of targeting this cytokine was investigated. Anti-IL-6 receptor antibody (MR16-1) was delivered before LPS treatment. Mice in the MR16-1 group had a significantly lower rate of PTD (17%) than 53% in the controls. As a result, MR16-1 treatment significantly prolonged the gestational period without any apparent adverse events on the mice and their pups. Thus, targeting IL-6 signaling can be a promising option for the prevention of placental abruption and needs to be further explored for future clinical application.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：常位胎盤早期剥離 前期破水 インターロイキン プロスタグランジン 絨毛羊膜炎

1. 研究開始当初の背景

常位胎盤早期剥離(早剥と略)は約1%の妊産婦に突然に発症し、母児共に生命の危険を及ぼす緊急疾患である。周産期に大出血を来す疾患の中でも、極めて重症化しやすく、現在でも早剥は推定母体死亡原因の上位を占める。従来、早剥は妊娠高血圧腎症による血管変化が主要原因と考える説が有力で、事実、同疾患では早剥が高頻度に認められる。しかし近年の多くの検討では、非妊娠高血圧腎症性早剥が著しく増加しており、全早剥例中の2/3~3/4を占め、その原因の多くが不明のままである。そもそも正常分娩において、児娩出後、胎盤は速やかに自然娩出されるが、この“生理的な現象”のメカニズムも解明されていない。Ananth等は、感染や喫煙などによる酸化ストレスが脱落膜内のマクロファージを誘導する。そのマクロファージがサイトカインやMMP等の蛋白分解酵素を分泌して、脱落膜細胞のアポトーシスを誘導し、早剥にいたるとの説を提唱している(Obstet. Gynecol. 2006;107:785-92)。しかしながら、これは、早剥症例でMMP9などの発現や脱落膜細胞のアポトーシスが見られることなどの傍証に基づいており、直接的な証明はなされていない。また、正常分娩で胎盤が自然剥離することはこの説では説明がつかない。

2. 研究の目的

そこで、本研究においては、妊娠36週未満の前期破水症例の約10%に早剥が発症することに着目した。前期破水では膈からの逆行性感染が羊膜などで起こり、そこで羊膜細胞からサイトカインが分泌され、マクロファージなどの炎症性細胞の誘導し、炎症性細胞がマトリックス分解酵素などを分泌され、それが早剥の要因になっているものと推定される。そこで、妊娠早期に絨毛羊膜炎を起こした症例の胎盤における感染やそれに伴うサイトカインの分泌パターンを解析し、さらにそのサイトカイン分泌を制御できないか検討を行うことにした。

3. 研究の方法

大阪府立母子医療センター病理診断科中山雅弘先生との共同研究で、同センターで絨毛膜羊膜炎(CAM)III度と診断された臨床胎盤検体を用いて各種炎症性サイトカインの局在を免疫組織化学染色で検討した。

上記の検討結果に基づいて、本研究では、IL-6に着目した。CAMと診断された10症例および非感染性の早産7症例の胎盤を用いて、IL-6およびマクロファージのマーカであるCD68の免疫組織化学染色を行い発現の比較検討を行った。続いて、感染性早産モデルマウスを用いた検討を行った。C3H/HeN雌マウスと

B6D2F1雄マウスを掛け合わせると、低用量の大腸菌成分であるリポ多糖投与により胎盤が剥離して早産が誘発される実験系が存在する。この実験系を用いて、マウスに抗IL-6受容体抗体であるMR16-1を投与し、早産抑制効果を検討した。

IL-6の作用点を検討するべく、帝王切開時に無菌的に羊膜を採取し、羊膜上皮細胞および間質細胞の初代培養を行い、IL-6および可溶性IL-6受容体(sIL-6R)を添加して、プロスタグランジンE2の発現を検討した。

4. 研究成果

図1に絨毛羊膜炎胎盤における各種サイトカインの免疫組織染色像を示す。トロホプラストに一致してTNF- α 、絨毛間質にTGF- β およびIL-1 β の発現を、マクロファージおよび羊膜間質細胞に一致してインターロイキン6(IL-6)の強発現を認めた。IL-8の発現は羊膜下に好中球の浸潤像として認めた。

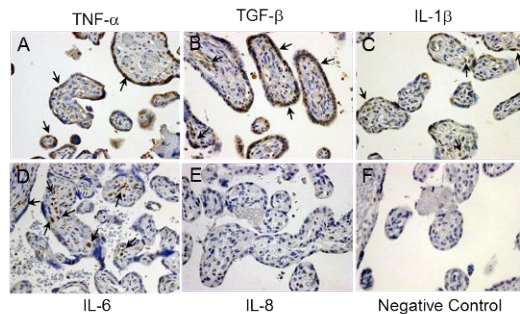


図1 絨毛羊膜炎胎盤における各サイトカインの発現 A; TNF- α , B; TGF- β , C; IL-1 β , D; IL-6, E; IL-8, F; Negative control (x400).

続いて、代表的な炎症性サイトカインであるIL-6に着目した。まず、10例の絨毛羊膜炎胎盤をIL-6で免疫染色した。図2に示したように全例において、絨毛膜間質内の細胞が強く染色された。

この間質内の細胞は形態的に多くはマクロファージではないかと考えられたため、引き続き、IL-6を茶色に、マクロファージをマーカーであるCD68を抗原にして、緑色に二重染色にその局在を検討した。結果を図3に示す。

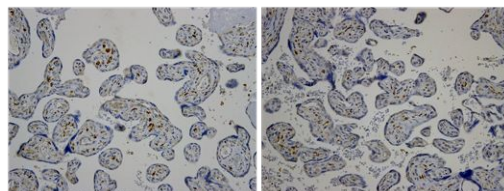


図2 絨毛羊膜炎胎盤におけるIL-6の発現 絨毛膜間質に強発現を認めた。

IL-6 を分泌するマクロファージは絨毛羊膜炎症例に多く認められた。そこで、さらに絨毛羊膜炎と診断された 10 症例および非感染

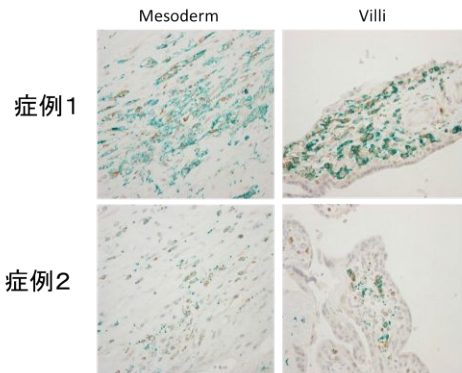


図3 絨毛羊膜炎胎盤における IL-6 (茶色)と CD-68 (緑色)の発現。マクロファージの多くは IL-6 を産生していた。

性の早産 7 症例の胎盤を用いて、IL-6 およびマクロファージのマーカーである CD68 の免疫組織化学染色を行い発現細胞数の比較検討を行った。

図 4 に示した通り、絨毛羊膜炎細胞において、羊膜間質内にマクロファージ数は有意に多く、かつ IL-6 産生細胞の割合が多かった。

	CAM (n=10)	Control (n=7)
Total CD68 ⁺ cells / field	99 ± 26 *	60 ± 18
IL-6 ⁺ cells (%)	88 ± 22 (88%) **	30 ± 13 (48%)

図4 絨毛羊膜炎 (CAM 胎盤 10例)と非感染性早産 (Control 胎盤 7例)における 200 倍1視野におけるマクロファージ数 (CD68) とマクロファージにおける IL-6 産生細胞の割合。

即ち、感染性早産症例においては、絨毛間質に存在するマクロファージより、IL-6 が強力に産生されていることが判明した。そこで、IL-6 分泌抑制により、早産、早剥が予防できるかを以下の動物実験で検討することにした。

C3H/HeN 雌マウスと B6D2F1 雄マウスを掛け合わせた妊娠マウスにリポ多糖 (LPS) を投与して、早産させる実験系を用いた。その実験プロトコルを図 5 に示す。抗 IL-6 受容体抗体 MR16 - 1 (中外製薬より提供) を LPS

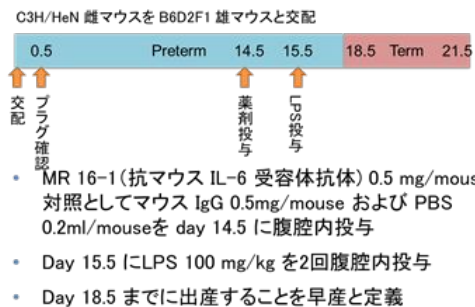


図5 感染性早産モデルマウス実験のプロトコル

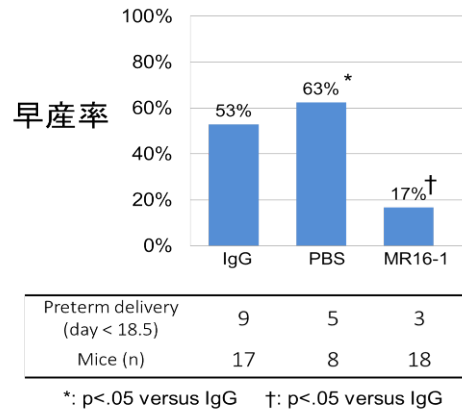


図6 抗IL-6 受容体抗体は早産を減少させる

投与前に投与することにより、早産、胎盤剥離が予防できるかの検討を行った。結果を図 6 に示す。

LPS 単独投与では、63% (8 匹中 5 匹) に早産を認めた。それに対して、Control IgG 単独では早産の抑止効果はなかったが、MR16-1 の事前投与により、早産率は 17% (18 匹中 3 匹) と有意に抑制された。即ち、IL-6 を標的とするサイトカイン治療が早産率を抑制する可能性が示唆された。

IL-6 を標的とする抗サイトカイン治療がヒトに対しても、有効であるかどうかを検討するべく、帝王切開時に無菌的に羊膜を採取し、羊膜上皮細胞および間質細胞の初代培養を行い、IL-6 および可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) を添加して、子宮収縮に重要なプロスタグランジン E2 の発現を検討した。図 7 に採取した羊膜上皮細胞の形態写真を示

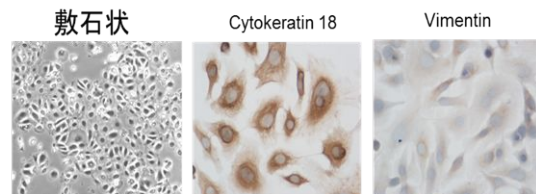


図7 採取した羊膜上皮細胞

す。帝王切開時に無菌的に羊膜を回収し、トリプシン処理で上皮細胞のみを回収した。上皮細胞は敷石状の形態をしており、Cytokeratin 陽性で上皮としての性質を保っていた。この細胞に IL-6 および sIL-6R を同時添加したところ、羊膜上皮細胞では、アラキドン酸代謝経路の重要酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) の発現が増加し、培養上清中のプロスタグランジン E2 の上昇を確認した。早剥がおこった際には必ず強い子宮収縮を伴っており、子宮において多量のプロスタグランジンが分泌されていると考えられる。即ち、子宮内感染に伴い、絨毛や脱落膜などで IL-6 が産生され、それが羊膜細胞におけるプロスタグランジン E2 の産生につながっていることとの仮説を検証するに至った。さらにこれらの分泌亢進は抗 IL-6

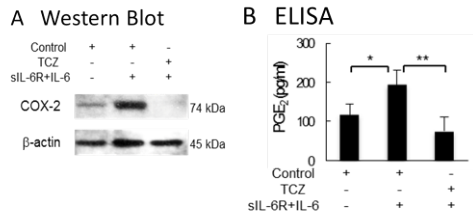


図8 羊膜上皮細胞はIL-6 刺激に伴い、COX-2 を産生し、PGE2 を分泌する。

受容体抗体の投与により抑制することができた。即ち、IL-6 を標的とした抗サイトカイン治療が感染に伴う強力な子宮収縮を抑制することを証明した。即ち、感染に伴い一定の割合で発生する胎盤早期剥離の予防戦略の一つの可能性を提示することができた。

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 1 件)

Targeting interleukin-6 receptor inhibits preterm delivery induced by inflammation
Wakabayashi, A. Sawada, K. Nakayama, M. Toda, A. Kimoto, A. Mabuchi, S. Kinose, Y. Nakamura, K. Takahashi, K. Kurachi, H. Kimura, T.
Mol Hum Reprod 19:718-726, 2013.

[学会発表] (計 2 件)

卵巣癌組織におけるインターロイキン 6(IL-6)とその受容体の発現が予後に与える影響の解析
磯部 晶. 澤田健二郎. 小倉寛則. 木瀬康人. 川島英理子. 牧野 弘. 水野智子. 木村 正. 森重健一郎.
第 65 回日本産科婦人科学会 5.10-12/13 札幌

感染性早産に対する IL 6 に焦点を当てた分子標的治療の可能性の検討
澤田健二郎.
第 21 回日本胎盤学会 10.25-26/13 名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :
〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者 木村 正
(Kimura Tadashi)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 90240845

(2)研究分担者 澤田 健二郎
(Sawada Kenjiro)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号 : 00452392

研究分担者 馬淵 誠士
(Mabuchi Seiji)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 00452441

研究分担者 磯部 晶
(Isobe Aki)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 60397619

研究分担者 橋本 香映
(Hashimoto Kae)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 90612078

(3)連携研究者
()

研究者番号 :