

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20150

研究課題名(和文) 早産ならびに胎児炎症反応症候群の予防を目的とした胎盤絨毛マクロファージの解析

研究課題名(英文) Immunohistochemical analysis of macrophages in the placental chorionic villi for the elucidation of the pathogenesis of fetal inflammatory response syndrome

研究代表者

山口 宗影 (Munekage, Yamaguchi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：20626535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：早産に伴う高サイトカイン状態は、胎児炎症反応症候群(FIRS)を惹起して様々な新生児合併症のリスクを増大させる。胎盤において、母体由来の脱落膜マクロファージ(M)と早産の関与は報告されているが、胎児由来の胎盤絨毛Mが来す役割に関する研究は少ない。本研究では、ヒト胎盤絨毛MとFIRS関連の新生児合併症の関与について検討した。脳室周囲白質軟化症(PVL)や慢性肺疾患(CLD)を合併した早産児の胎盤絨毛において抗炎症性Mが減少していた。炎症性M優位の環境がPVLやCLD発症に関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Maternal hypercytokinemia associated with preterm labor induces fetal inflammatory response syndrome (FIRS) and increases the risk of neonatal complications. The association between preterm labor and decidual macrophages of maternal origin has been reported. However, the association between preterm labor and placental chorionic macrophages of fetal origin remains unknown. This study examined the involvement of phenotype of chorionic macrophages in the neonatal outcome associated with FIRS. The immunohistochemical analysis revealed that the number of anti-inflammatory macrophages in the placental chorionic villi was significantly decreased in preterm newborn diagnosed with periventricular leukomalacia (PVL) or chronic lung disease (CLD). The increased number of inflammatory macrophages in the chorionic villi may be associated with the pathogenesis of PVL or CLD.

研究分野：産科婦人科

キーワード：早産 胎児炎症反応症候群 マクロファージ 絨毛膜羊膜炎 抗炎症性マクロファージ 脳室周囲白質軟化症 慢性肺疾患

## 1. 研究開始当初の背景

### < 早産と胎児炎症反応症候群 >

本邦における早産率は 5.7% (2010 年) と世界的には低値であるが、出生児の未熟性が問題となる在胎 28 週未満の早産児出生数(出生率)は 1980 年の 1,924 例(0.12%) に比べ、2008 年では 2,813 例(0.26%) まで増加している(人口動態統計:e-stat 政府統計の総合窓口)。在胎 28 週未満の早産児は脳室内出血、脳室周囲白質軟化症、壊死性腸炎、慢性肺疾患などを合併しやすく神経学的予後の悪化が長期的な問題となり、新生児集中治療室(NICU)の病床数の慢性的な不足に繋がり社会問題となっている。早産は、上行性感染を主として絨毛膜羊膜炎をはじめとした子宮内感染と関連すると考えられてきたが、詳細な病態は未だ解明されていない。これまでの基礎的研究では、炎症性サイトカインやケモカインの増加、好中球やマクロファージの増加、子宮活性蛋白の増加に導く炎症関連シグナル経路の活性化と早産の関連が指摘されている(Phillippe M. N Engl J Med, 2014)。早産を来した胎盤の一部には病理組織学的に絨毛膜羊膜への母体好中球の浸潤が認められ、絨毛膜羊膜炎(CAM)と診断される。さらに炎症が進展すると、病理組織学的に胎児好中球の臍帯間質への浸潤である臍帯炎が認められる。臍帯炎を来した児は、胎児の高サイトカイン血症を伴い胎児の全身炎症反応を亢進して多臓器障害にいたる胎児炎症反応症候群(FIRS)との関連が示唆されている。FIRS をきたした児は、脳性麻痺の原因となる脳室周囲白質軟化症(PVL)をはじめとした重篤な新生児疾患の罹患率との相関が多く報告されている。

### < ヒト胎盤絨毛マクロファージの生理的機能 >

ヒト胎盤絨毛の間質には、大小の空胞を特

徴とし、抗 CD68 抗体に陽性を示す胎盤絨毛マクロファージが存在する(図 1)。われわれの研究室では、これまで胎盤絨毛マクロファージの生理的機能の解析を行ってきた。空胞の形態的特徴を 4 つに分類し(Katabuchi H, et al. Prog Clin Biol Res, 1989)、この細胞がヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を発現することおよび免疫電子顕微鏡学的に hCG の局在を初めて報告し(Katabuchi H, et al. Endocr J, 1994)、マクロファージが hCG を代謝することを報告した(Khan et al. Placenta, 2000)。hCG は、母体から胎児への流入が過剰となると胎児に性分化を惹起する可能性があり、hCG を母児間で調節するための防御機構として働いている可能性を報告した(Sonoda N, et al. Placenta, 2005)。その後、この細胞が持つ最大の特徴である空胞は、hCG の取り込みにより誘導されることが示された。母児間で hCG を制御する機構を解明し(Yamaguchi, et al. Cells Tissues Organs, 2013)この細胞が持つ新たな生理的役割の機序を明らかにしてきた。

### < 胎盤絨毛における炎症性マクロファージの存在 >

全身に分布するマクロファージはその活性化様式から、炎症性の M1 と抗炎症性の M2 に分類される(Sica A et al. J Clin Invest, 2012)。ヒト胎盤絨毛マクロファージは、生理的環境では胎児発育のための血管新生や母児間の免疫寛容に関わる M2 マクロファージと考えられている。しかし、上述した CAM や臍帯炎をきたした環境下では M1 として存在しているという仮説を立てた。M1 マクロファージのマーカーは未だ同定されていないため、早産胎盤を M2 マクロファージのマーカーの候補である抗 CD163 抗体を用いて免疫組織化学を行うと、陰性を呈するマクロファージ(非

M2)が存在することを初めて同定した(図2)。在胎34週未満の胎盤43例を検討した結果、非M2群(22例)はM2群(21例)と比較し有意に臍帯炎を合併しており、新生児の合併症が多い傾向であったことを学会で報告した(第62回日本産科婦人科学会学術講演会、2010)。M1マクロファージのマーカーを同定するとともに、これらのマクロファージが特異的に発現する受容体やサイトカインが同定されれば早産やFIRSの機序を明らかにできる可能性がある。

### 2. 研究の目的

在胎28週未満の早産児出生率は近年増加しており、出生児の生命予後や神経学的予後が最大の問題である。早産の主な原因として、絨毛膜羊膜炎をはじめとする子宮内感染を中心とした炎症性サイトカインとの関連が指摘されているが、その病態は未だ解明されていない。われわれはこれまでに胎盤絨毛に存在するマクロファージの生理的な機能を報告してきた。その中で、これらのマクロファージは炎症性と抗炎症性の2つの活性化様式に分類される可能性を見出した。本研究は、早産の胎盤絨毛におけるマクロファージの活性化状態や発現する受容体およびサイトカインを検索し、早産の機序、さらに胎児炎症反応症候群(FIRS)の発症機構を明らかにし、その予防や治療へ展開するための研究基盤を確立することが目的である。

### 3. 研究の方法

2005年から2014年までの間に熊本大学医学部附属病院で、切迫早産・及び前期破水を契機として32週以前に分娩となった単胎妊娠症例のうち、後方視的な胎盤の病理組織学的検討が可能であった46症例を対象とした。汎Mに対する抗体として抗Iba1抗体(Wako), T2Mに対する抗体と

して抗CD163(Leica), CD204抗体(TransGenic)を用いた。オールインワン蛍光顕微鏡のBZ-解析アプリケーション[キーエンス社]を用いて、絨毛間質面積あたりのそれぞれの陽性細胞数を解析した。1スライドあたり10視野をランダムに選択して計測し平均値を用いた。統計学的解析には、Spearmanの順位相関係数, Welch's test, Mann Whitney U testを用いた。

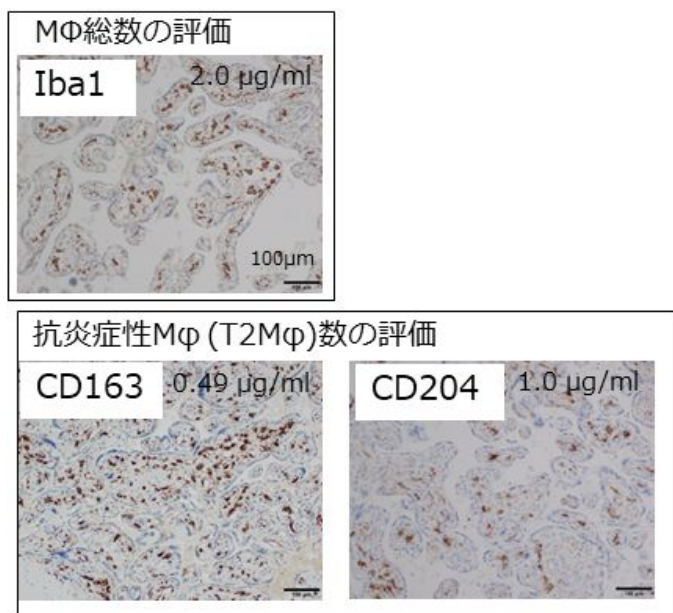


図1: 胎盤の免疫組織化学

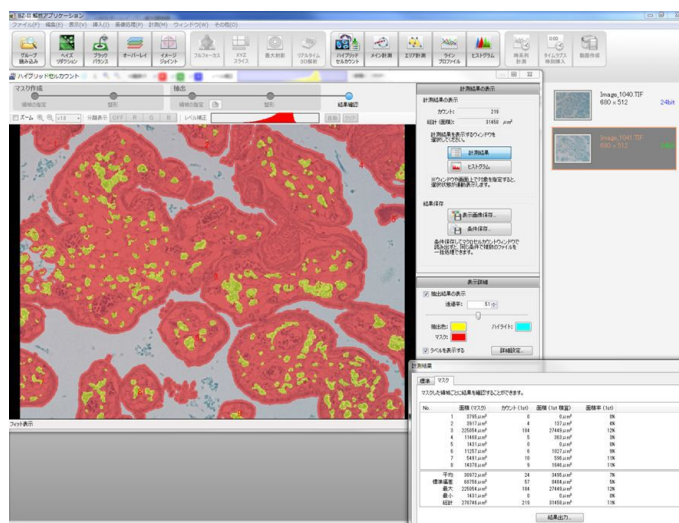


図2: BZ-解析アプリケーション

### 4. 研究成果

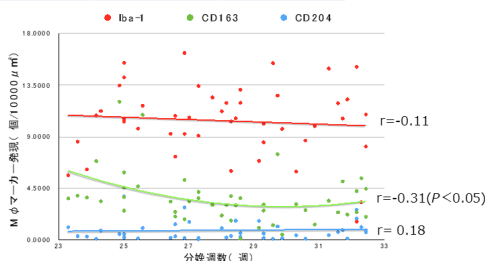
平均分娩週数は28週1日(23週2日-32週3日)であった。児の合併症では、脳室

周囲白質軟化症(PVL)を 6 例、脳室内出血を 6 例、未熟児網膜症を 8 例、慢性肺疾患 (CLD) を 10 例に認めた。絨毛間質における M マーカーの Iba1、炎症制御に関わる抗炎症性 M マーカーの CD163、CD204 の陽性細胞数と分娩週数との相関を検討すると、CD163 のみに有意に負の相関が認められた ( $P<0.01$ )。Iba1 と CD163 陽性細胞数は児の合併症と有意な関連は認められなかった。CD204 陽性細胞数は、非 CLD 群に比べ CLD 群では有意に減少していた ( $P<0.01$ )。CD163 陽性細胞数を、週数と負の相関を示さない妊娠 26 週以降で検討すると、非 PVL 群に比べ PVL 群で有意に減少し ( $P<0.05$ )、非 CLD 群に比べ CLD 群で有意に減少していた ( $P<0.01$ )。

胎盤絨毛間質における抗MΦ抗体陽性細胞数 (/10,000 $\mu$ m<sup>2</sup>)

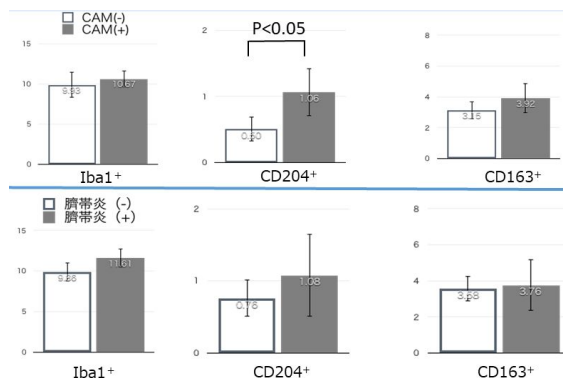
	平均値±標準偏差	範囲
Iba-1 (総MΦ)	10.40 ± 3.1	1.59-16.31
CD163 (T2MΦ)	3.63 ± 2.2	0.11-12.05
CD204 (T2MΦ)	0.85 ± 0.87	0.06-3.79

(n=46)



**図 3：分娩週数と胎盤絨毛間質 M の関連**

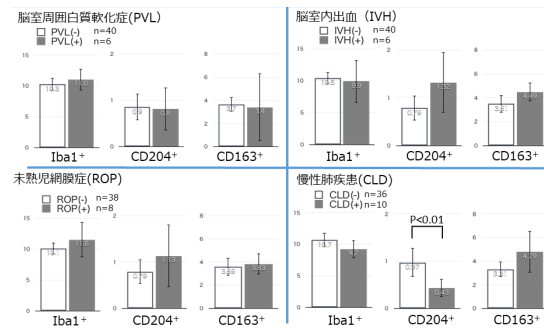
CD163 陽性細胞数は妊娠 26 週以前で分娩週数と負の相関を示した。



**図 4：CAM・臍帯炎と胎盤絨毛間質 M の関連**

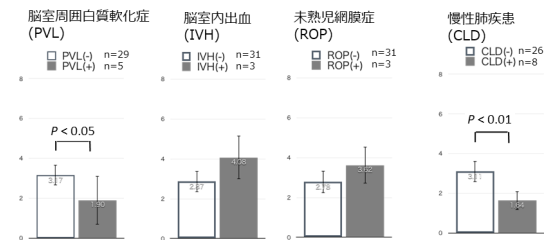
胎盤絨毛間質 M の総数 (Iba-1+)は CAM

の有無と関連しなかったのに対して、抗炎症性 M (CD204+)は CAM のある群において有意に増加していた。臍帯炎の有無と各種抗マクロファージ抗体陽性細胞数との間には有意な差はなかった。



**図 5：新生児合併症と胎盤絨毛間質 M の関連**

児が慢性肺疾患を呈した症例の胎盤絨毛間質では抗炎症性 M (CD204+)の数が有意に減少していた。



**図 6：妊娠 26-32 週の出生児における新生児合併症と CD163 陽性細胞数の検討**

妊娠週数と CD163 陽性数が負の相関を示さなかった、妊娠 26 週以降に出生した症例に限って検討すると、新生児が PVL や CLD を発症した症例においては、有意に CD163 陽性細胞が減少していた。

## 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

第 52 回日本周産期新生児医学会学術集会

(2016 年 7 月 16 日～18 日：富山市)

第 48 回日本臨床分子形態学会学術集会

(2016 年 9 月 23 日～24 日：熊本市)

第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会

(2017 年 4 月 14 日～16 日：広島市)

〔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

山口宗影 (Munekage Yamaguchi)

熊本大学大学院生命科学研究部

産科婦人科学・助教

研究者番号：20626535

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )