

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591609

研究課題名(和文) 早産・胎児炎症に関わるウレアプラズマ由来リポペプチドの解析とDNAワクチン開発

研究課題名(英文) Immunological effects of *Ureaplasma parvum* on pregnancy outcome in mice.

研究代表者

柳原 格 (Itaru, Yanagihara)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：60314415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マイコプラズマ科のウレアプラズマ属細菌は、病理学的にはヒト胎盤における絨毛膜羊膜炎を引き起こし、流早産の原因となる。ウレアプラズマから精製したMBAタンパク質およびそのN末端合成リポペプチドは、*in vitro*においてTLR2依存的にNF- κ Bシグナルカスケードを活性化し、また*in vivo*では妊娠マウスの流早産を引き起こした。これらのことからMBAは流早産の病原因子であることが示された。また、感染性流産を経験した日本人母体由来のウレアプラズマの全ゲノム配列を決定し、MBA以外の病原因子探索、ワクチン候補分子探索のための基盤となる情報を得た。

研究成果の概要(英文)：Ureaplasma spp. are members of the family Mycoplasmataceae and have been considered to be associated with chorioamnionitis and preterm delivery. We purified multiple-banded antigen (MBA) from *U. parvum*, and synthesized N-terminal diacylated lipopeptide of MBA, UPM-1. Using luciferase assays, both purified MBA and UPM-1 activated the NF- κ B pathway via TLR2 *in vitro*. The intrauterine MBA injection on day 15 of gestation on pregnant C3H/HeN mice group had a significantly higher incidence of intrauterine fetal death (IUFD; 38.5%). Intrauterine injection of UPM-1 caused preterm deliveries (80.0%). The placenta of the UPM-1 injection group showed neutrophil infiltration. We also reported the complete genome sequence of *Ureaplasma parvum* serovar 3, clinical strain SV3F4, isolated from a Japanese patient with a history of an infectious abortion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：早産 周産期感染症 ウレアプラズマ 病原因子 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

早産率は年々上昇しており、我が国ではおよそ 5.8% である。年間およそ 6 万人が早産で出生している。さて、早産には時に重篤で非可逆的な呼吸器、神経系、消化器等の合併症がおり、周産期医療最大の課題となっている。早産の主な原因には細菌感染があり、これまで起因微生物として、大腸菌、連鎖球菌、ガードネレラ、モビルンカスなどが報告されている。諸外国では早産のおよそ半数が細菌による胎内感染とされている。従来、我が国では原因細菌が同定されることが少なかったが、早産胎盤における病理診断で絨毛膜羊膜炎が高頻度に認められ、臍帯血 IgM も高値であることから、感染症が主な早産の原因であると考えられてきた。そこで我々は、マイコプラズマ科ウレアプラズマに着目し研究を行ってきた。マイコプラズマ科の細菌は最小の生物で、中でもウレアプラズマは小型で直径がおよそ 100 nm 程度である。一般成人男女の泌尿生殖器系にも存在することから、病原性についてははっきりしていなかった。そこで、胎盤の児側の擦過スワブからウレアプラズマを検出したところ、当センターの流早産検体の 42% からウレアプラズマが検出された(Namba F, 2010)。

病原因子については、Li YH. (2001) は、ウレアプラズマの外膜タンパク質 MBA が炎症性サイトカインの発現を誘発することを示したが、一方 Menon R. (2009) は加熱後死菌では炎症反応が惹起されなかったと報告している。このように相反する論文が発表されてきたこともあり、ウレアプラズマの病原性については議論のあるところで、我が国の周産期医療現場でもあまり注目されてこなかった。

2. 研究の目的

本課題では、ウレアプラズマが流早産起因微生物であるのか否かを明らかにすることを目的とした。その病原性について、(1) 単純に物理的物質大きさという観点からマウス胎盤機能障害について解析を行った。次に、(2) ウレアプラズマのリポ蛋白質の免疫惹起機構と妊娠マウスへの影響について知見を得た。さらに、(3) 我が国におけるウレアプラズマ臨床分離株の全ゲノム配列を決定し、将来のワクチン候補分子の選択の基礎を構築した。

3. 研究の方法

(1) 我が国はナノ素材生産大国である。ウレアプラズマ大など種々の大きさのナノシリカを妊娠マウスに投与し、特異的に胎盤に集積するか否か解析した。さらに、その後の胎子の発育や胎盤病理変化を調べた。
(2) マイコプラズマ科のリポ蛋白質はジア

シル化されることが知られている。精製したウレアプラズマの主要なリポ蛋白質 MBA 及び、合成した MBA の N 末端 22 アミノ酸残基をジアシル化したりポペプチド (UPM-1) を用い、妊娠マウスへの子宮内に投与による影響について解析を行った。

(3) 我が国で分離されたウレアプラズマ臨床分離 UpSV3F4 株からゲノムを抽出し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列のアセンブリを行った。

4. 研究成果

(1) 妊娠マウス胎盤には、ウレアプラズマ大のナノシリカのみが集積し、胎子は子宮内発育制限を受け、あるいは胎内死亡した。これらの結果は、医薬品、食品等急速に市場に出回るナノ素材の危険性について警鐘を鳴らすこととなり、社会的にも反響を呼んだ (Yamashita K, 2011)。

(2) MBA あるいは UPM-1 はマウス腹腔マクロファージにおいて *in vitro* で炎症性サイトカインの発現を優位に上昇させた。また妊娠マウスへの投与により、早産や流産を引き起こした (Uchida K, 2013)。

(3) UpSV3F4 ゲノムは 727,289 bp よりなる環状 DNA であった。ウレアプラズマゲノムとしては最小で、退行進化を遂げているマイコプラズマ科の新たな適応と考えられた (Wu HN, 2014)。

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 22 件)

- 1: Wu HN, Nakura Y, Motooka D, Nakamura S, Nishiumi F, Ishino S, Kawai Y, Tanaka T, Takeuchi M, Nakayama M, Fujita T, Yanagihara I. Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* Serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan. *Genome Announc.* 2014 ;2(3). doi: 10.1128/genomeA.00256-14. 査読有
- 2: Uchida K, Nakahira K, Mimura K, Shimizu T, De Seta F, Wakimoto T, Kawai Y, Nomiyama M, Kuwano K, Guaschino S, Yanagihara I. Effects of *Ureaplasma parvum* lipoprotein multiple-banded antigen on pregnancy outcome in mice. *J Reprod Immunol.* 2013;100(2):118-27. doi: 10.1016/j.jri.2013.10.001. 査読有
- 3: Nakahira K, Morita A, Kim NS, Yanagihara I. Phosphorylation of FOXp3 by LCK downregulates MMP9 expression and represses cell invasion. *PLoS One.* 2013 ;8(10):e77099. doi: 10.1371/journal.pone.0077099. 査読有

- 4: Hamaguchi M, Kamikubo H, Suzuki KN, Hagihara Y, Yanagihara I, Sakata I, Kataoka M, Hamada D. Structural basis of -catenin recognition by EspB from enterohaemorrhagic *E. coli* based on hybrid strategy using low-resolution structural and protein dissection. *PLoS One*. 2013 ;8(8):e71618. doi:10.1371/journal.pone.0071618. 査読有
- 5: Morita A, Nakahira K, Hasegawa T, Uchida K, Taniguchi Y, Takeda S, Toyoda A, Sakaki Y, Shimada A, Takeda H, Yanagihara I. Establishment and characterization of Roberts syndrome and SC phocomelia model medaka (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ*. 2012;54(5):588-604. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01362.x. 査読有
- 6: Sakamoto S, Wakae K, Anzai Y, Murai K, Tamaki N, Miyazaki M, Miyazaki K, Romanow WJ, Ikawa T, Kitamura D, Yanagihara I, Minato N, Murre C, Agata Y. E2A and CBP/p300 act in synergy to promote chromatin accessibility of the immunoglobulin locus. *J Immunol*. 2012;188(11):5547-60. doi:10.4049/jimmunol.1002346. 査読有
- 7: Shigeta N, Ozaki K, Hori K, Ito K, Nakayama M, Nakahira K, Yanagihara I. An *Arthrobacter* spp. bacteremia leading to fetal death and maternal disseminated intravascular coagulation. *Fetal Pediatr Pathol*. 2013;31(1):25-31. doi:10.3109/15513815.2012.659413. 査読有
- 8: Namba F, Ina S, Kitajima H, Yoshio H, Mimura K, Saito S, Yanagihara I. Annexin A2 in amniotic fluid: correlation with histological chorioamnionitis, preterm premature rupture of membranes, and subsequent preterm delivery. *J Obstet Gynaecol Res*. 2012 Jan;38(1):137-44. doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01651.x. 査読有
- 9: Mitobe J, Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Ohnishi M, Ishihama A, Watanabe H. RodZ regulates the post-transcriptional processing of the *Shigella sonnei* type III secretion system. *EMBO Rep*. 2011;12(9):911-6. doi: 10.1038/embor.2011.132. 査読有
- 10: Mimura K, Tomimatsu T, Minato K, Jugder O, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Nozaki M, Yanagihara I, Kimura T. Ceftriaxone preconditioning confers neuroprotection in neonatal rats through glutamate transporter 1 upregulation. *Reprod Sci*. 2011;18(12):1193-201. doi: 10.1177/1933719111410710. 査読有
- 11: Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Yanagihara I, Saito S, Tsutsumi Y. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(5):321-8. doi: 10.1038/nnano.2011.41. 査読有
- 12: Nozaki M, Wakae K, Tamaki N, Sakamoto S, Ohnishi K, Uejima T, Minato N, Yanagihara I, Agata Y. Regulation of TCR V 2 gene rearrangement by the helix-loop-helix protein, E2A. *Int Immunol*. 2011;23(5):297-305. doi:10.1093/intimm/dxr005. 査読有
- 13: Ohnishi K, Nakahira K, Unzai S, Mayanagi K, Hashimoto H, Shiraki K, Honda T, Yanagihara I. Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 May;318(1):10-7. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02233.x. 査読有
- 14: Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kato T, Pryor-Koishi K, Nakanishi I, Fujita T, Imayoshi Y, Markoff A, Yanagihara I, Udagawa Y, Kurahashi H. Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*. 2011;17(7):447-52. doi: 10.1093/molehr/gar008. 査読有
- 〔学会発表〕(計 43 件)
1. 西海史子、柳原格. 「Ureaplasma parvum の細胞内動態解析」、第 40 回日本マイコプラズマ学会学術集会、秋葉原、2013.5.23-24
- 2: 名倉由起子、河合泰宏、萬野和、藤田富雄、呉恒寧、柳原格. 「薬剤耐性ウレアプラズマの同定」、第 40 回日本マイコプラズマ学会学術集会、秋葉原、2013.5.23-24
- 3: 脇本哲、味村和哉、内田薫、金川武司、木村正、柳原格. 「細胞を用いた TLR2 を介する NF- κ B 転写活性に対するプロゲステロン、フラレーンの抑制効果」、第 49 回日本周産期・新生児医学会学術集会、横浜、2013.7-14-16
- 4: Itaru yanagihara, kumiko nakahira. 「Structural aspects of EspA and EspB proteins of enterohaemorrhagic *E. coli*,

- 日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会 日本国内総会、京都、2013.8.8
- 5: 柳原格. 「流早産原因菌ウレアプラズマの病態解明」第21回日本胎盤学会学術集会シンポジウム「炎症と胎盤」、名古屋、2013.10.25-26、シンポジウム
 - 6: 柳原格. 「胎児炎症反応症候群 (FIRS) の病態と微生物」、第58回日本未熟児新生児学会・学術集会、金沢、2013.11.30-12.2、シンポジウム
 - 7: 江頭政和、飯田千晶、七條了宣、江頭智子、水上朋子、松尾幸司、高柳俊光、柳原格. 「ウレアプラズマ陽性母体児の臨床的検討」、第58回日本未熟児新生児学会・学術集会、金沢、2013.11.30-12.2
 - 8: Daisuke Kinoshita, Kiyooki Sumi, Hiroaki Tubouchi, Kensi Wasada, Kumiko Nakahira, Itaru Yanagihara. Gastric fluid cytokines in preterm infants: a useful test for evaluating antenatal inflammation, 17th Congress of the Federation of Asian and Oceania Perinatal Societies (FAOPS) and the 16th Annual Congress of the Perinatal Society of Australia and New Zealand (PSANZ) - FAOPS & PSANZ Sydney 2012. March 18-21
 - 9: 西海史子、柳原格. 「*Ureaplasma parvum* の細胞内取り込み機構・細胞内動態解析」日本マイコプラズマ学会、2012.5.24-25、盛岡
 - 10: 木下大介、玉置祥子、斉藤広幸、川村彬子、酒井絵美子、井石倫弘、甲斐明彦、前川周、隅清彰、中山雅弘、柳原格. 「出生直後の新生児胃液中顆粒球エラストラーゼ、サイトカインは組織学的絨毛膜羊膜炎を反映する」周産期新生児学会、2012.7.8-10、大宮
 - 11: 名倉由起子、内田薫、柳原格. 「早産における臨床分離マイコプラズマ科の血清型診断のまとめ」周産期新生児学会、2012.7.8-10、大宮
 - 12: Misako Iwata, Msahiro Nakayama, Masako Waguri, Nobuaki Mitsuda, Itaru Yanagihara, Tomio Fujita, Isao Nakanishi. Massive intervillous fibrin deposition in women with recurrent pregnancy loss, International Federation of Placenta Associations, September 18-21, 2012, Hiroshima
 - 13: 太田小百合、稲垣秀人、宮村浩徳、西澤春紀、中平久美子、柳原格、宇田川康博、倉橋浩樹. 「習慣流産をおこす ANXA5 上流のグアニン四重鎖構造多型」人類遺伝学 2012.10.25-27、東京
 - 14: Hideto Inagaki, Sayuri Ota, Haruki Nishizawa, Hironori Miyamura, Kumiko Nakahira, Macjiko Suzuki, Sachie Nishiyama, Yasuhiro Udagawa, Itaru Yanagihara, Hiroki Kurahashi, Obstetric complication-associated ANXA5 promoter polymorphisms affect gene expression via DNA secondary structures, American Society of Human Genetics, November 6-10, 2012, san Francisco
 - 15: Itaru Yanagihara, Kumiko Nakahira. The aggregative property of thermostable direct hemolysin, United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 12-14, 2012, Chiba
 - 16: 小野寺章、西海史子、古田拓也、中平久美子、石井幸奈、本間安季、太田舞子、諸澤瑛、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一. 「非晶質ナノシリカの細胞膜への結合とナノ生殖毒性との関連」第85回日本生化学会、2012.12.14-16、福岡
 - 17: 柳原格、中平久美子、内田薫. 「流早産起因微生物ウレアプラズマとその病原発揮機構」、第58回トキシシンポジウム 2011.7.6-7、東京
 - 18: 内田薫、味村和哉、柳原格. 「流早産関連細菌 *Ureaplasma parvum* の病原因子の同定」、第47回日本周産期・新生児医学会学術集会、2011.7.10-12、札幌
 - 19: 味村和哉、野崎昌俊、柳原格. 「ナノシリカの妊娠マウス投与が胎盤に与える影響」、第47回日本周産期・新生児医学会学術集会 2011.7.10-12、札幌
 - 20: 柳原格、味村和哉、名倉由起子、西海史子、中平久美子. 「Nanoparticle can cross the placental barrier in pregnant mice」、日米コレラ、2011.8.3、京都
 - 22: Kaoru Uchida, Kumiko Nakahira, Takashi Shimizu and Itaru Yanagihara. Inflammatory response and intrauterine fetal death in pregnant mice induced by MBA from clinical isolate of *Ureaplasma parvum*. Joint Congress of The 5th Meeting of Asian Organization for Mycoplasmaology. The 38th Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmaology. 2011.10-19-21, Nagasaki
 - 23: Itaru Yanagihara, Kaoru Uchida, Kumiko Nakahira and Fumiko Nishiumi. Virulence factors of *Ureaplasma parvum*. Joint Congress of The 5th Meeting of Asian Organization for Mycoplasmaology. The 38th Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmaology. 2011.10-19-21, Nagasaki
 - 24: 太田小百合、稲垣秀人、宮村浩徳、西澤春紀、柳原格、宇田川康博、倉橋浩樹. 「ANXA5 プロモーター領域のグアニン四重鎖構造と習慣流産」、第56回日本人類遺伝学会、2011.11.9-12、千葉
 - 25: 岩田みさ子、中平久美子、和栗雅子、

光田信明、倉橋浩樹、柳原格、中西功 .
「不育症患者におけるアネキシン A5 遺伝子 SNP5 と生児獲得に関する研究」、第 56 回日本生殖医学会、2011.12.8-9、横浜

〔図書〕(計 1 件)

柳原格、中平久美子. 近代出版、腸炎ピブリオ 第 集 -2「耐熱性溶血毒の構造学的解析」p277-286

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mch.pref.osaka.jp/research/developmental/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳原 格 (Itaru Yanagihara)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)
免疫部門・部長
研究者番号：60314415

(2) 研究分担者

中平 久美子 (Kumiko Nakahira)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)
免疫部門・流動研究員
研究者番号：20581317

(3) 研究分担者

西海 史子 (Fumiko Nishiumi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)
免疫部門・流動研究員
研究者番号：60599596